



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS



CURSO DE LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LARISSA DE SOUSA SOARES

DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA LONGA DELEÇÃO
(c.348+33_*64+146del4285insTA) NO GENE *MUTYH* EM INDIVÍDUOS COM E
SEM HISTÓRICO DE CÂNCER COLORRETAL

PICOS-PI

2018

LARISSA DE SOUSA SOARES

**DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA LONGA DELEÇÃO
(c.348+33_*64+146del4285insTA) NO GENE *MUTYH* EM INDIVÍDUOS COM E
SEM HISTÓRICO DE CÂNCER COLORRETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí como requisito parcial para obtenção do aprovação no curso de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador (a): Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva.

PICOS-PI

2018

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca José Albano de Macêdo

S676d Soares, Larissa de Sousa.

Determinação da frequência da longa deleção (c.348+33_*64+146del4285insta) no gene *MUTYH* em indivíduos com e sem histórico de câncer colorretal / Larissa de Sousa Soares.– 2018.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (38 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.

Orientador(A): Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

1. Câncer Colorretal. 2. Síndrome de Lynch (SL). 3. Técnicas moleculares. I. Título.

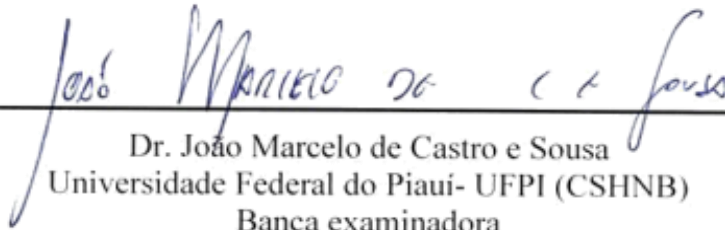
CDD 616.994

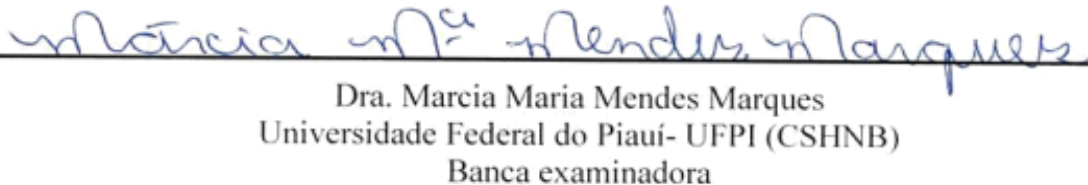
LARISSA DE SOUSA SOARES

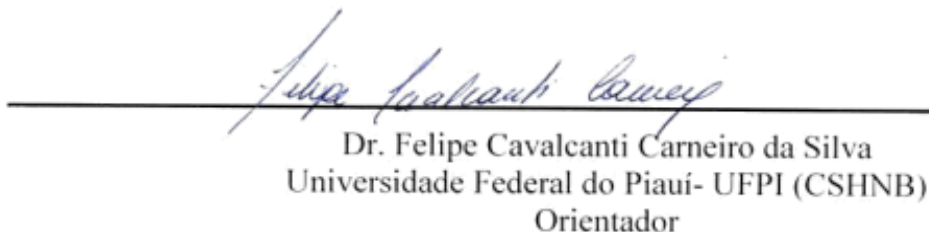
**DETERMINAÇÃO DA FREQUÊNCIA DA LONGA DELEÇÃO
(c.348+33_*64+146del4285insTA) NO GENE *MUTYH* EM INDIVÍDUOS COM E
SEM HISTÓRICO DE CÂNCER COLORRETAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade federal do Piauí,
Campus Helvídeo Nunes de Barros como requisito para obtenção do título de
Licenciado (a) em Ciências Biológicas.

COMISSÃO JULGADORA:


Dr. João Marcelo de Castro e Sousa
Universidade Federal do Piauí- UFPI (CSHNB)
Banca examinadora


Dra. Marcia Maria Mendes Marques
Universidade Federal do Piauí- UFPI (CSHNB)
Banca examinadora


Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva
Universidade Federal do Piauí- UFPI (CSHNB)
Orientador

DEDICATÓRIA

A Deus, que permitiu que tudo isso acontecesse na minha vida.

À minha Família (pais, irmão, avós, marido e tios) pelo amor, incentivo e apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar forças, saúde e muitas bênçãos nestes 4 anos e meio de curso, e durante toda a minha vida.

À minha família, por me ensinar os valores e princípios da vida, e principalmente, por serem meu alicerce, estando sempre ao meu lado, me incentivando e fazendo o possível para que este sonho se tornasse realidade.

Ao meu marido, Alex, por todo carinho, companheirismo e compreensão.

Ao meu Orientador, Dr. Felipe Silva e ao Dr. João Marcelo Sousa por toda confiança, incentivo, amizade e compreensão durante a minha jornada acadêmica.

A todo o corpo docente do curso de Ciências Biológicas da UFPI-CSHNB, pelos conhecimentos compartilhados.

Às minhas queridas companheiras do “vilas boas”, Karol e Edite, pelos momentos de amizade e boas risadas.

Às boas amizades feitas durante esses anos, em especial, aos meus colegas de turma, do laboratório de pesquisa I e da LAOH, que tornaram os momentos da vida acadêmica mais leve e agradáveis.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação, o meu muito obrigada.

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 8 |
| 2- REVISÃO DE LITERATURA | 10 |
| 2.1 Câncer colorretal | 10 |
| 2.1.1 Epidemiologia..... | 10 |
| 2.1.2 Fatores de risco | 10 |
| 2.1.3.1 Via de instabilidade cromossômica (CIN) ou sequência adenoma carcinoma. | 12 |
| 2.1.3.2 Via de instabilidade de microssatélites (MMR) | 12 |
| 2.2 Síndromes de câncer colorretal hereditário | 13 |
| 2.2.1 Síndrome de Lynch (SL) | 13 |
| 2.2.2 Polipose Adematosa Familiar (FAP)..... | 13 |
| 2.2.2.1 Polipose Associada a <i>MUTYH</i> (MAP)..... | 14 |
| 2.3 Alelos de risco..... | 16 |
| 2.4 Técnicas moleculares | 17 |
| 3- JUSTIFICAVA | 19 |
| 4- OBJETIVOS | 20 |
| 4.1- Objetivo geral | 20 |
| 4.2- Objetivos Específicos..... | 20 |
| 5- METODOLOGIA | 21 |
| 5.1- Amostras | 21 |
| 5.2- Extração de DNA..... | 21 |
| 4.2.1- Protocolo extração DNA DNeasy blood & tissue kit (Qiagen) | 21 |
| 5.2.2- Protocolo salting out de extração de DNA | 22 |
| 5.3- Quantificação de DNA | 22 |
| 5.4- Amplificação do DNA | 22 |

| | |
|--|-----------|
| 5.5- Eletroforese em gel de agarose | 23 |
| 6- RESULTADOS E DISCUSSÃO | 24 |
| 7- CONSIDERAÇÕES FINAIS | 28 |
| REFERÊNCIAS..... | 29 |
| ANEXO A- TABELAS DE DADOS DAS AMOSTRAS..... | 34 |

1- INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) representa um importante problema de saúde mundial, sendo um dos mais incidentes e prevalentes no Brasil e em todo o mundo (LÉON et al., 2017). É o terceiro câncer mais comum e a segunda causa de morte por câncer nos países desenvolvidos. No Brasil, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de intestino tem sido o terceiro mais frequente entre homens e o segundo em mulheres (FORMAN, et al., 2014; Ministério da Saúde, 2015; INCA, 2018).

Estima-se que 20-30% de todos os tumores colorretais apresentam algum componente hereditário, incluindo-se a genes de baixa penetrância e com herança multifatorial. *MUTYH* é um gene de reparo por excisão de bases que detecta e protege o DNA contra dano oxidativo. Indivíduos com mutações germinativas em ambos os alelos, se são homozigotos ou heterozigotos compostos, desenvolvem polipose associada a *MUTYH* (MAP), uma doença autossômica recessiva com risco substancialmente aumentado de desenvolver câncer colorretal (WIN et al., 2014).

