



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

**PERFIL MUTACIONAL DO GENE APC EM PACIENTES COM
POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAL NO ESTADO DO
PARÁ**

Sandro Roberto de Araújo Cavallero

BELÉM – PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM ONCOLOGIA



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA E CIÊNCIAS
MÉDICAS

PERFIL MUTACIONAL DO GENE APC EM PACIENTES COM POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAL NO ESTADO DO PARÁ

Autor: Sandro Roberto de Araújo Cavallero

Orientador: Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas

BELÉM – PA

2014

CAVALLERO, Sandro Roberto de Araújo.

Perfil mutacional do gene APC em pacientes com polipose adenomatosa familiar no estado do Pará – Sandro Roberto de Araújo Cavallero; orientador: Rommel Mario Rodriguez Burbano – Belém, 2014.

53f

Tese (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Programa de Pós-Graduação em oncologia e Ciências Médicas, área de Concentração: Medicina I

APC gene mutational profile in families with familial adenomatous polyposis in Pará.

1. Genes APC; 2. Polipose Adenomatosa do colo; 3. Neoplasias do colo; 4. Oncologia I. Título

*Dedico este trabalho,
À minha querida mãe Emir Oeiras de Araújo e madrinha Maria Dinete Oeiras de Araújo,
pelo amor e dedicação incondicionais.
Aos meus sogros Benedito da Costa Maués e Maria José Ribeiro Maués,
pela paciência, confiança e amor depositados em mim.
À minha esposa Mônica Ribeiro Maués Cavallero,
meu porto seguro em todos os momentos e que com grande sabedoria se aloja no meu
coração.
À minha filha, Manuela Maués Cavallero,
pelo simples fato de existir e significar TUDO para mim.*

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por estar onipresente e guiar sempre pelo caminho certo.

Ao meu orientador, PROF. DR. ROMMEL MARIO RODRIGUEZ BURBANO, pela orientação segura e cautelosa, conhecimento transmitido além de paciência e compreensão. Pessoa não comum, pessoa sábia, símbolo para muitos. Os anos passam... O conhecimento é acumulado, algum conhecimento esquecido, outros ultrapassados, mas os valores são eternos e a lembrança de alguns mestres permanece. Somos frutos de algum mestre, seja ele professor, pai ou mãe, pois todos são mediadores. Todo pai é um pouco mestre e todo mestre é um pouco pai! Muito obrigado Dr. Rommel.

Ao Dr. SERGIO FIGUEIREDO DE LIMA JUNIOR, pela excelência no acompanhamento dos pacientes deste estudo, e graças ao seu empenho, este trabalho pode ser realizado.

Aos pacientes e seus familiares, que apesar de serem acometidos, algumas, por uma doença grave, dispuseram-se a contribuir cientificamente para que outras pessoas possam beneficiar-se de tais dados.

*É graça divina começar bem,
Graça maior, persistir na caminhada certa.
Mas a Graças das Graças é não desistir nunca.*

Dom Hélder Câmara

RESUMO

O câncer colorretal é um grave problema de saúde pública na região norte, sendo a 3ª neoplasia mais frequente entre os homens e a 2ª entre as mulheres. Cerca de 10% destes tumores são hereditários e a polipose adenomatosa familiar está entre as principais causas destes. Mutações no gene APC são responsáveis pelo desenvolvimento de tumores nestes pacientes e estão presentes desde a fase mais precoce na carcinogênese, além disso, existe uma relação entre o tipo de mutação e apresentação clínica da doença. Até o presente momento não existe uma publicação com o perfil de mutação do gene APC na região norte do país. Este trabalho tem como objetivo principal, identificar o perfil de mutações no gene APC em famílias do estado do Pará. Um total de 15 pacientes foi analisado provenientes de cinco famílias, todos atendidos no UNACON do HUIBB. Foi realizado a extração de DNA do sangue periférico e realizado um sequenciamento direto em um membro de cada família, obtendo desta forma um *screening* molecular e os demais membros da família foram genotipados pela técnica ARMS. A análise estatística foi realizada pelos softwares que acompanham o próprio produto. Neste estudo foram encontrados mutações nos 15 membros estudados (provenientes das 5 famílias), 40% das quais eram do tipo *frameshift*, 35% silenciadoras e 20% *nonsense*. Sendo que 60% de todas as mutações ocorreram na região MCR. Entre as três mutações mais frequentes na literatura, neste estudo foram encontradas duas: códon 1309 (em 40% dos indivíduos) e no códon 1061 (em 10% dos indivíduos). Estes números foram bem diferentes dos encontrados na literatura, reforçando o papel da miscigenação na frequência das mutações. A mutação c.3956delC foi a única encontrada em todas as famílias analisadas, o que pode comportar-se como um forte biomarcador desta síndrome. A avaliação clínica dos pacientes confirmou a correlação genótipo/fenótipo, sendo um fator determinante para o direcionamento clínico e aconselhamento genético. A plataforma confeccionada para análise de mutações pela técnica ARMS será de grande utilidade, já que conseguiu detectar mutações no 15 indivíduos estudados a um custo bem inferior que o sequenciamento direto por PCR.

