

NECESSIDADE DE NOVOS CRITÉRIOS CLÍNICOS Para a Identificação de Famílias com Síndrome de Lynch em Base Genética

RITA SOUSA, PEDRO LAGE, SARA FERREIRA, ISABEL CLARO, INÊS FRANCISCO, BRUNO FILIPE, CRISTINA ALBUQUERQUE, ALEXANDRA SUSPIRO, PAULA RODRIGUES, CARLOS NOBRE-LEITÃO
Serviço de Gastrenterologia. Centro de Investigação de Patologia Molecular. Clínica de Risco Familiar. Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil. Lisboa

RESUMO

Introdução: Em famílias com Síndrome de Lynch (SL), doença hereditária com transmissão autossómica dominante, a aplicação precoce e intensiva de programas de vigilância reduz a mortalidade por carcinoma do cólon ou recto. Existem critérios clínicos para a realização de análise mutacional em genes de reparação do ADN: critérios de Amesterdão (CAI), critérios de Amesterdão modificados (CAII) e critérios de Bethesda (CB).

Objectivos: Em famílias com suspeita de SL, correlacionar os critérios clínicos e a detecção de mutações germinais nos genes de reparação do ADN *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*.

Doentes e Métodos: Incluíram-se 92 indivíduos afectados, pertencentes a famílias diferentes e avaliou-se qual o critério utilizado para o diagnóstico de SL. A pesquisa de mutações germinais nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* foi efectuada por DGGE, MLPA e sequenciação directa.

Resultados: Identificaram-se mutações germinais em 54/92 (59%) famílias, 30 no *MLH1*, 23 no *MSH2* e 1 no *MSH6*. A detecção de mutações germinais foi significativamente menor com os CAI que não apresentavam critério de idade (0%), comparativamente com os outros: CAI (60%), CAII (62%), CAII sem critério de idade (67%) e CB (61%).
Conclusões: Os CAI, CAII e CB apresentaram uma percentagem idêntica de identificação de famílias com SL, em base genética. A ausência do critério de idade nos CAI torna improvável o diagnóstico genético de SL. Seria importante a elaboração de critérios mais simples e uniformes que possibilitassem, de forma mais homogénea, a identificação de famílias com SL.

SUMMARY

NEED OF NEW CLINICAL CRITERIA FOR THE IDENTIFICATION OF GENETIC LYNCH SYNDROME

Background: Surveillance programs in families with Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC), which is an autosomal dominant disease, decrease colorectal carcinoma mortality. There are multiple clinical criteria for the identification of these families, mainly: the Amsterdam Criteria (ACI), the modified Amsterdam Criteria (ACII) and the Bethesda Guidelines (BG).

Aims: To correlate, in families with HNPCC, the clinical criteria with the probability of detecting a germ-line mutation in *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* mismatch repair genes.

Methods: We included 92 affected patients belonging to different families. Clinical criteria leading to HNPCC diagnosis were evaluated. Germ-line mutations in *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes were performed by DGGE/MLPA and direct sequencing.

Results: Germ-line mutations were detected in 54/92 (59%) families, 30 in *MLH1*, 23 in *MSH2* and 1 in *MSH6*. Germ-line mutation detection was significantly lower in ACI without age criteria (0%), when compared to: ACI (60%), ACII (62%), ACII without age criteria (67%) and BG (61%).

Conclusions: The classic, modified AC and BG allowed the detection of an identical percentage of families with mutation positive HNPCC. The absence of the age criteria in the ACI makes the HNPCC diagnosis highly unlikely. Simpler and uniform criteria should be elaborated, to allow a homogeneous identification of families with HNPCC.

INTRODUÇÃO

A Síndrome de Lynch (SL) é uma doença hereditária, com modo de transmissão autossómico dominante, responsável por 3-5% de todos os carcinomas do cólon ou recto (CCR)¹. Caracteriza-se pelo diagnóstico de CCR em idades jovens, com predomínio no cólon direito e uma elevada incidência de tumores síncronos e metacrónicos. Em termos histológicos, os carcinomas são maioritariamente pouco diferenciados, mucinosos e apresentam infiltrado linfocitário peri e intra-tumoral, por vezes, com reacção *Crohn-like*². Existe ainda um risco aumentado para o desenvolvimento de outros tumores, que são considerados pertencentes ao espectro, nomeadamente carcinomas do endométrio, ovário, intestino delgado, urotélio, vias biliares, pâncreas e estômago^{3,4}. A nível molecular, a SL caracteriza-se pela existência de mutações germinais em genes do sistema de reparação de erros do tipo *mismatch* do ADN, 90% das quais estão localizadas nos genes *MLH1* e *MSH2* e menos de 10% no *MSH6*⁵.