O entendimento da base genética dessa doença, mesmo não estando completo, melhorou as estratégias de rastreamento e prevenção, e poderá também melhorar as opções de tratamento. Mutações em *MUTYH* ocasionam um fenótipo semelhante a Polipose Adenomatosa Atenuada. Esta síndrome é caracterizada por um quadro mais brando das características desenvolvidas na Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), doença hereditária marcada pelo surgimento de centenas a milhares de pólipos adenomatosos colorretais durante a segunda ou terceira década de vida. (BEGGS e HODGSON, 2008).

A MAP difere do fenótipo clínico da polipose clássica, pois apesar de o risco de desenvolver câncer colorretal ser em torno de 100%, os pacientes tendem a desenvolver polipose mais tardiamente (30-50 anos de idade), desenvolvem um menor número de pólipos (SAMPSON et al., 2005). Além disso, diferentemente do que ocorre com mutações no gene *APC* (que dão origem a FAP), a herança por mutação em *MUTYH* é autossômica recessiva, ou seja, para que o fenótipo se manifeste duas cópias alteradas de *MUTYH* devem ser herdadas (mutações bialélicas) (BEGGS e HODGSON, 2008).

O gene *MUTYH* está localizado em 1p32-34, apresenta 16 éxons e codifica uma proteína de 535 aminoácidos que atua no reparo de DNA por excisão de base (SAMPSON et al. 2005). O produto do gene *MUTYH* é uma DNA glicosilase que juntamente com os produtos dos genes *OGGI* e *MTH1* realizam o reparo de excisão de bases danificadas do DNA. No processo normal de metabolismo aeróbico, as formas 8-dihydro-8-oxoguanina (8-oxoG) geradas por danos oxidativos ao DNA pareiam-se rapidamente com adenina. A proteína *MUTYH* age removendo da fita de DNA a base adenina mal pareada a 8-oxo-guanina. Este pareamento errôneo, caso não seja reparado, levará à formação de mutações por transversões de G:C para T:A (BEGGS e HODGSON 2008).

As variantes mais patogênicas de *MUTYH* são variantes missenses e apenas uma minoria consiste em locais de splicing ou truncamento. Neste gene, foram identificados dois *hotspots*, p.Tyr179Cys (exon 7) e p.Gly396Asp (exon 13) que são prevalentes em populações de origem europeia e são responsáveis por cerca de 80% de todos os alelos mutantes relatados. Na população brasileira, um artigo publicado com pacientes com fenótipos clínicos de MAP, FAP e síndrome de Lynch identificou 6,6% (4/60) dos pacientes com estas duas mutações de ponto de acesso em um estado bialélico (PITROSKI et al., 2011; TORREZAN et al., 2013).

Até 2011, não havia nenhuma duplicação ou deleções genômicas descrita neste gene em qualquer população. Torrezan et al. (2011) identificaram e caracterizaram o primeiro grande rearranjo genômico descrito para *MUTYH*. Esta alteração é uma deleção que envolve os éxons 4 a 16 deste gene, e foi identificada em homozigose em um paciente através de PCR multiplex e CGH-array. No mesmo período um estudo independente realizado por um grupo francês identificou este mesmo rearranjo em um de seus pacientes com polipose (ROULEAU et al., 2011).

Além dessas variantes já relatadas, aproximadamente 300 alterações foram descritas em *MUTYH*, sendo que cerca de 80 delas são comprovadamente mutações de susceptibilidade a adenomas e carcinomas colorretais (LOVD Database). Estudar estas alterações na população piauiense é importante para entender melhor a alta incidência deste tipo de câncer no estado. Assim, quanto mais alelos forem identificados e um maior espectro de mutações for encontrado, mais eficiente será o rastreamento e aconselhamento genético dos pacientes.

2- REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Câncer colorretal

2.1.1 Epidemiologia

O CCR é considerado um grande problema de saúde pública no mundo por ser o terceiro tipo de câncer mais comum a nível global, com incidência de 1,4 milhão de casos, situando-se após os cânceres de pulmão e mama. CCR é a quarta causa de óbito por câncer no mundo e o segundo tipo de câncer mais comum nos países ocidentais. No Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais frequente em homens correspondendo cerca de 10% dos casos, e o segundo em mulheres com 9,2%. Estima-se que no biênio 2018-2019 no Brasil, ocorrerão, 17.380 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 18.980 em mulheres para cada ano. (DE MENESES et al., 2016; INCA, 2018).

O CCR costuma ser considerado uma doença mais frequente em pessoas idosas, onde na maioria das vezes é diagnosticada durante a quinta e sexta década de vida, com maior prevalência em homens. Em cerca de 0,8-14% dos pacientes, o CCR é diagnosticado antes dos 40 anos. Nos últimos anos tem-se observado um crescimento na incidência de CCR em pacientes com idades entre 20 e 34 anos e também entre pessoas com idade de 35 a 49 anos (CAMPOS et al., 2017).

2.1.2 Fatores de risco

O câncer colorretal é determinado por fatores hereditários e extrínsecos, no qual, entre os principais estão: o tabagismo, sedentarismo, excesso de bebidas alcoólicas e uma dieta alimentar baseada ingestão de gordura animal e pobre em fibras vegetais. As mutações herdadas também são consideradas um fator de risco inicial importante, no qual o indivíduo nasce com defeitos genéticos e tem os primeiros passos para o desenvolvimento da carcinogênese, o que resulta em um aumento do risco de tumores e

diminui o tempo de aparecimento dos primeiros sintomas (ROSSI et al. 2009; ERRANTE, 2016).

Com base nos critérios clínicos os carcinomas colorretais podem ser classificados em: (1) câncer esporádico, representado mais de 75% dos casos de carcinomas colorretais, sendo caracterizado pelo aparecimento esporádico, sem evidências de padrões ou síndromes de herança familiar e acometendo pessoas com mais de 60 anos, (2) câncer colorretal hereditário sem polipose, responsável por cerca de 5-10% dos casos, sendo o câncer mais comum de predisposição hereditária e tendo como causa principal mutação nos genes de reparo do DNA, localizados nos cromossomos 2, 3 e 7, e (3) tumores colorretais que ocorrem na polipose adenomatosa familiar (FAP), síndrome de predisposição hereditária bem definida, a qual consta de menos de 1% dos casos de câncer colorretais (LASSANCE et al. 2012; SILVA e ERRANTE, 2016).

2.1.3 Carcinogênese colorretal

A carcinogênese é definida como um processo em múltiplas etapas decorrente do acúmulo de várias mutações, tanto a nível fenotípico como genético (ROBBINS; COTRAN, 2010). Os primeiros passos para sua compreensão foram realizados com estudos de câncer colorretal, o qual se desenvolve por alterações gradativas de modificações genéticas no epitélio intestinal que podem provocar mudanças histológicas e moleculares que levam a uma sequência definida de múltiplas etapas conhecida como “sequência adenoma-carcinoma”. Através da análise da variação gênica nesta sequência, verificou-se que ocorre uma série de mutações em genes que expressam proteínas com ação sobre o ciclo celular. Observando as diferenças clinicopatológicas e genéticas do CCR, sugeriu-se a existência de outras vias carcinogênicas e, atualmente, os modelos genéticos que mais se destacam são: via da instabilidade cromossômica ou via supressora, via de instabilidade de microssatélites ou via mutadora. (PINHO, 2008; PITROSKI, 2010; SOUZA et al., 2014).

2.1.3.1 Via de instabilidade cromossômica (CIN) ou sequência adenoma carcinoma.

É verificada em 65-70% dos casos de CCR esporádicos e na Polipose Adematosa Familiar (FAP). No primeiro modelo descrito, para a sequência adenoma-carcinoma, o processo de alterações moleculares de sequência estabelecido, inicia-se pela inativação do gene APC desregulando o crescimento celular, causando a formação de um adenoma a partir da mucosa cólica normal, seguindo com a inativação do oncogene KRAS, que é responsável pela progressão do adenoma. Posteriormente, há a deleção do gene supressor de tumor DCC (deleção em carcinoma colorretal) e outros genes localizados no braço longo do cromossomo 18, e encerra com a perda da região 17p, na qual encontra-se o gene TP53 (LIMA et al., 2006; PITROSKI, 2010; SOUZA, 2014; POPOUTCHI, 2016; HOBBS; COTRAN, 2010; SOARES 2016).

