

Padronização de estratégia de rastreamento molecular por Sequenciamento de Nova Geração em pacientes com Síndrome de Lynch

Soares, BL (ME)^{1*}; Brant, AC¹; Gomes, RG¹; Pastor, T¹; Ashton-Prolla, P²; Moreira, MAM¹.

¹Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

²Hospital de Clínicas de Porto Alegre-UFRGS, Porto Alegre, Brasil¹

* barbara-luisa@hotmail.com

INTRODUÇÃO

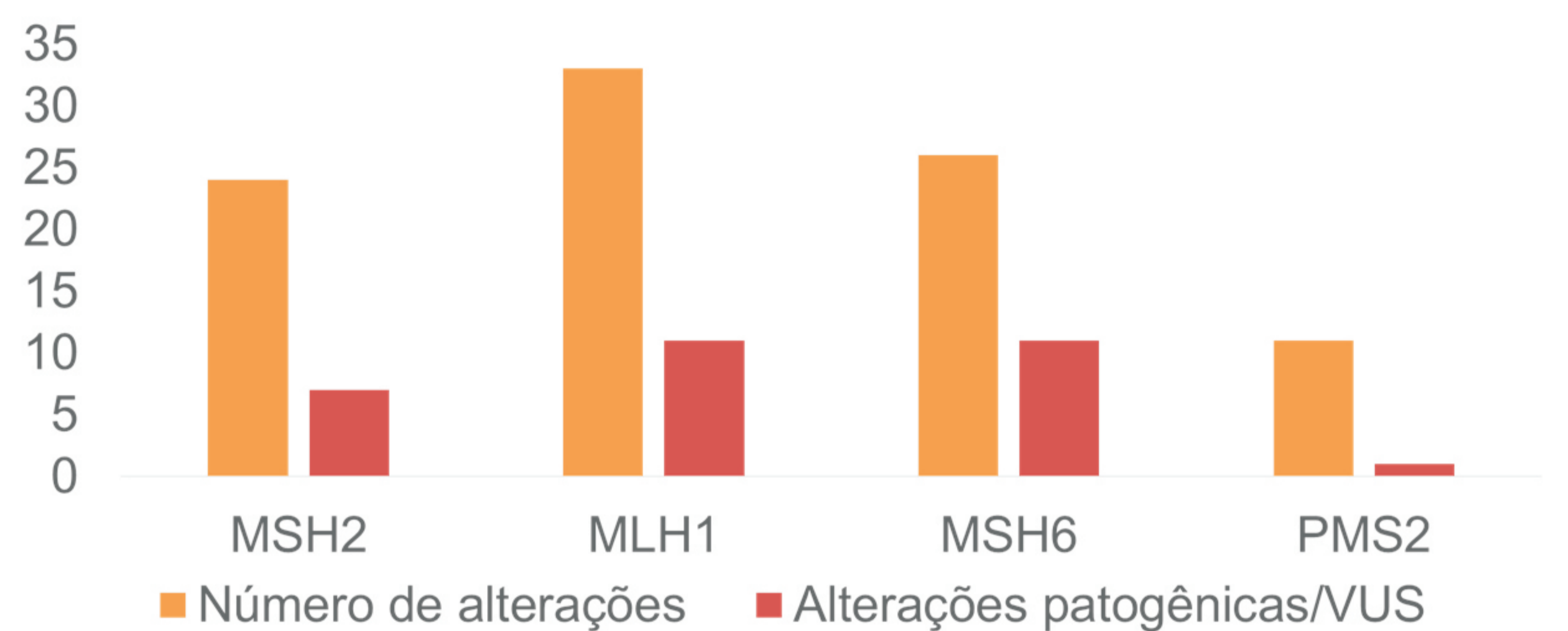
A Síndrome de Lynch (SL) é uma doença de herança autossômica dominante de alta penetrância em que os indivíduos afetados desenvolvem tumores no cólon e reto do intestino, endométrio, ovário e outros tecidos menos frequentes (GIARDIELLO et al., 2014). Esta síndrome está relacionada com a presença de mutações germinativas em um dos quatro genes de reparo de DNA (MMR): *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2* e no gene *EPCAM* (PONTI G. et al, 2015). Cerca de 42%, 33%, 18% e 7,5% dos casos de Síndrome de Lynch são associados a mutações nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, respectivamente (PLAZZER et al., 2013). O cólon e reto do intestino são órgãos mais acometidos, sendo que 3-5% de todos os casos de câncer colorretal estão associados a SL.

O MMR é um dos mecanismos responsáveis por assegurar que o processo de replicação ocorra de maneira correta, sem que haja a incorporação ou deleção de nucleotídeos na sequência de DNA. Alterações moleculares nos genes envolvidos, levam a perda da função das proteínas codificadas por eles (SIRAJ et al., 2015), deixando as células mais susceptíveis à instabilidade das regiões de microssatélites e contribuindo para o início do processo de carcinogênese colorretal (NOLL; PAREKH; KARLITZ, 2016).