O risco de desenvolvimento de CCR, estimado para a SL, é de 70 a 80%⁶. A aplicação precoce e intensiva de programas de vigilância, nestas famílias, reduz a incidência de CCR em 62% e da mortalidade atribuível ao mesmo em 65%⁷. Assim, o seu benefício em termos de custo-eficácia está estabelecido, tendo-se verificado que a vigilância de um portador de mutação germinal conduz a um aumento da esperança de vida em cerca de sete anos. Reveste-se, portanto, de importância fundamental identificar estas famílias.

A SL não apresenta características fenotípicas clínicas evidentes até ao desenvolvimento de CCR, pelo que o seu diagnóstico deve ser efectuado com base na história familiar oncológica e nas características clínico-patológicas de indivíduos com este tumor.

Em 1991, o *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer* definiu os Critérios de Amesterdão Clássicos (CAI), com o objectivo de uniformizar a identificação destas famílias, para fins investigacionais – quadro I⁸.

Quadro I – Critérios de Amesterdão Clássicos

- 1 – Três ou mais familiares com CCR histologicamente confirmado, sendo um deles familiar em primeiro grau dos outros dois;
- 2 – Pelo menos duas gerações sucessivas afectadas;
- 3 – Pelo menos um dos CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos de idade;
- 4 – Exclusão de Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon.

CCR = carcinoma do cólon ou recto

No entanto, considerou-se que estes critérios eram restritivos, por não incluírem tumores extra-cólicos, pelo que, em 1999, foram elaborados os Critérios de Amesterdão modificados (CAII) – quadro II⁹.

Quadro II – Critérios de Amesterdão Modificados

- 1 – Três ou mais familiares com um tumor do espectro da SL histologicamente confirmado (CCR, endométrio, intestino delgado, ureter e pélvis renal), sendo um deles familiar em primeiro grau dos outros dois;
- 2 – Pelo menos duas gerações sucessivas afectadas;
- 3 – Pelo menos um dos tumores diagnosticado em idade inferior a 50 anos de idade;
- 4 – Exclusão de Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon.

SL = Síndrome de Lynch; CCR = carcinoma do cólon ou recto

Em 1997, foram estabelecidos os Critérios de Bethesda (CB), revistos em 2004, com o objectivo de seleccionar os CCR que devem ser submetidos a pesquisa de instabilidade

de microssatélites (IM) - quadro III¹⁰. A IM é um marcador intermediário para a análise mutacional nos genes envolvidos na SL, uma vez que mais de 90% dos CCR na SL apresentam instabilidade de microssatélites de alto grau (IMA)¹¹.

Quadro III – Critérios de Bethesda Revistos

- 1 – Indivíduos com CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
- 2 – Indivíduos com CCR síncronos ou metacrónicos, ou associação com outros tumores do espectro da SL*, independentemente da idade;
- 3 – Indivíduos com CCR com características histológicas de instabilidade de alto grau (infiltrado linfocitário, reacção *Crohn-like*, tumores mucinosos ou com diferenciação em “anel de sinete” ou padrão de crescimento medular) diagnosticado em idade inferior a 60 anos;
- 4 – Indivíduos com CCR e um ou mais familiares em 1º grau com um tumor do espectro da SL*, um dos quais diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
- 5 – Indivíduos com CCR e dois ou mais familiares de 1º e 2º grau com tumor do espectro da SL*, independentemente da idade.

CCR = carcinoma do cólon ou recto

*Tumores associados ao espectro da SL incluem: CCR; carcinomas do endométrio, ovário, intestino delgado, vias biliares, pâncreas, ureter e pélvis renal, estômago; tumores do cérebro (glioblastomas) e cutâneos (adenomas ou carcinomas de glândulas sebáceas e queratoacantomas).