Palavras-chave: Polipose Adenomatosa Familiar; Câncer colorretal; gene APC.

ABSTRACT

Colorectal cancer is a serious public health problem in the northern region of the country, being the third most common cancer among men and the second among women. About 10% of these tumors are hereditary and familial adenomatous polyposis are among the main causes of these. Mutax APC gene is responsible for the development of tumors in these patients and is present from a very early stage in carcinogenesis, in addition, there is a relationship between the type of mutation and clinical presentation of the disease. To date there is no publication with the profile of the APC gene mutation in the northern region of the country. This work aims to identify the profile of mutations in the APC gene families in the state of Pará. A total of 15 patients were analyzed from five families, all attended in the Unacon HUJBB. DNA was extracted from peripheral blood and performed a direct sequencing in one member of each family, thus obtaining a molecular screening and other family members were genotyped by ARMS technique. Statistical analysis was performed by the software that came with the product itself. In this study, mutations were found in all 15 patients studied (from 5 families), 40 % of which were frameshift, 35 % were silencing and 20 % nonsense. Since 60 % of all mutations occurred in the MCR region. Among the three most frequent mutations in the literature, this study found two: codon 1309 (in 40 % of subjects) and in codon 1061 (10 % of subjects). These numbers were very different from those found in the literature, reinforcing the role of miscegenation in the frequency of mutations. Only c.3956delC mutation was found in all families, which can behave as a strong biomarker of this syndrome. The clinical evaluation of patients confirmed the genotype / phenotype correlation, being a determining factor for clinical guidance and genetic counseling. The platform for analysis of mutations by ARMS technique will be very useful, since it was able to detect mutations in all 15 subjects studied at a lower cost than direct PCR sequencing.

Keywords: colorectal cancer; APC gene; familial adenomatous poliposis.

FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do Gene <i>APC</i>	16
Figura 2	Representação da região cluster de mutações (MCR) no gene <i>APC</i>	19
Figura 3	Relação Fenótipo/Genótipo da <i>FAP</i>	21
Figura 4	Relação Genótipo/Fenótipo das manifestações extra-colônicas.....	23
Figura 5	Exemplo de <i>layout</i> de placa para detecção de mutações do gene <i>APC</i> , <i>qBiomarker Somatic Mutation PCR Arrays</i> (Qiagen, 2011).....	28
Figura 6	Esquema da técnica de Sistema de Amplificação refratária de Mutação (ARMS) (Qiagen, 2011).....	29
Figura 7	Gráfico de detecção de mutações pela técnica ARMS por PCR em tempo real.....	30
Figura 8	Heredograma da família PAF1 afetada pela polipose adenomatosa familiar.....	32
Figura 9	Heredograma da família PAF2 afetada pela polipose adenomatosa familiar.....	32
Figura 10	Heredograma da família PAF3 afetada pela polipose adenomatosa familiar.....	33

QUADROS E TABELAS

QUADROS

Quadro 1	Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF 1	34
Quadro 2	Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF 2	34
Quadro 3	Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF 3	35
Quadro 4	Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF 4	35
Quadro 5	Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF 5	35

TABELAS

Tabela 1	Identificação dos pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar	31
Tabela 2	Tipos de mutações no gene APC: relação entre o genótipo e fenótipo das famílias com polipose adenomatosa familiar	36

LISTA DE SIGLAS

APC	<i>“Adenomatous Poliposis Coli”</i>
ARMS	Sistema de Amplificação Refratária de Mutação
CCR	Câncer Colorretal
CID	Domínio inibitório da Beta-catenina
CONASS	Conselho Nacional de Secretários de Saúde
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido EtilenoDiamino Tetra-Acético
HCEPR	Hipertrofia Congênita de Epitélio Pigmentar da Retina
HGMD	<i>“The Human Gene Mutation Database”</i>
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MCR	Região Cluster de Mutações
ND	Não Detectado
NESs	Sinais de Exportação Nuclear
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
pb	Pares de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
SUS	Sistema Único de Saúde
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNACON	Unidade de Alta Complexidade em Oncologia