2.1.3.2 Via de instabilidade de microssatélites (MMR)

É um das vias mais comuns em pacientes com CCR e é considerada um fenômeno hipermutável, caracterizado por pequenas deleções de 1 a 5 nucleotídeos no DNA do tumor. A deleção de microssatélite possui dois mecanismos que levam a um defeito nas proteínas de reparo. Na primeira, ocorre mutações germinativas nos genes de reparo do DNA (Mismatch Repair- MMR), o que leva erros no pareamento de nucleotídeos durante a replicação, resultando em deficiência nas proteínas de reparo do DNA. Este mecanismo é encontrado em 90% dos pacientes com tumores associados à Síndrome de Lynch. O segundo mecanismo, corresponde a um silenciamento dos genes *MMR* por hipermetilação, usualmente no gene *MLH1*, um dos mais frequentemente observado no câncer esporádico (PITROSKI, 2010; SILVA, 2011; POPOUTCHI, 2016; SOARES, 2016).

2.2 Síndromes de câncer colorretal hereditário

As síndromes hereditárias associadas ao CCR correspondem a cerca de 10% dos casos e ocorrem principalmente devido a mutação germinativa em um gene de predisposição ao CCR, onde os portadores herdam uma mutação deletéria de seus pais. São condições hereditárias frequentemente associadas ao CCR: o câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC), também denominada síndrome de Lynch e a polipose adenomatosa familiar (FAP), Polipose associada ao *MUTYH* (MAP), entre outras (VALADÃO et al. 2008; SCHNEIDER, 2015).

2.2.1 Síndrome de Lynch (SL)

A Síndrome de Lynch (SL) é uma síndrome hereditária autossômica dominante, associada a mutações em genes de reparo do DNA *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2* de células germinativas, representando a forma mais comum de CCR hereditário correspondendo cerca de 3% de todos os casos de CCR. Alterações nesses genes causam instabilidade genômica nos microssatélites o que resulta no aparecimento de tumor. Os indivíduos portadores da predisposição genética apresentam um risco de desenvolvimento de câncer no endométrio em torno de 30 a 70% e de CCR de 70% a 80%. Outros tumores associados à SL são: trato urinário (8,4%), ovário (6,7%), estômago (5,8%), intestino delgado (4,3%), trato hepato-biliar e pancreático (4,1%), e cérebro (2,1%). Entre as características de Lynch, está o aparecimento precoce de tumores em idade média de 44 anos, com preferência para o lado direito do cólon em 60% a 80% dos casos, cursando com lesões sincrônicas ou metacrônicas em 45% das vezes (ROSSI et al., 2009; PITOSKI, 2010; PINHEIRO, 2014). Em aproximadamente, 80% dos casos, as mutações ocorrem nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, que compõem um dos sistemas de reparo do DNA (NASCIMENTO, 2017).

2.2.2 Polipose Adematosa Familiar (FAP)

A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) é uma doença hereditária de caráter autossômico dominante, igualmente distribuída entre os sexos. Origina-se, principalmente, a partir da mutação na linhagem de células germinativas no gene da Polipose Adenomatosa Coli (*APC*) situado no braço longo do cromossomo 5q21, resultando em formação de centenas de pólipos colorretais. A principal característica clínica de FAP é a evolução para câncer colorretal em quase 100% dos casos, geralmente antes dos 40 anos de idade, se a cirurgia não for realizada (LEAL et al., 2008).

Embora esses tumores benignos não sejam individualmente ameaçadores da vida, seu grande número garante que irão avançar para lesões invasivas. Além disso, muitas vezes desenvolvem manifestações extracolônias, incluindo lesões da retina, osteomas, tumores desmóides da pele e tumores cerebrais (KINZLER & VOGELSTEIN 1996).

Em 2002, uma nova entidade foi descrita em casos de pacientes com polipose adenomatosa negativos para o gene *APC*, a polipose conhecida como *MUTYH* (MAP) (POSWAR, 2010). A MAP é causada por mutações germinativas no gene *MUTYH*, (Homólogo humano MutY), também conhecido como o gene *MUTYH*, que está mutado na ausência de mutações germinativas no gene *APC*. (BEGGS & HODGSON 2008).

2.2.2.1 Polipose Associada a *MUTYH* (MAP)

A MAP, descrita pela primeira vez em 2002, é uma síndrome autossômica recessiva de polipose colônia causada por mutações germinativas bialélicas no gene *MUTYH*. Pacientes com MAP apresentam características clínicas similares aos indivíduos com polipose adematosa familiar atenuada (AFAP) e em alguns casos, a polipose adematosa familiar clássica (FAP). A análise molecular do gene de indivíduos da Europa Ocidental e América do Norte identificou que duas mutações, Y179C e G396D que são mais frequentes, correspondendo a 80% das mutações encontradas na síndrome. Aproximadamente 1% de todos os pacientes com CCR apresentam alteração em *MUTYH* e mais de um terço desses casos, pode vir a desenvolver CCR na ausência

de múltiplos adenomas, o que dificulta o diagnóstico clínico da síndrome (PITROSKI et al. 2010).

A proteína *MUTYH* faz parte do sistema de reparo do DNA por excisão de bases (BER), que repara as mutações provocadas por espécies reativas de oxigênio formadas durante o metabolismo anaeróbio. O modelo de carcinogênese associado à MAP envolve a hipermutabilidade genética, em especial do gene *APC*, resultando numa síndrome caracterizado por uma idade de desenvolvimento de carcinoma do cólon e reto (CCR), em média, 10 anos mais tardia do que na polipose adenomatosa familiar (FAPc) associada ao gene *APC*, um fenótipo cólico muito heterogêneo que pode variar entre a presença de apenas três a mais de 100 adenomas (com conseqüente sobreposição fenotípica com a FAPc) e uma elevada probabilidade de desenvolvimento de CCR (DE FERRÃO et al., 2007).

As espécies reativas de oxigênio geradas durante o metabolismo aeróbico, representam uma potente fonte de dano do DNA. Notavelmente o produto de oxidação 8-oxoG é estável e prontamente com desvios de adenina (em vez de citosina). Independente de reparo leva G-C para T-A, uma transversão na próxima rodada de replicação de DNA. *MUTYH* é uma glicosilase de DNA que desempenha um papel fundamental em BER de 8-oxoG:A (e G:A) em desajuste, removendo a adenina incompatível (SAMPSON et al., 2005).

A enzima MYH glicosilase, é codificada pelo gene *MUTYH*, está localizado no cromossomo 1p (1p32.1-p34.3). O gene *MUTYH* é composto por 16 exons e 15 introns, o qual poderá originar transcritos diferentes traduzidos em polipeptídeos de 521 a 549 aminoácidos (CAPELA 2012).

Em contraste com as variantes patogênicas de *APC*, que resultam principalmente em uma proteína truncada ou ausente, a maioria das variantes patogênicas de *MUTYH*, são variantes do tipo missense e apenas uma minoria consiste em sítio de splicing e variantes de códon de parada. As duas mutações de troca de bases p.Tyr179Cys (exon 7) e p.Gly396Asp (exon 13), são prevalentes em populações de origem europeia, provavelmente devido a um efeito fundador (TORREZAN, 2011).

Em um trabalho realizado por Torrezan et al., 2011 foi realizada a caracterização de uma grande deleção de *MUTYH* detectado em um paciente com MAP. Os resultados mostraram que ele apresentava deleção homozigótica envolvendo os exons 4 a 16

detectados e mapeados por PCR, aCGH e sequenciamento. Os pontos de quebra foram sequenciados e a análise da sequência de junção permitiu postular que a junção de extremidades não homólogas (NHEJ) é o mecanismo mais provável responsável pela deleção, uma vez que uma sequência de inserção de 2 pb é observada na junção de quebra. Este processo de reparo envolve a quebra de fita dupla de DNA seguido de junção de extremidade na ausência de extensa homologia de sequência, e está associado com pequenas inserções nos locais de junção e com trechos muito curtos de identidade de sequência (alguns pb) entre as duas extremidades das junções. A análise dos pontos de quebra envolvendo as sequências revelou a presença de uma sequência AluJr adjacente ao ponto de quebra distal e a existência de motifs que promovem recombinação / deleção, tais como trinucleídeos GAG e GCS.