No entanto, a detecção de uma mutação germinal patogénica é o *gold standard* para o diagnóstico da SL. Está estabelecido que têm indicação para pesquisa de mutação genética nos genes de reparação do tipo *mismatch* do ADN os indivíduos afectados pertencentes a famílias com CAI, CAII ou com CB e CCR com IMA. No entanto, os critérios clínicos têm sido considerados limitativos para a prática clínica, identificando apenas um subgrupo de indivíduos portadores de mutação.

O objectivo do nosso estudo foi avaliar, em famílias com suspeita de SL baseada em critérios clínicos, a correlação entre os respectivos critérios (CAI e CAII completos ou sem o critério de idade – CI – e CB) e a detecção de mutações germinais nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*.

POPULAÇÃO E MÉTODOS

No presente estudo, foram incluídos 92 indivíduos afectados com CCR, pertencentes a famílias diferentes, 51 do sexo masculino e 41 do sexo feminino. A média de idades foi de 58 ± 12,7 anos (33-83). Destes indivíduos, 25 preen-

chiam os CAI, 4 os CAI sem CI, 42 os CAII, 3 os CAII sem CI e 18 os CB.

Análise Genética

Obteve-se consentimento informado dos indivíduos para colheita de material, tendo como objectivo a realização de estudos genéticos.

Os tumores dos 18 doentes que preenchiam os CB foram submetidos a pesquisa de IM. Para tal, procedeu-se a extracção de ADN do tecido tumoral e do tecido normal não neoplásico, colhidos a partir de peças cirúrgicas, após fixação em formol e inclusão em parafina. Analisaram-se os cinco marcadores de Bethesda: D2S123, D5S346, D17S250, BAT-25 e BAT-26. Procedeu-se à amplificação por *Polimerase Chain Reaction* (PCR) e efectuou-se electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante (figura 1) sendo a análise efectuada por *Genescan* no sequenciador automático ABI Prism 310 (*Applied Biosystems*).

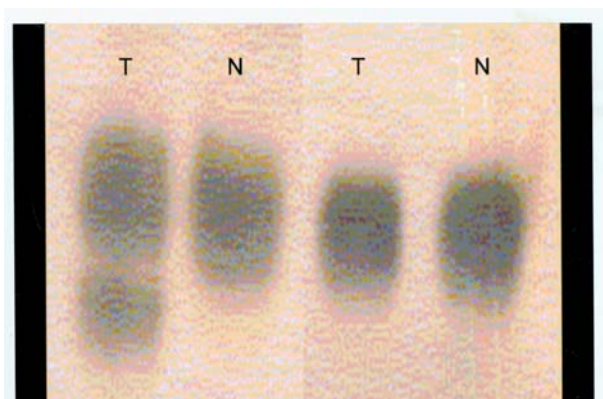


Fig. 1 – Electroforese em gel de poliacrilamida para o marcador BAT-25, mostrando instabilidade.

A IM foi definida pela presença de pelo menos um alelo adicional no tumor, quando comparado com a mucosa normal, não neoplásica. De acordo com os critérios de Bethesda, classificou-se a IM em alto grau, quando se verificou instabilidade em dois ou mais marcadores, de baixo grau quando se verificou instabilidade num marcador e estável quando não foi detectada instabilidade em nenhum dos marcadores testados. Na presença de IMA, procedeu-se a pesquisa de mutações germinais.

Extraiu-se ADN a partir da colheita de sangue periférico para pesquisa de mutações nos genes *MLH1* (3p-19 exões), *MSH2* (2p-16 exões) e *MSH6* (2p-10 exões). Esta foi efectuada por *Denaturing Gradient Gel Electrophoresis* (DGGE), que permite a detecção de mutações pontuais. Cada um dos exões dos três genes foi examinado separadamente. Após amplificação por PCR, os exões

foram submetidos a desnaturação e incubação com os *primers*, descritos por Nystrom-Lathi et al e Wu et al, à temperatura de *annealing* dos respectivos, havendo formação de heteroduplexes¹²⁻¹⁴. Em seguida, os produtos amplificados foram aplicados num gel de poliácridamida a 6%, contendo um gradiente desnaturante específico para cada exão. A electroforese decorreu a uma voltagem de 160V em tampão TAE durante quatro horas, com uma temperatura constante de 60°C. Após o gel ter sido corado numa solução de brometo de etídio, as amostras foram visualizadas sob luz ultravioleta (Figura 2). Sempre que as amostras apresentavam um padrão diferente do controlo normal, o que é indicador de uma alteração no ADN, procedeu-se a sequenciação directa (Figura 3). Para esse efeito, o produto de PCR foi purificado e sequenciado utilizando-se, respectivamente, os kits *Q/Aquick PCR purification* (Quiagen) e kit *fmol* (Promega) e mais recentemente o *Big Dye terminator cycle sequencing* (Applied Biosystems). Os produtos da sequenciação foram analisados num gel de poliácridamida desnaturante e os resultados visualizados por autoradiografia ou no sequenciador *ABI Prism 310 Genetic Analyser* (Applied Biosystems).