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	14
II. OBJETIVOS	26
III. METODOLOGIA	27
IV. RESULTADOS	31
V. DISCUSSÃO	37
VI. CONCLUSÃO	43
VII. CONSIDERAÇÕES FINAIS	45
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46

1 INTRODUÇÃO

Considerando o total de tumores, exceto os de pele não melanoma, os tumores colorretais estão entre os grupos mais incidentes no Brasil, com aproximadamente 32.600 casos estimados para o ano de 2014, sendo o terceiro mais frequente em homens, e o segundo entre as mulheres (INCA, 2013).

O desenvolvimento das formas mais comuns de câncer resulta de uma interação entre fatores endógenos e ambientais, como a dieta (HAAS, ANTON e DE FRANCISCO, 2007). Fatores alimentares podem estar relacionados à alta incidência dessas neoplasias, em especial nas regiões Norte e Nordeste do país (MOUTINHO e MAKINO, 1988; KOIFMAN e KOIFMAN, 1997; NEVES, KOIFMAN e MATTOS, 2006; HAAS, ANTON e DE FRANCISCO, 2007). Dentre estes, os mais relacionados são as dietas ricas em calorias, carne vermelha, gorduras e pobre em fibras vegetais e frutas (LIBUTTI *et al*, 2015).

Quanto aos fatores endógenos, a genética é considerada o fator primordial, já que o câncer é uma doença com múltiplos estágios, que se origina devido a alterações no controle e na atividade de genes responsáveis pela regulação do crescimento e da diferenciação celular, resultando em uma proliferação descontrolada. Essa sequência de eventos é causada pelo acúmulo sequencial de mutações nos genes que controlam o crescimento e a diferenciação celular (SANDAL, 2002; PARK e LEE, 2003; WEIR, ZHAO e MEYERSON, 2004; ALI e SJÖBLOM, 2009).

Cerca de 90% dos casos de câncer são esporádicos, ou seja, são decorrentes de alterações que ocorrem nas células somáticas. No entanto, estudos demonstram que cerca de 10% dos casos de câncer têm um indicativo de origem

familiar, com as alterações genéticas ocorrendo nas células da linhagem germinativa (YAGHOUBI, 2004; BAMBINO, 2009).

As síndromes de câncer hereditário ocorrem por transmissão vertical (de uma geração para outra), por meio de um padrão de herança mendeliano bem definido, em geral do tipo autossômico dominante, independentemente do sexo. Apresentam elevada taxa de penetrância e possuem associação com certas características, como: idade precoce ao diagnóstico, mais de uma neoplasia em um mesmo indivíduo, vários membros de uma mesma família apresentando a mesma neoplasia ou neoplasias relacionadas e múltiplas gerações acometidas (DANTAS *et al.*, 2009).

Dentre as síndromes de câncer hereditário, destacam-se as que ocorrem na porção colorretal.

1.1 Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário

A síndrome do câncer colorretal (CCR) hereditário se subdivide em dois tipos: polipose e não polipose, que juntos são responsáveis por cerca de 6% dos casos de CCR (FEARNHEAD *et al.*, 2002). As principais síndromes hereditárias de cada subtipo são respectivamente: a Polipose Adenomatosa Familiar (*PAF*), responsável por menos de 1% dos casos, e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) ou Síndrome de Lynch, responsável por cerca de 5% dos casos de CCR (DAVIDSON, 2007; DANTAS *et al.*, 2009).

A *PAF* é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer com herança autossômica dominante causada por mutações germinativas, principalmente no gene *APC*, e menos frequentemente no gene MYH-associated polyposis (*MAP*), além da presença de anormalidades citogenéticas e perdas alélicas, alterações típicas da via supressora de instabilidade genética. Sua principal característica clínica é o desenvolvimento, a partir das segunda e terceira décadas de vida, de múltiplos (centenas a milhares) pólipos adenomatosos no cólon e/ou reto com capacidade para transformação maligna a partir da quarta década de vida (ROSSI *et al.*, 1998; HALF, BERCOVICH e ROZEN, 2009; HOSOGI *et al.*, 2009).