Em populações de origem europeia, as mutações missenses c.536A>G;p.Tyr179Cys e c.1187G>A;p.Gly396Asp são, de longe, as principais variantes causadoras dos tumores colorretais, representando 50-82% das mutações *MUTYH* identificadas em pacientes com MAP. Além disso, diferentes variantes têm um papel maior em outras populações, apontando diferenças étnicas e geográficas em mutações do *MUTYH* (ARETZ et al., 2014).

2.3 Alelos de risco

Polimorfismos genéticos são alterações genéticas que podem ocorrer nas sequências codificadoras e não codificadoras, causando alterações qualitativas e/ou quantitativas em uma proteína (LIMA et al., 2006). Os GWAS, são estudos de associações de larga escala genômica e têm demonstrado que parte do risco genético ocorre devido a variantes comuns de baixa penetrância, como o polimorfismo de nucleotídeos únicos (SNPs). Embora a suscetibilidade genética ao CCR seja conhecida, o mapeamento dos alelos de predisposição tem sido desafiador, uma vez que, sete GWAS e três metanálises identificaram cerca de 20 loci independentes associados com a suscetibilidade ao CCR (Tabela 1) (GOMY, 2013).

TABELA 1- Dados dos GWAS em CCR com os SNPs identificados.

| SNP ID | Locus/ Cromossomo | Localização/Genes mais próximos | População | Frequência do alelo de risco em controles | OR alélico (IC95%) | Referência |
|-------------|----------------------|---|-----------------------------|--|-----------------------|-----------------------|
| rs6983267* | 8q24.21 | intergênica/MYC | Europeia (RU) | 51% | 1.21 (1,15 – 1,27) | Tomlinson et al. 2007 |
| rs4939827* | 18q21.1 | SMAD7 (intron 3) | Europeia (RU) | 47-52% | 1.18 (1,12 – 1,23) | Broderick et al. 2007 |
| rs4779584* | 15q13.3 | intergênica/SCG5, GREM1 | Europeia (RU) | 18% | 1.26 (1,19 – 1,34) | Jaeger et al. 2008 |
| rs16892766* | 8q23.3 | intergênica/EIF3H | Europeia (RU) | 7% | 1.25 (1,19 – 1,32) | Tomlinson et al. 2008 |
| rs10795668* | 10p14 | Intergênica/BC031880 | Europeia (RU) | 67% | 1.12 (1,10 – 1,16) | Tomlinson et al. 2008 |
| rs4444235* | 14q22.2 | Intergênica/BMP4 | Europeia (RU) | 46% | 1.11 (1,08 – 1,15) | Houlston et al., 2008 |
| rs9929218* | 16q22.1 | CDH1 (intron) | Europeia (RU) /Canadá | 71% | 1.10 (1,06 – 1,12) | Houlston et al., 2008 |
| rs10411210* | 19q13.1 | RHPN2 (intron) | Europeia (RU) /Canadá | 10% | 1.15 (1,10 – 1,20) | Houlston et al., 2008 |
| rs961253* | 20p12.3 | Intergênica/BMP2 | Europeia (RU) /Canadá | 36% | 1.12 (1,08 – 1,16) | Houlston et al., 2008 |
| rs3802842* | 11q23.1 | Intergênica/FLJ45803 | RU/Canadá/ Israel/Japão | 29% | 1.12 (1,07 – 1,17) | Tenesa et al. 2008 |
| rs6691170 | 1q41 | 254Kb upstream DUSP10 | Europeia (RU, Finlândia) | 34-37% | 1,06 (1,03- 1,09) | Houlston et al. 2010 |
| rs6687758 | 1q41 | 125Kb upstream DUSP10 | Europeia (RU, Finlândia) | 19-26% | 1,09 (1,06- 1,12) | Houlston et al. 2010 |
| rs10936599 | 3q26.2 | MYNN | Europeia (RU, Finlândia) | 24-28% | 0,93 (0,91- 0,96) | Houlston et al. 2010 |
| rs7136702 | 12q13.13 | telomérico ao LARP4 e proximal ao DIP2 | Europeia (RU, Finlândia) | 29-37% | 1,06 (1,04- 1,08) | Houlston et al. 2010 |
| rs11169552 | 1213.3 | telomérico ao DIP2B e proximal ao ATF1 | Europeia (RU, Finlândia) | 26-41% | 0,92 (0,90- 0,95) | Houlston et al. 2010 |
| rs4925386 | 20q13.33 | LAMA5 | Europeia (RU, Finlândia) | 30-33% | 0,93 (0,91- 0,95) | Houlston et al. 2010 |
| rs1957636 | 14q22.2 | BMP4 | Europeia | n.i. | 1,08 (1,06 – 1,11) | Tomlinson et al. 2011 |
| rs4813802 | 20p12.3 | BMP2 | Europeia | n.i. | 1,09 (1,06 – 1,12) | Tomlinson et al. 2011 |
| rs7315438 | 12 | MED13L | EUA/Canadá | 42% | 0,90 (0,87 – 0,94) | Peters et al. 2012 |
| rs275454 | 5 | LOC729434/POLS | EUA/Canadá | 37% | 1,08 (1,04 – 1,13) | Peters et al. 2012 |
| rs2853668 | 5 | TERT-CLPTM1L | EUA/Canadá | 25% | 0,91 (0,87 – 0,96) | Peters et al. 2012 |
| rs2373859 | 2 | SLC8A1 | EUA/Canadá | 35% | 0,93 (0,9 – 0,97) | Peters et al. 2012 |
| rs1525461 | 7 | LOC643308/TPK1 | EUA/Canadá | 19% | 1,09 (1,04 – 1,14) | Peters et al. 2012 |
| rs1321311 | 6p21 | CDKN1A | Europeia/ Japonesa | n.i. | 1,10 (1,07- 1,13) | Dunlop et al. 2012a |
| rs3824999 | 11q13.4 | POLD3 (intron 9) | Europeia/ Japonesa | n.i. | 1,08 (1,05 – 1,10) | Dunlop et al. 2012a |
| rs5934683 | Xp22.2 | entre GPR143 e SHROOM2 | Europeia/ Japonesa | n.i. | 1,07 (1,04 – 1,10) | Dunlop et al. 2012a |

* SNPs avaliados neste estudo; OR = odds ratio; n.i. = não informado; RU = Reino Unido

Retirado de GOMY, 2013.

2.4 Técnicas moleculares

A Reação em cadeia de Polimerase (PCR) é um método de clonagem do DNA que aumenta a eficiência da pesquisa do DNA recombinante e é o método de escolha

para muitas aplicações como: genética humana, biologia molecular, conservação, ciências forense e evolução. Por meio de algumas de uma série de sequências *in vitro* a PCR realiza a cópia de uma sequência específica de DNA e pode amplificar a sequência de DNA-alvo que inicialmente estão presentes em uma quantidade muito pequena em outras moléculas DNA (KLUG et al., 2010).

Para a realização da PCR é necessário que se tenha a sequência nucleotídica do DNA-alvo. A partir das informações contidas nesta sequência, são sintetizados dois oligonucleotídicos iniciadores: um complementar à extremidade 5' e ou outro complementar à extremidade 3' do DNA alvo. Quando os iniciadores são adicionados a uma sequência de DNA que foi convertido em fita simples, eles ligam-se aos nucleotídeos complementares que flanqueiam a sequência a ser clonada. Posteriormente, é adicionada a DNA-polimerase termoestável, que se realiza a síntese de uma segunda fita do DNA-alvo. Ciclos de repetição do processo, podem amplificar rapidamente a sequência de DNA original mais de um milhão de vezes. A grande quantidade de uma sequência específica pode ter inúmeras finalidades, entre as quais estão: o sequenciamento de DNA, o diagnóstico clínico e a triagem genética. Além disso, a PCR é ágil, o planejamento dos iniciadores é feito automaticamente por *software* e a síntese dos oligonucleotídeos também é rápida e econômica, e as amostras de DNA que foram degradadas ou contaminadas podem ser recuperadas e amplificadas (KLUG et al., 2010).

O padrão ouro para avaliação de mutações nos genes *APC* e *MUTYH* tem sido o sequenciamento de todos os éxons codificantes e limites íntron-éxon, que torna capaz a identificação de variações de ponto de pequenas inserções e deleções com alta sensibilidade (TORREZAN, 2014). Entretanto, este não é acessível a todos os centros, pois é um método de alto custo, o que inviabiliza sua utilização em larga escala (VALADÃO et al., 2008).