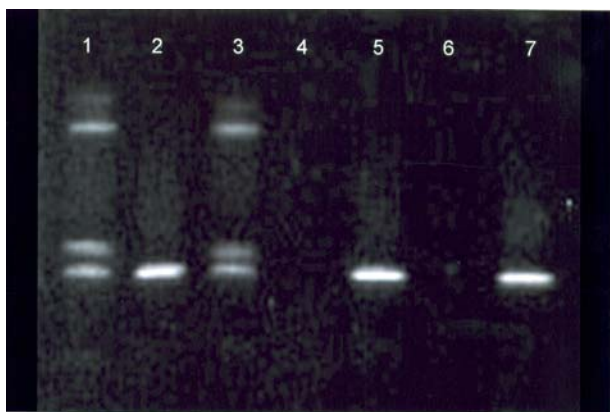


Fig. 2 – Análise mutacional do exão 14 do gene *MLH1* por DGGE. Nas colunas 1 e 3, observa-se alteração do padrão de migração, o que é indicador da presença de uma mutação.

Se por este método, o diagnóstico genético fosse inconclusivo, procedia-se à pesquisa de grandes deleções por *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), de acordo com o protocolo do fabricante. A leitura foi efectuada por *Genescan*, tendo-se considerado existir uma grande deleção quando havia uma redução da área relativa do pico, correspondente a um determinado exão, na ordem dos 35-55%. Sempre que se detectou uma deleção envolvendo apenas um exão, procedeu-se a sequenciação da região flanqueadora do exão em questão, para exclusão de uma variante na zona de ligação da sonda que pudesse originar um falso positivo.

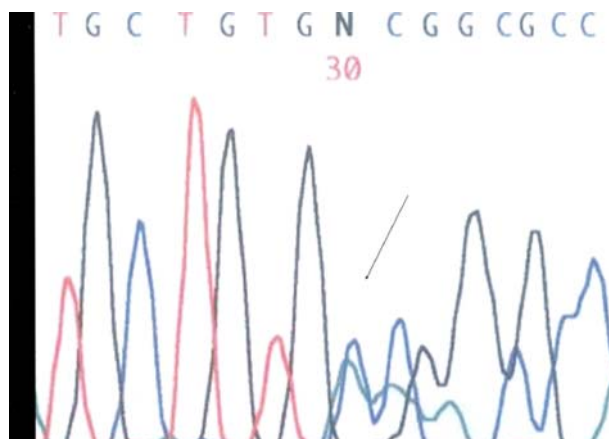


Fig. 3 – Electroforetograma obtido por *Genescan* de uma amostra, mostrando uma deleção de 2pb GG no codão 540 do gene *MLH1* (seta).

Análise Estatística

Na análise estatística, utilizou-se o teste do χ^2 para a comparação de proporções (STATA 8.0).

RESULTADOS

Em 54 dos 92 doentes que preenchiam os critérios clínicos para SL identificaram-se mutações nos genes analisados, tendo o diagnóstico sido inconclusivo nos restantes 38. A maioria das mutações identificadas localizou-se no *MLH1* (56%) e no *MSH2* (43%), e apenas 2% no *MSH6*. No *MLH1*, detectaram-se 11 mutações *nonsense*, 10 *missense*, 8 *frameshift* e uma grande deleção. No *MSH2*, detectaram-se 7 mutações *nonsense*, 6 *splicing*, 4 *missense*, 3 *frameshift* e 3 grandes deleções. A mutação do *MSH6* era de tipo *frameshift*.