1.2 Gene APC

O gene supressor tumoral *APC* (“*Adenomatous Polyposis Coli*”), localizado no cromossomo 5q21, possui 16 exons e codifica uma proteína de 300 kDa (Figura 1) atuante como supressor tumoral na via de sinalização Wnt, sendo importante na transdução de sinal e no controle da apoptose (POLAKIS, 1997; FEARNHEAD, BRITTON e BODMER, 2001; VIRMANI *et al.*, 2001; HANSON e MILLER, 2005). Além disso o gene APC tem função na migração celular, adesão, segregação cromossômica, apoptose e diferenciação neuronal (HANSON e MILLER, 2005).

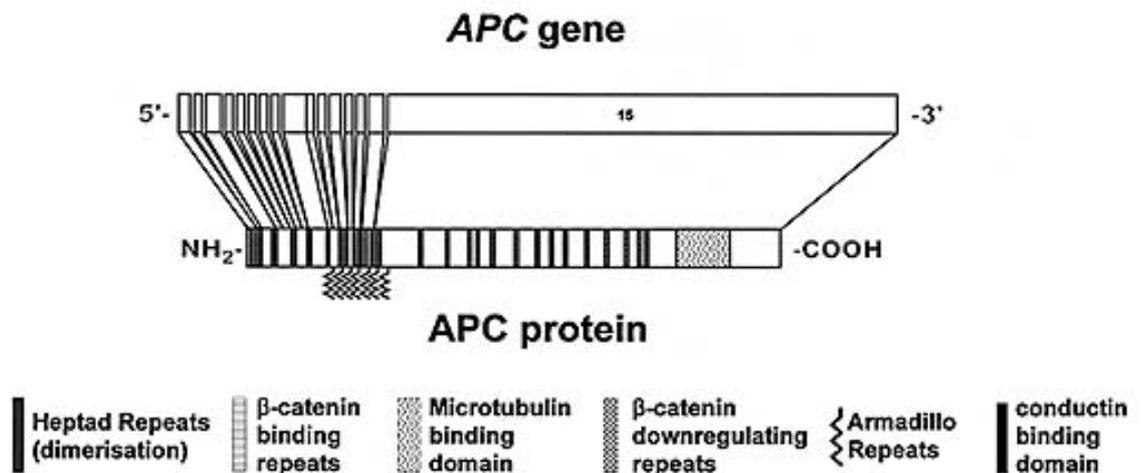


Figura 1 – Representação esquemática do gene APC

Este gene foi clonado simultaneamente por 2 grupos independentes: O grupo de Vogelstein em Baltimore (KINZLER *et al.*, 1991; NISHISHO *et al.*, 1991) e o grupo de Ray White em Salt Lake City (Grodén *et al.*, 1991; JOSLYN *et al.*, 1991).

A proteína *APC* age como supressor tumoral, protegendo a célula do crescimento ou divisão muito rápida ou não controlada, sendo esta ação ocorre em associação a outras proteínas, especialmente aquelas envolvidas na adesão celular e sinalização (GENETICS HOME REFERENCE, 2014).

Exemplos das proteínas associadas são tanto à beta-catenina, quanto a alfa-catenina, e como estas proteínas ligam-se à molécula de adesão celular E-caderina, conclui-se que o *APC* esteja também envolvido na adesão celular (RUBINFELD *et al.*, 1993; SU, VOGELSTEIN e KINZLER, 1993).

O gene *APC* codifica uma proteína citoplasmática que regula a proteína bifuncional citada anteriormente, beta-catenina. O *APC* induz a fosforilação e

subsequente degradação de qualquer beta-catenina não ligada, mantendo assim baixos níveis de beta-catenina na célula. A perda do *APC* leva ao acúmulo de beta-catenina citoplasmática livre, que é translocada para o núcleo, onde ativa a transcrição de genes de proliferação celular, incluindo *MYC* (NUSSBAUM, 2008).

Quando este gene está na forma selvagem, há manutenção do mecanismo de exteriorização do *APC* do núcleo para o citoplasma, porém, no *APC* mutado, como nas células cancerosas, perde-se esta habilidade, o que resulta no acúmulo nuclear de beta-catenina. Este dado permite chegar à conclusão que a capacidade de exteriorizar o *APC* do núcleo é crítico para sua função como supressor tumoral (ROSIN-ARBESFELD, TOWNSLEY e BIENZ, 2000).

Células epiteliais e mesenquimais de vários tecidos podem expressar esta proteína (*APC*). No epitélio da bexiga, intestino delgado e grosso, esôfago, estômago e pele, a expressão do *APC* está restrita a regiões onde a replicação tenha cessado e a diferenciação terminal esteja estabelecida (MIDGLEY *et al.*, 1997).