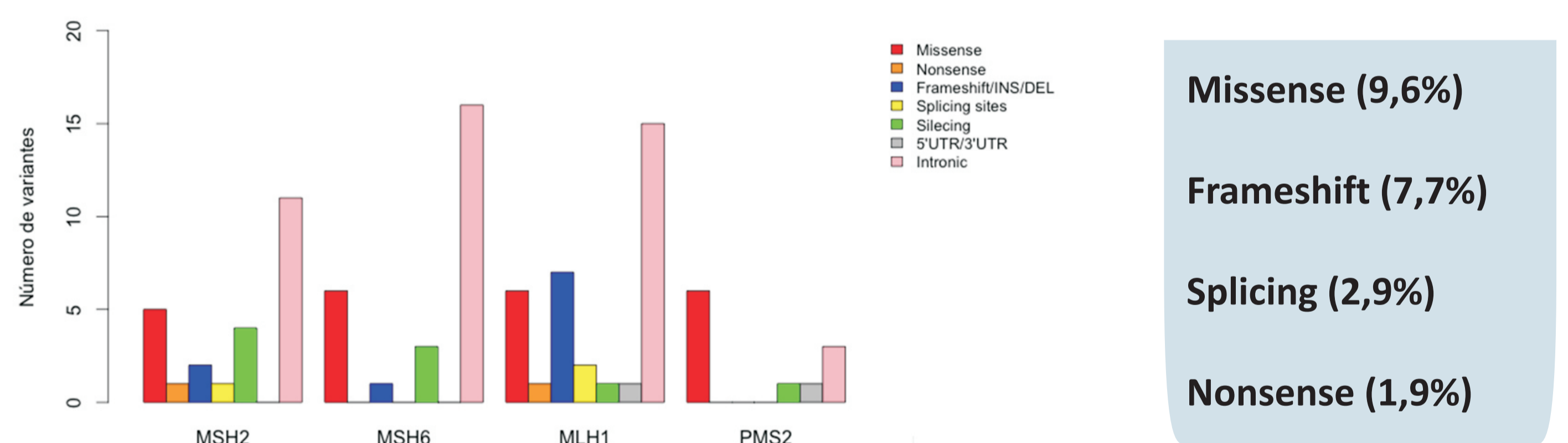
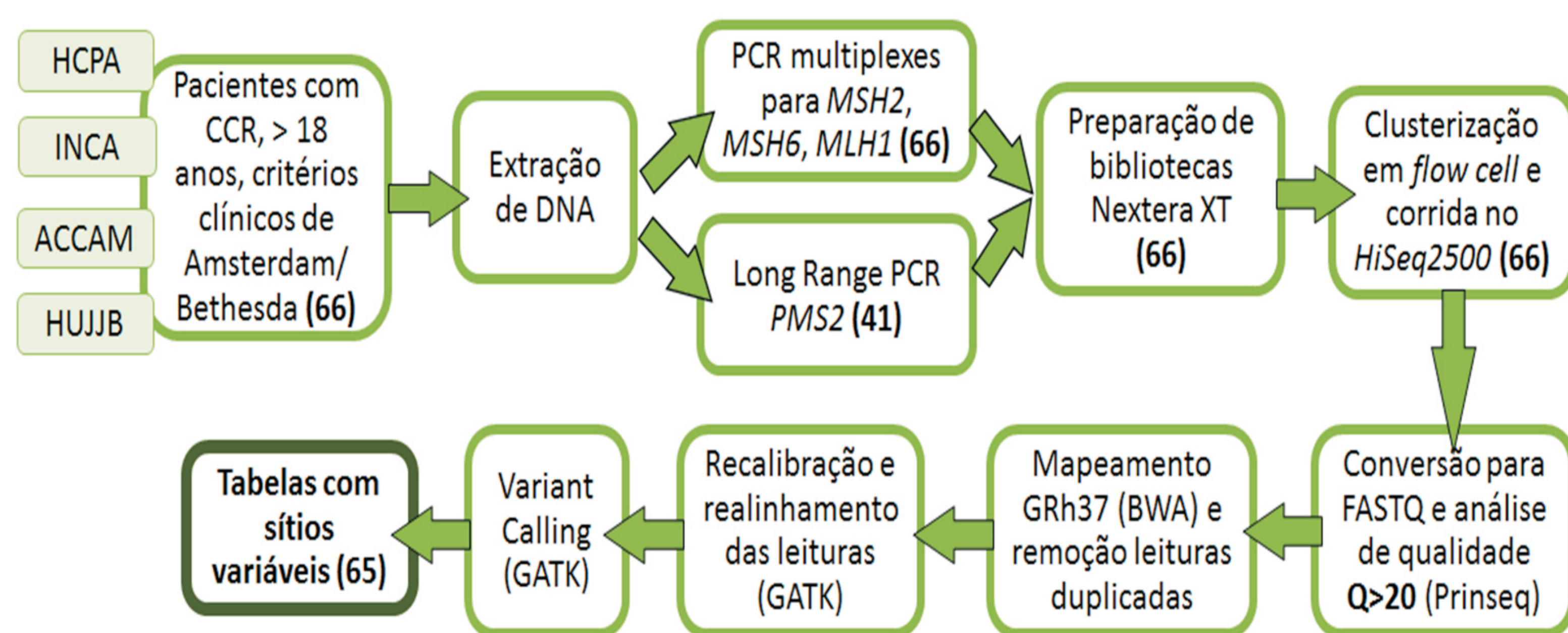
Este grande número de genes torna a identificação de alterações germinativas demorada e com um custo elevado. Desta maneira, o projeto visa padronizar um método de rastreamento molecular dos genes *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2* em pacientes que preencheram os critérios clínicos de Amsterdã e/ou Bethesda para Síndrome de Lynch, utilizando das estratégias de PCR multiplex e PCR de longo alcance, acoplada ao Sequenciamento de Nova Geração (NGS) na plataforma *HiSeq 2500*.