Ao analisarmos os critérios que condicionaram a realização de diagnóstico genético verificamos que os doentes com mutações germinais identificadas pertenciam a famílias com CAI (n=15), CAII (n=26) e CAII sem CI (n=2) e, nos restantes 11 casos, eram preenchidos os CB. Assim, nos indivíduos afectados pertencentes a famílias com CAI detectaram-se mutações em 60%, com CAII em 62%, com CAII sem CI em 67% e com CB em 61% dos casos. Não se identificou nenhuma mutação germinal em doentes pertencentes a famílias com CAI sem CI, o que obteve significado estatístico ($p=0,015$) – quadro IV.

DISCUSSÃO

A SL é a doença autossómica dominante mais frequente associada ao desenvolvimento de CCR. O seu diagnóstico definitivo baseia-se na detecção de uma mutação patogénica nos genes de reparação do tipo *mismatch* do

Quadro IV – Número de mutações germinais identificadas de acordo com o critério clínico.

Critério Clínico	Nº Doentes c/Critério Clínico	Nº Doentes c/Mutação	% Doentes c/Mutação
CAI	25	15	60
CAI sem CI	4	0	0
CAII	42	26	62
CAII sem CI	3	2	67
CB	18	11	61

ADN, nomeadamente nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*⁵. Um indivíduo portador de mutação apresenta um risco de 70 a 80% de desenvolvimento de CCR durante a sua vida, podendo ainda desenvolver tumores com outras localizações, nomeadamente carcinomas do endométrio, ovário, intestino delgado, ureter, pélvis renal, estômago, vias biliares e pâncreas^{3,4,6}.

Mais de 90% das mutações descritas na SL localizam-se nos genes *MLH1* e *MSH2*⁵. A análise genética é um processo moroso, iniciando-se a pesquisa nestes genes, já que são os mais frequentemente envolvidos. Posteriormente, nos casos inconclusivos analisa-se o *MSH6*. Dada a ausência de *hot spots*, não há indicação para iniciar a pesquisa mutacional por determinadas regiões dos genes. Cerca de 50% das mutações que surgem no *MLH1* são *missense*, enquanto que a maioria das mutações que afetam o *MSH2* condicionam a interrupção prematura da leitura do exão, correspondendo a um códon *stop* e dão origem a uma proteína truncada¹⁵.

A análise genética tem dois objectivos: 1) a confirmação do diagnóstico numa família suspeita de SL que apresente características clínicas clássicas ou atípicas; 2) o diagnóstico de SL em familiares em risco. Se o familiar apresentar a mutação deverá ser incluído no programa de vigilância adequado, ou seja, realizar colonoscopia total anual com início aos 20-25 anos ou 10 anos antes do caso mais jovem de CCR na família, aplicando-se o critério que implicar uma idade menor. Se o familiar não tiver herdado a mutação, deve ser considerado como tendo um risco padrão e tem indicação para o programa de rastreio de CCR da população em geral. Sabe-se que nos indivíduos com SL a aplicação de um programa de vigilância reduz a incidência e a mortalidade por CCR, pelo que é extremamente importante identificar estas famílias⁷.

A maioria dos CCR no contexto da SL apresenta IMA, sendo este marcador utilizado para decisão acerca da realização de diagnóstico genético nos casos que não preenchem os CA¹⁶. Os microssatélites são regiões do genoma cuja função é desconhecida, em que se repetem pequenas sequências de ADN. Sabe-se que durante a replicação do

ADN estas regiões sofrem alterações, que resultam em contração ou alongamento da sua estrutura, o que se denomina instabilidade. Estes erros são normalmente reparados pelas proteínas do sistema de reparação tipo *mismatch* do ADN, pelo que quando há inactivação destas proteínas, a reparação não ocorre e observa-se instabilidade destas regiões. Trata-se, portanto, de um marcador de deficiência do sistema de repa-

ração do ADN. Na sua avaliação, analisam-se cinco marcadores de microssatélites, como foi determinado na reunião de Bethesda (D2S123, D5S346, D17S250, BAT-25 e BAT-26), no tecido tumoral e em tecido não-neoplásico. A IMA encontra-se presente em cerca de 90% dos CCR associados à SL e em 10-15% dos CCR esporádicos¹⁶.