Em 1997 foi descoberto que a proteína do *APC* está presente tanto no núcleo como no citoplasma de humanos. A proteína *APC* nuclear está concentrada em discretas regiões subnucleares, incluindo os nucléolos, confirmada pela co-localização com o rRNA (NEUFELD e WHITE, 1997). Já em 2000, foi demonstrado que a exteriorização da proteína *APC* do núcleo para o citoplasma é mediada por dois sinais de exportação nuclear (NESs) ricos em leucina. Mutações tanto no *APC* quanto nos NESs provocam acúmulo nuclear da proteína, prejudicando sua ação (NEUFELD, 2000).

No citoplasma, esta proteína está localizada difusamente, assim como na superfície celular. Nesta última, há uma expressão acentuada na região subapical e ao longo da margem lateral. Distribuição esta que é compatível com a relação do *APC* e a sinalização na junção aderente e indica um papel nas células comprometidas com a diferenciação terminal (MIDGLEY *et al.*, 1997).

Um outro gene chamado *ASEF*, codifica uma proteína que interage diretamente com o *APC*, mas não com a beta-catenina. Como o *APC* está no complexo com a beta-catenina, sugere-se que *ASEF*, *APC* e beta-catenina estejam no mesmo complexo. Este complexo pode regular o citoesqueleto de actina, a morfologia celular, migração e função neuronal (KAWASAKI *et al.*, 2000). Assim,

uma proteína truncada do *APC*, se presente nas células do tumor colorretal, pode contribuir para as suas propriedades migratórias aberrantes (KAWASAKI, SATO e AKIYAMA, 2003).

O *APC* também pode interagir com os microtúbulos, sendo essencial para a polarização celular durante a mitose (ETIENNE-MANNEVILLE e HALL, 2003). Porém a interação do *APC* com os microtúbulos e com o complexo alvo da beta-catenina são mutuamente exclusivos (PENMAN, LEUNG e NATHKE, 2005). A função do *APC* em modular os microtúbulos durante a mitose é prejudicada pelo alelo *APC* mutado predispondo as células a aumentar sua anormalidade mitótica, o que contribui para a progressão tumoral (GREEN e KAPLAN, 2003).

Além destas ações, as células portadoras da proteína truncada do *APC*, tem um defeito na segregação cromossômica podendo contribuir para a instabilidade de células cancerosas (KAPLAN *et al.*, 2001).

A inativação do *APC*, além de ocorrer por metilação, mecanismo comumente reportado em carcinomas colorretais, também pode acontecer por perda alélica ou mutação (TOYOTA *et al.*, 1999; VIRMANI *et al.*, 2001). Mais de 850 tipos de mutações em diversas partes do gene *APC* já foram descritas (PLAWSKI *et al.*, 2013), a maioria observada entre os códons 1284 e 1580 (Figura 2), formando uma região cluster de mutações (MCR). Uma segunda região é observada na região 5' do exon 15, além da presença de alterações nos códons 1309 e 1061, que perfazem cerca de 30% de todas as mutações que levam a *PAF* (ROWLEY, 2005; HALF, BERCOVICH e ROZEN, 2009; ROSSI, 2009).

O *APC* parece agir como um supressor tumoral de maneira “não clássica” e o sítio da mutação na linhagem germinativa determina o tipo de “*second hit*” nos tumores relacionados à *PAF*. As mutações próximas ao códon 1300 tendem a adquirir o seu “*second hit*” por perda alélica e tem doença mais severa. Outros pacientes com *PAF* e mutações distantes deste códon, tendem a adquirir o seu “*second hit*” por uma mutação truncada na região *MCR* do gene *APC* (LAMLUM *et al.*, 1999). A causa deste fenômeno pode estar na manutenção da função N-terminal e perda da função C-terminal do *APC*, efeitos que influenciam nos níveis de beta-catenina e estabilidade da proteína *APC* (ROWAN *et al.*, 2000).