63X → 21X

Reações Multiplexes/LR-PCRs	Genes			
	MSH2	MSH6	MLH1	PMS2
1	E9/12/15	E3/6/7	E5/9/19	E1 a E5
2	E4/7	E2/4/5	E2/4/7/10/15/18	E6
3	E6/13	E8 a E10	E1/6/11	E7 a E9
4	E5/8	E1	E14/17	10
5	E3/10/11/14/16	X	E13/16	E11 a E15
6	E1/2	X	E3/8/12	X



METODOLOGIA



RESULTADOS

Foram padronizadas 21 reações de PCR multiplex e de longo alcance para o rastreamento molecular dos genes de MMR, sendo 6, 4, 6 e 5 para *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* e *PMS2*, respectivamente. Em média, 4.385.195 reads passaram pelos filtros de qualidade do PrinSeq, sendo que 97% (4.259.518) foram mapeadas contra o genoma humano GRCh37. Todas as regiões de interesse foram detectadas pelo *HiSeq2500*, e a profundidade média de cobertura para todos os pacientes foi de 15.616 vezes (1176,46- 46069,51). Os genes *MSH2*, *MSH6*, *MLH1* e *PMS2* apresentaram cobertura média de 7.988, 36.313, 11.899 e 7.871 vezes, respectivamente. Os éxons 1 e 2 do gene *MSH2* demonstraram baixa profundidade média de cobertura (<30X) para 33% (22/65) e 18% (12/54) das amostras, respectivamente.

Noventa e quatro sítios variáveis foram encontradas entre as regiões codificantes e flanqueadoras dos genes de MMR, sendo 23 alterações para *MSH2*, 27 para *MSH6*, 34 para *MLH1* e 12 para *PMS2*. Do número total de variantes encontradas, vinte e quatro (25,5%) foram classificados como mutações patogênicas ou de significado clínico desconhecido. Os genes *MSH2* e *PMS2* apresentaram uma única VUS e *MSH6* e *MLH1* apresentaram quatro VUS.

CONCLUSÃO

A partir das técnicas empregadas foi possível obter altos índices de cobertura e validar as variantes encontradas. Os resultados obtidos indicam a eficiência de reações PCRs multiplexes e de longo alcance para o rastreamento molecular dos genes MMR. O emprego destas metodologias reduz o custo e o tempo de rastreamento molecular quando comparando com o Sequenciamento de Sanger, o que é benéfico para estes pacientes, considerando seus riscos aumentados de desenvolver câncer em comparação com a população em geral

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GIARDIELLO FM, ALLEN JI, AXILBUND JE, BOLAND CR, BURKE CA, BURT RW, CHURCH JM, DOMINITZ JA, JOHNSON DA, KALTENBACH T, LEVIN TR, LIEBERMAN DA, ROBERTSON DJ, SYNGAL S, REX DK. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. v. 147, n. 2, p. 502-526, 2014.
- NOLL, A.; PAREKH, P.; KARLITZ, J. Diagnosis of Lynch syndrome before colorectal resection? does it matter? *Techniques in Coloproctology*, v. 20, n. 4, p. 203-205, 2016.
- PLAZZER, J. P. et al. The InSIGHT database: Utilizing 100 years of insights into Lynch Syndrome. *Familial Cancer*, v. 12, n. 2, p. 175-180, 2013.
- SIRAJ, A. K. et al. Prevalence of Lynch syndrome in a Middle Eastern population with colorectal cancer. *Cancer*, v. 121, n. 11, p. 1762-1771, 2015.
- PONTI, G. CASTELLSAGUÉ, E. RUIINI, C. PERCESEPE, A. TOMASI, A. Mismatch repair genes founder mutations and cancer susceptibility in Lynch syndrome. *Clinical Genetics*. v. 87, n. 6, p. 507-516, 2015.

AGRADECIMENTOS



Projeto Gráfico: Serviço de Edição e Informação Técnico-Científica / INCA