Barnetson et al submetem a análise mutacional nos genes de reparação do tipo *mismatch* do ADN 870 doentes com diagnóstico recente de CCR, independentemente da sua história familiar e com idade inferior a 55 anos. Foi encontrada mutação em 38 casos, o que corresponde a uma taxa de detecção de mutações de 4%¹⁷. Quando se submete uma população com CCR, independentemente da história familiar, a estudo de IM e, posteriormente, a estudo genético apenas os doentes cujo CCR apresenta IMA, identificam-se mutações em 2 a 3,4% da população^{1,18,19}. Estes resultados devem questionar se a utilização de estudos genéticos apresenta uma adequada relação custo-eficácia como técnica de rastreio no diagnóstico de uma entidade com baixa incidência como é o caso da SL. Parece assim fundamentada a utilização de critérios clínicos, nomeadamente os CAI, os CAII e os CB na selecção dos casos a serem submetidos a estudo molecular.

Em 1991, o *International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer* definiu os CAI, que foram modificados em 1999 para incluir os tumores extra-cólicos. Os CB foram criados para identificar os indivíduos que deveriam ser submetidos a estudo de instabilidade microssatélites, como marcador intermediário para decisão acerca da realização de análise mutacional. Em 2002, os CB originais foram modificados com o objectivo de aumentar a sua acuidade diagnóstica. Ao contrário dos CA que consideram unicamente a história familiar oncológica, os CB contemplam também a história pessoal de neoplasias múltiplas e as características histológicas do CCR¹⁰.

No presente trabalho, ao aplicarmos os três critérios clínicos, encontramos mutações em 59% dos doentes, das quais 56% no *MLH1*, 43% no *MSH2* e 2% no *MSH6*. Na maioria dos trabalhos, a pesquisa de mutações em indiví-

duos afectados que cumprem pelo menos um dos CB e cujo CCR apresenta IMA resulta numa taxa de detecção de mutações de 59-61%^{20,21}. Quando os CA são aplicados, a taxa de detecção de mutações num dos genes reparadores do ADN varia entre 45 e 86%²²⁻²⁴. No entanto, considerando separadamente os CAI e CAII, a percentagem de mutações identificadas utilizando os CAI varia entre 40 e 80% e entre cinco e 50%, com os CAII²⁵. A ausência de preenchimento de pelo menos um dos CA está associada a uma taxa de detecção de mutações nos genes de reparação do ADN inferior a 16%²⁶.

Os resultados do presente trabalho estão de acordo com os dados da literatura, não tendo, porém, sido identificada uma diferença significativa entre a taxa de detecção de mutações utilizando os CAI ou os CAII (60% vs 62%). Verificamos que a ausência do critério de idade para os CAI torna muito reduzida a probabilidade de detecção de mutações, sendo que o mesmo já não se verifica para o CAII ($p=0,015$). Wijnen et al ao submeterem a diagnóstico genético famílias suspeitas de SL, verificaram que o diagnóstico de CCR numa idade jovem e a presença de todos os CA são factores preditivos de mutações nos genes *MLH1* e *MSH2*²⁷. Vários trabalhos demonstraram que o diagnóstico de CCR em idade inferior a 50 anos aumenta a probabilidade de um diagnóstico genético positivo, pelo que é incontornável a importância do critério de idade²⁷⁻²⁹.

Quando se aplicam os critérios clínicos, a ausência de identificação de mutações pode ser explicada pelo facto das actuais técnicas de estudo molecular não permitirem a sua detecção, pelo envolvimento na SL de genes que ainda não foram identificados, ou por se tratar de uma agregação esporádica de CCR. Verificou-se que num subgrupo de famílias com CA e diagnóstico genético inconclusivo não se encontram as características típicas da SL: o CCR surge numa média de idade mais avançada e a penetrância nos familiares em risco é inferior; o CCR não está tão frequentemente localizado no cólon direito, assim como não apresenta infiltrado linfocitário; os tumores extra-cólicos apresentam uma incidência menor e há uma maior frequência de adenomas do cólon²². Devemos considerar a possibilidade de, sob a designação de SL, estarmos a englobar diversas entidades, pelo que de forma precisa, ela deve ser aplicada a famílias com mutação germinal patogénica identificada num gene de reparação do ADN²². Enquanto não detivermos informação para caracterizar de forma mais adequada as famílias que cumpram os critérios clínicos mas que apresentem diagnóstico genético inconclusivo, estas devem ser manejadas de acordo com os protocolos recomendados para a SL.

CONCLUSÃO

A conjugação de diferentes critérios clínicos permitiu-nos identificar um número significativo de casos de SL, em base genética. Verificamos que a ausência do critério de idade nos CAI torna muito improvável a detecção de uma mutação germinal patogénica nos genes de reparação do ADN.