Os chamados sequenciadores de nova geração (NGS) fornecem uma genotipagem mais ampla, estendendo a área de cobertura de um determinado gene de forma a possibilitar simultaneamente, a cobertura de outros genes que estejam relacionados a doença. Estes sequenciadores apresentam uma maior velocidade na obtenção de informações por um menor custo. Uma outra vantagem dos NGS, é que eles propiciam, em uma única reação, a avaliação de toda a região codificadora de um gene e até mesmo de vários genes ao mesmo tempo (CARVALHO, 2016).

3- JUSTIFICAVA

Inúmeros avanços têm sido realizados nos últimos anos para melhor caracterização molecular da Polipose Adenomatosa associada ao gene *MUTYH* que, aliados a um aprimoramento contínuo dos métodos de estudo, têm fornecido uma grande variedade de alternativas para detecção de alteração nesse gene. Dessa forma, os testes genéticos para mutações germinativas no gene *MUTYH*, além de permitirem o diagnóstico definitivo das famílias com MAP, são de grande importância para o aconselhamento, vigilância e manejo de pacientes de alto risco, visto que a identificação de mutações pode direcionar o melhor tratamento e intensificar a vigilância dos pacientes através de colonoscopia.

4- OBJETIVOS

4.1- Objetivo geral

- Determinar a frequência da longa deleção c.348+33_*64+146del4285insTA no gene *MUTYH* em indivíduos com e sem histórico de câncer colorretal.

4.2- Objetivos específicos

- Testar duas técnicas de extração de DNA, protocolo de extração de DNA DNeasy blood & Tissue Kit (QUIAGEN) e protocolo salting out de extração.
- Determinar a frequência de mutação em indivíduos saudáveis sem histórico de câncer colorretal, utilizando sangue e saliva, bem como fazer uma análise comparativa entre esses dois insumos.
- Determinar a frequência da longa deleção em pacientes com câncer colorretal com diagnóstico clínico para a Síndrome de Lynch sem mutações nos genes de reparo de DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*).

5- METODOLOGIA

5.1- Amostras

O teste foi oferecido para 54 indivíduos saudáveis sem histórico de CCR (grupo controle) e 71 indivíduos com CCR sem polipose atenuada com diagnóstico clínico de Síndrome de Lynch. Foram coletadas na Universidade Federal- CSHNB do Piauí, 15 amostras de sangue periférico e 39 de saliva de diferentes indivíduos saudáveis sem histórico de câncer, para o grupo controle. As 71 amostras de indivíduos com CCR foram coletadas a partir de sangue periférico de pacientes do AC Camargo Cancer Center. Todas as amostras foram coletadas com o consentimento prévio dos indivíduos. As amostras de sangue foram coletadas a partir de punção venosa e armazenadas em tubos de ependorff contendo anticoagulante (EDTA). As amostras de saliva também foram armazenadas em tubos de ependorff até a extração.

5.2- Extração de DNA

Para a extração de DNA de leucócitos, foi utilizado o kit de extração DNeasy blood & Tissue Kit (Qiagen). A extração de DNA de saliva, foi feito com a utilização de dois protocolos: DNeasy blood & Tissue Kit (Qiagen) e Salting out.

4.2.1- Protocolo extração DNA DNeasy blood & tissue kit (Qiagen)

Em 100ul de sangue ou saliva adicionou-se 10ul de proteinase K e ajustou-se o volume para 220ul com PBS. Acrescentando 200 ul de AL e incubando por 56°C durante 10 min. Em seguida, colocou-se 200ul de álcool etanol absoluto, pipetou-se a mistura nos tubos com coluna e centrifuga a 8000RPM por 1 min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e adicionou-se 500ul de tampão AW1. Centrifugou-se novamente a 8000RPM por 1 min. Novamente, o líquido flutuante foi descartado, 500ul de tampão AW2 foi acrescentado e então centrifugou-se a mistura a 14000RPM durante

3 min. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a coluna transferida para um novo tubo. Então foram adicionados 200ul de AE no centro da coluna e incubada-se por 1 minuto em temperatura ambiente. A mistura foi novamente centrifugada a 800RPM por um minuto e a coluna descartada.

5.2.2- Protocolo salting out de extração de DNA

Em um tubo de ependoff foram colocadas 100ul de saliva, 200ul de tampão de lise, 20ul de proteinase K e a mistura incubada por 56°C durante 10 min. Em seguida, adicionou-se 100ul de NaCl 5M, centrifugou-se durante 5 minutos a 14000RPM e transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo. Posteriormente, foram acrescentados 800ul de etanol absoluto e então, centrifugou-se a 14000RPM por 2 minutos. Repetiu-se o procedimento com etanol a 70%. O sobrenadante foi descartado e então, esperou-se 5 minutos, até que o mesmo secasse. Posteriormente, adiciona-se 50ul de H₂O.

5.3- Quantificação de DNA

Após a extração do DNA, foi realizada a sua quantificação para assegurar a qualidade da mesma. Foi utilizado o Quantus Fluorometer (Quantus One dsDNA System). A quantificação foi feita a partir de 2ul da amostra de DNA extraído com a adição de 198ul de corante (Quanti Fluor one dsDNA Dye).

5.4- Amplificação do DNA

Para avaliar a existência da mutação nos indivíduos da amostra foi realizada uma Reação em Cadeia de Polimerase- PCR. Para a reação foi utilizado aproximadamente 10 ng de molde de DNA e 1ul de cada primer (Forward e Reverse) a 5nM num volume final de 20 ul de Promega qPCR Master Mix (Promega, USA). Os primers foram desenhados para cobrir a região da deleção de 4285pb que envolve os exons 4 a 16 do gene *MUTYH*, amplificando os exons- 2-16, o que corresponde a 5889pb. No quadro 1

estão descritos os primers utilizados para a identificação da existência ou não das mutações. A reação ocorreu com sob as seguintes condições: 95°C/3 min, seguido de 40 ciclos a 95°C por 30 seg, 60°C por 1 min e 72°C por 2min e uma extensão final de 72°C por 5 min.

Quadro 1- Sequência do primer desenhado.

| | Sequência do Primer | Mutação/Interesse |
|---------|------------------------------------|--------------------------|
| Forward | 5' –GGT GGA TGA GAG GGA GAT AG- 3' | Deleção Exon 4-16 |
| Reverse | 5' –CTT CTC CTG TGC TTC CTC TC- 3' | |

5.5- Eletroforese em gel de agarose

Todos os produtos de PCR amplificados foram revelados e analisados em gel de agarose 1% a partir de uma eletroforese. Para a reação foram utilizados 5ul do produto da PCR com 2ul de corante Diamond dye. Todas as amostras foram aplicadas no gel e a corrida ocorreu a 88V e 59mA.

6- RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da quantificação do DNA foi possível observar que todas as amostras do grupo controle, extraídas obtiveram uma quantidade significativa de DNA. Entretanto, com a quantificação do DNA utilizando o fluorômetro Quantus (Promega, USA), observou-se que as amostras extraídas com o método salting out apresentaram uma maior quantidade de DNA, quando comparadas com as amostras feitas com o protocolo de extração do DNeasy blood & Tissue Kit (Anexo A). Entretanto, essas amostras apresentaram maior fragmentação de DNA, a qual foi verificada pela presença de arrastes (*Smear*) na eletroforese. As amostras em que o DNA foi extraído a partir do Kit, todas apresentaram uma boa amplificação do DNA, mesmo com as amostras que possuíam uma baixa quantidade de DNA (1ng/μl) (Figura 1). As amostras que foram extraídas por salting out, mas que ficaram impuras (formação de um precipitado branco) passaram por um processo de repurificação pelo kit, e então foi realizada uma nova eletroforese.

Todas as amostras de DNA foram amplificadas usando o primer para a grande deleção, porém o fragmento esperado de 1606pb não apareceu em nenhuma das 125 amostras (Figura 2). Como controle da reação de PCR, foi realizada uma amplificação do exon 7 do gene *MUTYH* para verificar a qualidade do DNA extraído e também a eficiência da reação. Verificou-se que todas as amostras de DNA extraídas, apresentaram produto de amplificação do éxon em questão (Figura 3). Todas as amostras de pacientes com CCR foram extraídas seguindo o protocolo do kit, e obtiveram uma quantidade considerada boa de ngDNA/ul .