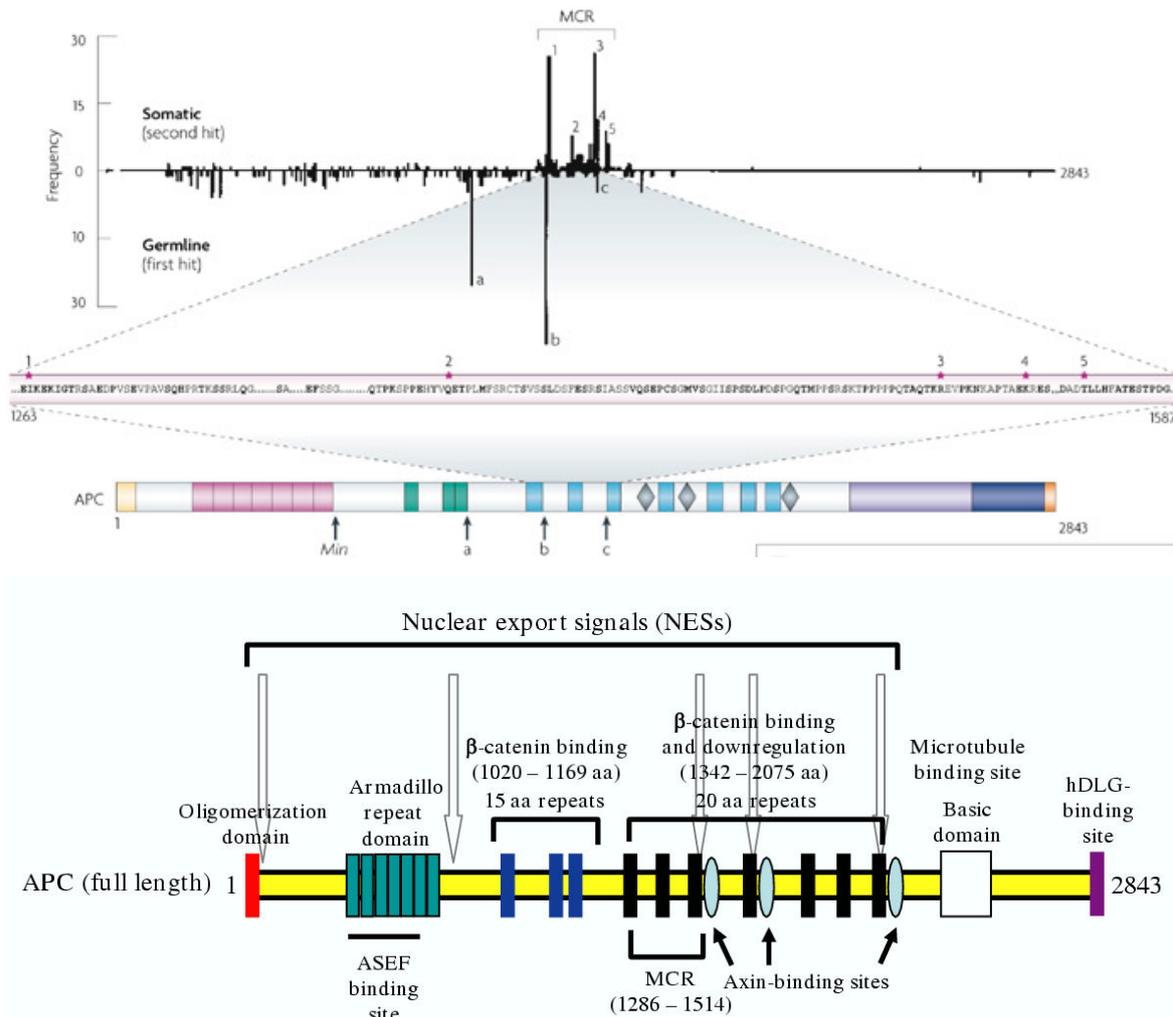


Figura 2 – Representação da região cluster de mutações (MCR) no Gene APC.

Apesar da alta frequência de alterações em APC, em alguns casos, onde o fenótipo do paciente é consistente com PAF, mas apresenta histórico familiar negativo ou compatível com padrão recessivo de herança, uma busca por alterações no gene MYH é recomendada (DAVIDSON, 2007; MACRAE, SART e NASIOULAS, 2009). Além disso, metilação na região promotora do APC, independente da presença de mutações no gene, foi detectada em PAF em frequências similares às do CCR esporádico (SEGDOITSAS *et al.*, 2008).

Diferentemente de alguns outros genes supressores tumorais, a perda ou a mutação do gene selvagem não é essencial para o desenvolvimento dos pólipos intestinais (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

O gene APC funciona como um “gatekeeper”, ou “gene protetor”, nas células epiteliais colônicas. O alelo selvagem do APC é perdido na grande maioria dos

tumores colorretais, tanto nos pacientes com *PAF* como nos esporádicos, consistente como o modelo “2-eventos” de Knudson (KINZLER e VOGELSTEIN, 1990).