Seria importante a elaboração de critérios mais simples e uniformes que possibilitassem, de forma mais homogénea, a identificação de famílias com SL.

BIBLIOGRAFIA

1. AALTONEN LA, SALOVAARA R, KRISTO P et al: Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7
2. LYNCH HT, LANSPA S, SMYRK T et al: Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndromes I & II). Genetics, pathology, natural history and cancer control, Part I. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:143-60
3. WATSON P, LYNCH HT: Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-85
4. VASEN HFA, WIJNEN JT, MENKO FH et al: Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterol* 1996;110:1020-7
5. PAPADOULOS N, LINDBLOM A: Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mutat* 1997;10:89-99
6. SCAPOLI C, LEON M, SASSATELLI R et al: Genetic epidemiology of hereditary non-polyposis colorectal cancer syndromes in Modena, Italy: results of a complex segregation analysis. *Ann Hum Genet* 1994;58:275-295
7. JÄRVINEN H, AARNIO M, MUSTONEN H et al: Controlled 15-Year Trial on Screening for Colorectal Cancer in Families with Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterol* 2000;118:829-834
8. VASEN HF, MECKLIN JP, KHAN PM, LYNCH HT: The International Collaborative Group on Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer. *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-425
9. VASEN HF, WATSON P, MECKLIN JP, LYNCH HT: New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterol* 1999;116:1453-6
10. RODRIGUEZ-BIGAS MA, BOLAND CR, HAMILTON SR et al: A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda Guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62
11. AALTONEN LA, PELTOMÄKI P, MECKLIN JP et al: Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994;54:1645-8
12. NYSTROM-LAHTI M, Wu Y, MOISIO AL et al: DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1996;5:763-9

13. WU Y, NYSTROM-LAHTI M, OSINGA J et al: MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:269-278
14. WU Y, BERENDS M, MENSINK R et al: Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer-related Tumors Displaying Low Microsatellite Instability with *MSH6* Germline Mutations. *Am J Hum Genet* 1999;65:1291-8
15. PELTOMÄKI P, VASEN HF: Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Database and results of a collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterol* 1997;113:146-158
16. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR et al: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248-57
17. BARNETSON RA, TENESA A, FARRINGTON SM et al: Identification and Survival of Carriers of Mutations in DNA Mismatch-repair Genes in Colon Cancer. *N Engl J Med* 2006;354:2751-63
18. SALOVAARA R, LOUKOLA A, KRISTO P et al: Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 200;18(11):2193-200
19. HAMPEL H, FRANKEL W, MARTIN E et al: Screening for the Lynch Syndrome. *N Engl J Med* 2005;352:1851-60
20. TERDIMAN JP, GUM JR, CONRAD PG et al: Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterol* 2001;120:21-30
21. LAGERSTEDT RK, LIU T, VANDROVCOVA J et al: Lynch Syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99(4):291-9
22. JASS JR: Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006;12(31):4943-50
23. AALTONEN LA, PELTOMÄKI P, LEACH FS et al: Clues to the Pathogenesis of Familial Colorectal Cancer. *Science* 1993;260:812-6
24. LYNCH HT, LYNCH J: Lynch Syndrome: Genetics, natural history, genetic counselling and prevention. *J Clin Oncol* 2000;18:19S-31S
25. LYNCH H, CHAPELLE A: Hereditary Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-932
26. SYNGAL S, FOX EA, LI C et al: Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Implications for clinical predisposition testing. *JAMA* 1999;282(2):247-253
27. WIJNEN JT, VASEN HF, KHAN PM et al: Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med* 1998;339(8):511-8
28. PALMIROTTA R, MATERA S, CURIA MC et al: Correlations between phenotype and microsatellite instability in HNPCC: Implications for Genetic Testing. *Fam Cancer* 2004;3(2):117-121
29. RODRIGUEZ-MORANTA F, CASTELLS A, ANDREU M et al: Clinical Performance of original and Revised Bethesda Guidelines for the Identification of MSH2/MLH1 Gene Carriers in Patients with Newly Diagnosed Colorectal Cancer: Proposal of a New and Simpler Set of Recommendations. *Am J Gastroenterol* 2006; 101:1104-11



Instituto Português de Oncologia Francisco Gentil. Lisboa