Figura 1- Eletroforese das amostras de DNA utilizando os dois métodos de extração.

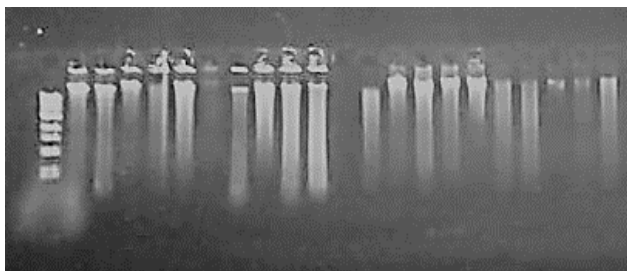


Figura 2- Amplificação da grande deleção do gene *MUTYH* de 44 das 54 amostras do grupo após PCR e eletroforese.

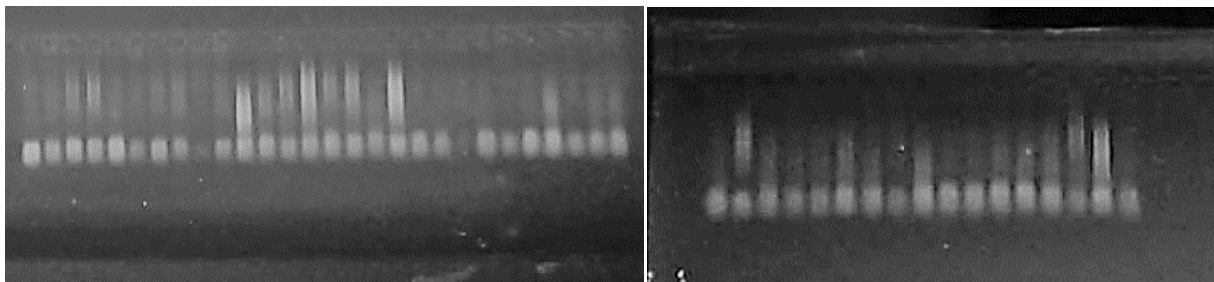
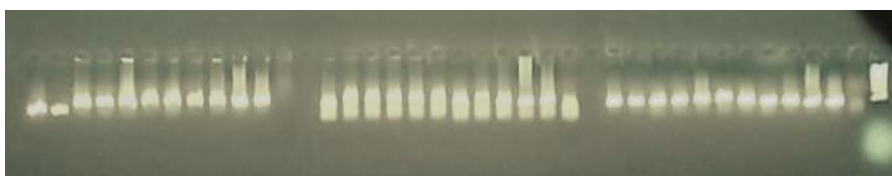


Figura 3: Amplificação de DNA do éxon 7 como controle de reação de PCR.



Com a análise do resultado da amplificação foi possível perceber que nenhum dos 125 indivíduos do estudo possuía a grande deleção para o gene *MUTYH*.

Silva 2011, defende que mesmo na ausência da caracterização clínica típica, critérios devem ser utilizados para direcionar pesquisa de uma condição herdável. Nas doenças comuns, como no CCR, estima-se que grande parte do risco genético deva-se à herança de múltiplos loci seguindo um modelo poligênico, cada um com frequências alélicas comuns (FAM maior do que 5%), e efeitos de baixa magnitude, com riscos relativos entre 1,0 e 1,5 (GOMY, 2013).

O polimorfismo genético, refere-se a coexistência de mais de uma forma variante de um gene num dado locus, na frequência acima de 1-2%, na constituição genética de uma população. Há dois tipos de polimorfismos genéticos muito úteis para a análise de ligação genética: os SNP, que são polimorfismos decorrentes de pequenas deleções ou inserções de uma única base, e os polimorfismos de comprimento conhecidos como minissatélites e microssatélites. A base de dados de SNPs do National Center for Biotechnology Information (NCBI) lista mais de 11 milhões de SNPs identificados na população humana, sendo que a maioria dos polimorfismos comuns tem pequeno impacto sobre a saúde humana. Porém, recentes evidências mostram que determinadas variantes podem influenciar na suscetibilidade a doenças (ROBBINS & COTRAN, 2010; SOUZA, 2012).

De acordo com Robinns e Cotran (2010) o GWAS é um ótimo método para a identificação de variantes genéticas associadas a um risco elevado de desenvolvimento de uma dada doença. No GWAS, os genomas inteiros de uma grande quantidade de pacientes com e sem a doença (em vez de famílias) são examinados em busca de variantes genéticas ou polimorfismos que estejam bem representados em pacientes com a doença. Dessa forma, podem-se identificar regiões do genoma contendo um ou mais genes variantes que aumentam o risco de desenvolvimento da doença. A variante causal na região é, então, identificada provisionalmente com a utilização da estratégia de “genes candidatos”. Nessa estratégia, os genes são selecionados com base em suas associações com a doença e se suas funções biológicas parecem estar envolvidas com a doença sob estudo. Porém, é necessário que a amostra seja grande, para que se possa detectar pequenos efeitos.

GOMY (2013) realizou um trabalho com a análise da suscetibilidade ao câncer colorretal em indivíduos brasileiros por genotipagem de polimorfismos de SNPs com dez variantes encontradas em populações europeias. Para o estudo foram inclusos 1467 indivíduos (727 casos e 740 controles). Como resultado, cinco dos SNPs pesquisados foram estatisticamente significantes para o risco de CCR, e um dos SNPs, pode ter tido resultado pelo fato da amostra ter sido insuficiente. Os SNP significantes foram: rs4939827 (18q21.1 - SMAD7 íntron 3); rs10411210 (19q13.1 - RHPN2 intron; rs4444235 (14q22.2 - Intergênica/BMP4); rs3802842 (11q23.1- Intergênica/FLJ45803); rs16892766 (8q23.3 - intergênica/EIF3H). Desta forma, ele conseguiu mostrar que os alelos de risco de CCR tiveram frequências próximas às dos europeus, assim como os efeitos de cada alelo/genótipo também foram modestos.

Um trabalho realizado por CASPER et al. (2014) visando avaliar mutações em *MUTYH* no hotspots p.Y179C (rs34612342) e p.G396D (rs36053993) como fatores de suscetibilidade genética para o colangiocarcinoma (CCA) foi realizado com 219 pacientes com diagnóstico de CCA e 365 indivíduos saudáveis. No estudo em questão, a conclusão apresentada foi que nenhum dos pacientes portavam mutação no hotspot bialélico.

Nascimento 2017, defende que há poucos trabalhos na literatura a respeito da expressão desses genes em populações específicas e que mutações bialélicas são raras, o que evidencia a importância de novos estudos em diferentes populações com o objetivo

de avaliar o significado da perda de função *MUTYH* na carcinogênese colorretal, uma vez que sua frequência apresenta-se marcada por diferenças étnicas.

Desta forma, a presença da grande deleção no gene *MUTYH* em indivíduos saudáveis e indivíduos com diagnóstico de CCR com critérios clínicos para a Síndrome de Lynch, poderia ser um fator de suscetibilidade para a doença, ainda que os pacientes não apresentassem pólipos adenomatosos. Entretanto, os resultados negativos para a grande deleção em *MUTYH* apoia-se na observação de que esta mutação é provavelmente rara, embora o tamanho amostral tenha pequeno se comparado a grandes estudos como os GWAS, bem como o fato da MAP ser uma doença autossômica recessiva rara na população.

7- CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados apresentados no presente trabalho pôde-se concluir que não foi observada nenhuma associação de mutação em *MUTYH* relacionada a pacientes com diagnóstico clínico de Lynch e ainda que, não foi encontrada nenhuma deleção no gene *MUTYH* dos indivíduos saudáveis. Desta forma, evidencia-se que *MUTYH* talvez seja rara em nossa população, porém faz-se necessário mais estudos em amostras maiores que associem esta deleção, mesmo em heterozigose, ao aumento do risco de câncer colorretal na população geral.

Desta forma, o presente trabalho tem por perspectivas futuras: (1) Ampliar a pesquisa da grande deleção em 1000 indivíduos saudáveis e outros 1000 casos de câncer colorretal esporádico, provenientes do biobanco do A C Camargo Cancer Center E (2) ampliar a pesquisa, incluindo as outras duas mutações hotspot p.Y179C (rs34612342) e p.G396D (rs36053993) do gene *MUYTH*.