Há evidências que as mutações no *APC* ocorrem precocemente durante a carcinogênese colorretal (POWELL *et al.*, 1992). As mutações do *APC* são encontradas nos tumores muito precoces, incluindo adenomas tão pequenos quanto 0,5 cm em diâmetro, e a frequência destas mutações permanece constante na progressão tumoral do estágio benigno para maligno, embasando a carcinogênese colorretal por múltiplos passos com o gene *APC* no, ou próximo ao, passo inicial (FEARON e VOGELSTEIN, 1990).

A *PAF* está associada com o aumento do risco de desenvolver carcinoma papilífero da tireóide. Uma fração significativa destes carcinomas esporádicos tem um rearranjo do proto-oncogene *RET* que gera um oncogene quimérico chamado *RET/PTC*. (CETTA *et al.*, 1998).

Diferentes mutações no *APC* produzem células com diferentes vantagens seletivas, sendo que as mutações perto do códon 1300 fornecem maiores vantagens. Com isto o *APC* não é um supressor tumoral clássico, e estes achados indicam um novo mecanismo para agressividade da doença: se um largo espectro de mutações ocorre num tumor, a taxa de mutações somáticas é efetivamente maior, levando a um maior crescimento tumoral (LAMLUM *et al.*, 1999).

As mutações no gene *APC* que ocorrem na polipose severa inibem fortemente a transcrição mediada pelo complexo beta-catenina/TCF, enquanto que as mutações que ocorrem no mesmo gene, porém, na polipose atenuada, parecem pouco influenciar na ação do mesmo complexo. Estes dados sugerem uma explicação molecular para a correlação genótipo/fenótipo nos pacientes com *PAF* (DIHLMANN *et al.*, 1999).

O modelo genético para o câncer colorretal sugere que o acúmulo sequencial de mutações em genes específicos como *APC*, *KRAS* e *p53* guiam a transição de um epitélio colônico normal para um adenoma displásico e posteriormente câncer (FEARON e VOGELSTEIN, 1990). Porém, num estudo com 100 amostras de câncer colorretal, foi identificado que apenas 6,6% tinham a mutação nos 3 genes (Gráfico 1) e que 38,7% tinham mutação em apenas um dos três genes. Sendo que a combinação mais comum foi a do *p53* com *APC* (27,1%) e a combinação *KRAS* e *p53* foi extremamente rara (SMITH *et al.*, 2002).