REFERÊNCIAS

ACENCIO, M. L. Doenças genéticas. In: ROBBINS & COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição, p. 135-183. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

ARETZ, S.; TRICARICO, R.; PAPI, L. et al. MUTYH-associated polyposis (MAP): evidence for the origin of the common European mutations p. Tyr179Cys and p. Gly396Asp by founder events. *European Journal of Human Genetics*, v. 22, p. 923, 2014.

BEGGS, A. D.; HODGSON, S. V. The genomics of colorectal cancer: state of the art. *Current genomics*, v. 9, p. 1-10, 2008.

CAMPOS, F. G.; FIGUEIREDO, N. M.; MONTEIRI, M. et al. Incidence of colorectal cancer in young patients. *Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões*, v. 44, p. 208-215, 2017.

CAPELA, L. I. F. Identificação de Hotspots no gene MYH. Dissertação de Mestrado. Universidade de Aveiro. p. 1-47, 2012.

CARVALHO, R. A. **Avaliação do método de sequenciamento de nova geração no diagnóstico genético de neoplasia endócrina múltipla tipo 1**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2016.

CASPER, M.; Acalovschi, M.; Lammert, F. et al. The MUTYH hotspot mutations p. G396D and p. Y179C do not cause substantial genetic susceptibility to biliary cancer. *Familial cancer*, v. 13, p. 243-247, 2014.

DE FERRÃO, S. M. et al. MYH associated polyposis: severe phenotype in the homozygosity for the 1103delC mutation. *Acta medica portuguesa*, v. 20, p. 243-7, 2007.

DE MENEZES, C. C. S. et al. Câncer colorretal na população brasileira: taxa de mortalidade no período de 2005-2015. *Revista Brasileira em Promoção da Saúde*, v. 29, p. 172-179, 2016.

FORMAN, E. D.; BRAY ,F.; BREWSTER, D. H. et al. Cancer Incidence in five continents: Vol. X. *Lyon*: IARC, 2014.

GOMY, I. **Análise da suscetibilidade ao câncer colorretal em indivíduos brasileiros por genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único conhecidos**. Tese de doutorado. Fundação Antônio Prudente. São Paulo, p. 1-85, 2013.

Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância- INCA. Rio de Janeiro, p. 25-58, 2017.

KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, v. 87, p. 159-170, 1996.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R.; SPENCER, C. A. e al. Tecnologia do DNA Recombinante e clonagem gênica. In: **Conceitos de genética**. 9ª edição. Porto alegre: Artmed, p. 322-350, 2010.

LASSANCE, F. A. C.; LASSANCE, P. M. S.; GARICOCHEA, B. et AL. Câncer colorretal e síndromes hereditárias. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 1, p. 34-50, 2012.

LEAL, R. F.; AYRIZONO, M. L. S.; COY, C. R. S. et al. Complicações imediatas e tardias após cirurgia de reservatório ileal na polipose adenomatosa familiar. **Arq Gastroenterol**. v.45, p. 106-110, 2008.

LIMA, J. M.; SERAFIM, P. V. P.; SILVA I. D. C. G. et al. Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 43, p 8-13, 2006.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa/2016 Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**. Rio de Janeiro, p. 26, 2016.

NASCIMENTO, E. F. R. **Avaliação da expressão tecidual dos genes MUTYH e OGG1 em pacientes portadores de câncer colorretal esporádico**. Tese de doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, p. 1-102, 2017.

PINHO, M. S. L. Biologia molecular do câncer colorretal: Uma revolução silenciosa em andamento. **Rev Bras Coloproct**, v. 28, p. 353-68, 2008.

PITROSKI, C. E. F.; COSSIO, S.L.; SANTOS, P. K. et al. Frequência das mutações Y179C e G396D do gene *MUTYH* em indivíduos com polipose adenomatosa familiar e polipose associada ao gene *MUTYH*. **Revista HCPA. Porto Alegre**, p. 25, 2010.

_____; _____. Frequency of the common germline *MUTYH* mutations p. G396D and p. Y179C in patients diagnosed with colorectal cancer in Southern Brazil. **International journal of colorectal disease**, v. 26, p. 841-846, 2011.

POSWAR, F. O.; CARNEIRO, J. A.; MONTEIRO, V. A. et al. Hyperplastic polyposis: case report. **Revista Brasileira de Coloproctologia**, v. 30, p. 344-346, 2010.

PINHEIRO, C. I. F. P. **Risco de Carcinoma Gástrico em Famílias com Síndrome de Lynch**. Tese de mestrado. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar. Porto, p. 1-23, 2014.

POPOUTCHI, P. Conceitos em Carcinogênese Colorretal - Endoscopia Terapêutica. Disponível em: <http://endoscopiaterapeutica.com.br> Acesso em: 05 de maio de 2018.

ROSSI, B. M.; DE OLIVEIRA, F. F. Câncer Colorretal Hereditário. Disponível em <<http://www.hospcancer-icc.org.br>> Acesso em: 02 de maio de 2017.

ROULEAU, E.; ZATTARA, H.; LEFOL, C. et al. First large rearrangement in the *MUTYH* gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome. **Clinical Genetics**, v. 80, p. 301-303, 2011.

SAMPSON, J. R.; JONES, S.; DOLWANI, S.; et al. *MUTYH* (MYH) and colorectal cancer. **Biochemical Society Transactions**, v. 33, p. 679-683, 2005.

SCHNEIDER, N. B. **Análise do gene MSH6 em pacientes com síndrome de Lynch**. Tese de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, p. 1-55, 2015.

SILVA, F. C. C. **Frequência de mutações nos genes MSH6, PMS1, PMS2, TP53 e CHEK2 em pacientes suspeitos de Síndrome de Lynch.** Tese de Doutorado. Fundação Antônio Prudente, São Paulo, p.1-105, 2011.

SILVA, M.; ERRANTE, P. R. Câncer colorretal: fatores de risco, diagnóstico e tratamento. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 13, p. 133-140, 2017.

SOARES, M. S. B. **Metilação e CCR.** Tese de mestrado. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz. p. 1-68, 2016.

SOUZA, N. S. H. **Estudo da ocorrência de Polimorfismos de Nucleotídeo Único em genes codificadores de membros da família das citocinas IL-1 e IL-17 e suas associações com a cardiomiopatia chagásica humana.** Tese de mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo horizonte, p. 1-76, 2012.

SOUZA, W. F.; ARAÚJO, M. W.; FREITAS J. J. M. et al. Sinalização celular em câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, p. 30-33, 2014.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia In: ROBBINS & COTRAN. **Patologia: Bases Patológicas das Doenças.** 8ª edição, p. 259-330. Rio de Janeiro : Elsevier, 2010.

TORREZAN, G. T. **Identificação de mutações nos genes APC e MUTYH em famílias com polipose adenomatosa intestinal.** Tese de Doutorado. Fundação Antônio Prudente. São Paulo, p. 1-111, 2014.

_____; DA SILVA, F. C. C.; KREPISCHI, A. C. et al. Breakpoint characterization of a novel large intragenic deletion of *MUTYH* detected in a MAP patient: Case report. **BMC medical genetics**, v. 12, p. 1-6, 2011.

_____;_____.; SANTOS, É. M. M. et al. Mutational spectrum of the *APC* and *MUTYH* genes and genotype–phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 8, p. 1-12, 2013.

VALADÃO, M.; GRAZIOSI, G.; CARNEIRO, M. A Importância da Suspeição Clínica no Diagnóstico e Tratamento do Câncer Colorretal Hereditário The Importance of Clinical Suspicion on the Diagnosis and Treatment of Hereditary Colorectal Cancer. **Rev bras Coloproct**, v. 28, p. 454-461, 2008.

WIN, A. K.; DOWTY, J. G.; CLEARY, S. P. et al., Risk of Colorectal Cancer for Carriers of Mutations in *MUTYH*, With and Without a Family History of Cancer. *Gastroenterology*. v. 146, p. 1208-1211, 2014.

ANEXO A- TABELAS DE DADOS DAS AMOSTRAS

TABELA DO GRUPO CONTROLE

| TABELA DE AMOSTRAS DE SANGUE | |
|------------------------------|------------------------|
| INDIVÍDUO | QUANTIDADE DE DNA (µl) |
| Amostra 1 | 1,8ng |
| Amostra 2 | 1,62ng |
| Amostra 3 | 1,81ng |
| Amostra 4 | 1,93ng |
| Amostra 5 | 1,31ng |
| Amostra 6 | 0,7ng |
| Amostra 7 | 0,56ng |
| Amostra 8 | 2,15ng |
| Amostra 9 | 1,21ng |
| Amostra 10 | 2,36ng |
| Amostra 11 | 0,658ng |
| Amostra 12 | 2,13ng |
| Amostra 13 | 2,01ng |
| Amostra 14 | 1,65ng |
| Amostra 15 | 0,97ng |
| Amostra 30 | 22ng |
| Amostra 55 | 5ng |

| Tabela de amostras de saliva | |
|------------------------------|-------|
| Amostra 16 | 18ng |
| Amostra 17 | 36ng |
| Amostra 18 | 24ng |
| Amostra 19 | 46ng |
| Amostra 20 | 8,4ng |
| Amostra 21 | 9,1ng |
| Amostra 22 | 29ng |
| Amostra 23 | 4,5ng |
| Amostra 24 | 73ng |
| Amostra 25 | 11ng |

| | |
|------------|--------|
| Amostra 26 | 23ng |
| Amostra 27 | 90ng |
| Amostra 28 | 19ng |
| Amostra 29 | 20ng |
| Amostra 31 | 34ng |
| Amostra 32 | 52ng |
| Amostra 33 | 10ng |
| Amostra 34 | 25ng |
| Amostra 35 | 34ng |
| Amostra 36 | 3,26ng |
| Amostra 37 | 15ng |
| Amostra 38 | 38ng |
| Amostra 39 | 25ng |
| Amostra 40 | 71ng |
| Amostra 41 | 18ng |
| Amostra 42 | 17ng |
| Amostra 43 | 16ng |
| Amostra 44 | 6ng |
| Amostra 45 | 23ng |
| Amostra 46 | 54ng |
| Amostra 47 | 6ng |
| Amostra 48 | 8ng |
| Amostra 49 | 28ng |
| Amostra 50 | 13ng |
| Amostra 51 | 20ng |
| Amostra 52 | 10ng |
| Amostra 53 | 19ng |
| Amostra 54 | 5ng |

Tabela de amostra de saliva de indivíduos saudáveis após processo de reextração utilizando o kit de purificação do DNA.

| | |
|------------|-------|
| Amostra 24 | 9,1ng |
| Amostra 26 | 1,7ng |
| Amostra 27 | 3,8ng |

| | |
|------------|--------|
| Amostra 28 | 2,8ng |
| Amostra 29 | 3ng |
| Amostra 31 | 6,6ng |
| Amostra 32 | 4,32ng |
| Amostra 34 | 8,1ng |
| Amostra 35 | 12ng |
| Amostra 38 | 4,1ng |
| Amostra 39 | 1,8ng |
| Amostra 40 | 10ng |
| Amostra 45 | 1,28ng |
| Amostra 46 | 3,6ng |
| Amostra 47 | 6ng |
| Amostra 48 | 8ng |
| Amostra 49 | 28ng |
| Amostra 50 | 13ng |

TABELA DE INDIVÍDUOS COM DIAGNÓSTICO DE CCR COM CRITÉRIOS
PARA A SÍNDROME DE LYNCH

| IDENTIFICAÇÃO | CRITÉRIO CLÍNICO | TUMOR (IDADE) |
|---------------|------------------|---------------------------|
| SL.001.013 | Bethesda | CCR (36) |
| SL.001.014 | Amsterdam | tireoide (28) |
| SL.001.015 | Bethesda | CCR (29) |
| SL.001.016 | Amsterdam | CCR (49), Mama (51) |
| SL.001.021 | Amsterdam | CCR (36), endometrio (47) |
| SL.001.022 | Bethesda | CCR (32) |
| SL.001.025 | Familiar | CCR (53) |
| SL.001.025 | Familiar | CCR (53) |
| SL.001.027 | Amsterdam | CCR (35),Mama(33) |
| SL.001.029 | Bethesda | endometrio (39) |
| SL.001.030 | Familiar | CCR (63) |
| SL.001.032 | Bethesda | CCR (41), Pulmão (44) |
| SL.001.034 | Amsterdam | adenoma (45) |
| SL.001.035 | Amsterdam | CCR (69) |

| | | |
|------------|-----------|--|
| SL.001.038 | Bethesda | CCR (24) |
| SL.001.040 | Amsterdam | CCR (33) |
| SL.001.044 | Bethesda | CCR (30) |
| SL.001.045 | Amsterdam | CCR (71) |
| SL.001.046 | Bethesda | CCR (46) |
| SL.001.048 | Amsterdam | CCR (68) |
| SL.001.049 | Familiar | CCR (51) |
| SL.001.050 | Amsterdam | endometrio (49),mama (69), pancreas (70) |
| SL.001.052 | Amsterdam | CCR (45) |
| SL.001.053 | Bethesda | CCR (50) |
| SL.001.054 | Bethesda | CCR (36) |
| SL.001.055 | Bethesda | CCR (39) |
| SL.001.056 | Bethesda | CCR (48) |
| SL.001.059 | Bethesda | CCR (48) |
| SL.001.002 | Bethesda | CCR (31), adenoma |
| SL.001.061 | Bethesda | CCR (39) |
| SL.001.062 | Bethesda | CCR (39) |
| SL.001.063 | Amsterdam | CCR (56) |
| SL.001.064 | Familiar | CCR (65) |
| SL.001.065 | Bethesda | CCR (34) |
| SL.001.066 | Familiar | CCR (52) |
| SL.001.067 | Bethesda | CCR (41) |
| SL.001.068 | Familiar | CCR (43) |
| SL.001.069 | Familiar | CCR (46), adenoma (55) |
| SL.001.070 | Bethesda | CCR (44) |
| SL.001.071 | Bethesda | CCR (36) |
| SL.001.073 | Amsterdam | CCR (25) |
| SL.001.075 | Bethesda | CCR (40) |
| SL.001.078 | Bethesda | CCR (24) |
| SL.001.080 | Bethesda | CCR (31) |
| SL.001.082 | Bethesda | CCR (72), adenoma (72) |
| SL.001.083 | Bethesda | CCR (29) |
| SL.001.084 | Bethesda | CCR (45) |

| | | |
|--------------|-----------|-------------------------|
| SL.001.085 | Bethesda | CCR (51) |
| SL.001.086 | Amsterdam | CCR (53) |
| SL.001.087 | Familiar | CCR (24) |
| SL.001.088 | Bethesda | CCR (37) |
| SL.001.089 | Amsterdam | CCR (41) |
| SL.001.091 | Bethesda | CCR (38) |
| SL.001.092 | Bethesda | CCR (35) |
| SL.001.094 | Bethesda | CCR (41) |
| SL.001.095 | Bethesda | linfoma (33) |
| SL.001.096 | Bethesda | CCR (31) |
| SL.001.097 | Bethesda | adenoma (45) |
| | | |
| SL.001.100 | Familiar | CCR (51) |
| SL.001.102 | Bethesda | CCR (52) |
| SL.002.005 | Bethesda | CCR (43), duodenum (43) |
| SL.002.007 | Bethesda | CCR (37) |
| SL.002.011 | Bethesda | CCR (35) |
| SL.002.012 | Bethesda | CCR (35) |
| SL.002.013 | Bethesda | CCR (39) |
| SL.001.104-1 | Amsterdam | CCR <50 |
| SL.001.105-1 | Amsterdam | CCR <50 |
| SL.001.150-1 | Amsterdam | CCR <50 |
| SL.001.151-1 | Amsterdam | CCR <50 |



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
"JOSÉ ALBANO DE MACEDO"**

Identificação do Tipo de Documento

- Tese
 Dissertação
 Monografia
 Artigo

Eu, Larissa de Sousa Soares, autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de 02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação Determinação da frequência da longa deleção (c.348+33_*64+146del4285insta) no gene *MUTYH* em indivíduos com e sem histórico de câncer colorretal, de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 28 de Setembro de 2018.

Larissa de Sousa Soares.
Assinatura