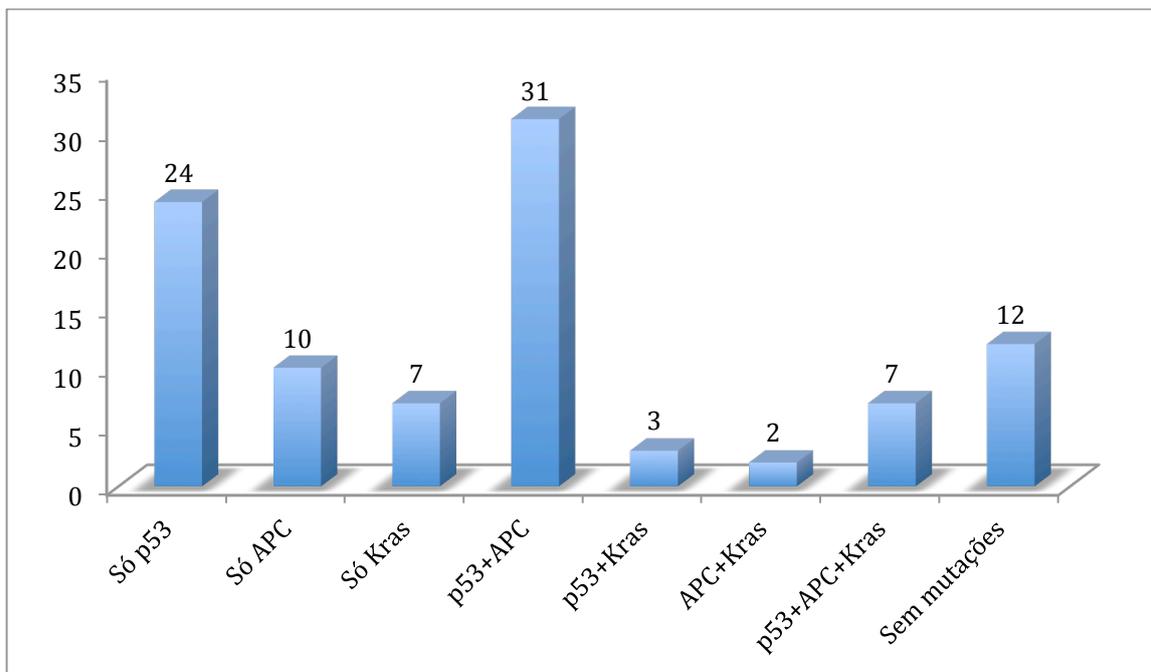


Gráfico 1 – Frequência de mutações em 100 casos de CCR (SMITH *et al.*, 2002).

Também já está descrito uma correlação entre genótipo/fenótipo do *APC* e *PAF* (Figura 3). As mutações germinativas encontradas entre os códons 1250 e 1464 são associadas a polipose mais severa (mais de 100 pólipos), enquanto que mutações em códons diferentes desta região estão associadas a pólipos esparsos (menos de 100 pólipos) (NAGASE *et al.*, 1992).

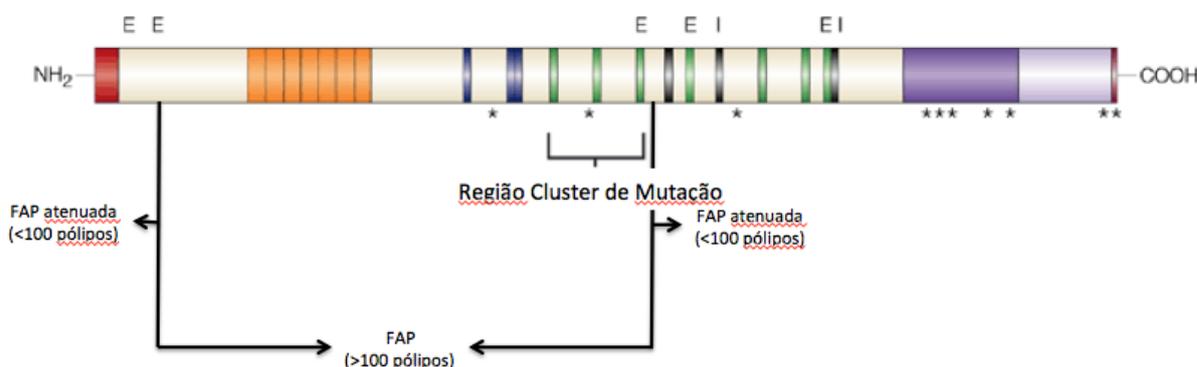


Figura 3 – Relação Fenótipo/Genótipo da *PAF*.

O fenótipo da *PAF* (número de pólipos e agressividade da doença) pode ser determinado a partir das mutações que acometem o gene *APC*. Os fenótipos para *PAF* podem ser definidos como (1) Severo/Profuso: para mutações localizadas entre os códons 1250 a 1464; (2) Intermediário: para mutações localizadas entre os códons 158 a 1595, exceto para as mutações localizadas entre os códons 312 e 412

e para as mutações localizadas entre os códons 1250 e 1464; (3) Atenuada: para mutações localizadas no éxon 9 e nas proximidades da posição 5' e 3' do gene *APC* (NEWTON, GRAHAM e HEPTINSTALL, 1989; BUNYAN *et al.*, 1995; SORAVIA *et al.*, 1998; WALLIS *et al.*, 1999; GROVES *et al.*, 2002; VANDROVCOVÁ *et al.*, 2004; NIEUWENHUIS e VASEN, 2007).

Porém a hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (HCEPR) está relacionada com a localização da mutação no *APC*. A HCEPR está quase sempre ausente nas mutações ocorridas antes do éxon 9, mas estão consistentemente presentes nas mutações em éxons superiores ao 9 (OLSCHWANG *et al.*, 1993). Em relação aos códons, os pacientes com mutações entre os códons 136 e 302 não desenvolvem HCEPR, enquanto aqueles com mutação além do éxon 9 até o códon 1387 do gene podem apresentar lesões oftalmológicas (SPIRIO *et al.*, 1993; OLSCHWANG *et al.*, 1993).

Somente alguns pacientes com mutações no éxon 9 possuem HCEPR, e parece haver uma clara associação entre HCEPR e mutação localizadas após o códon 457. Sendo que as mutações associadas à HCEPR tem proteínas truncadas maiores que 50 kDa, sugerindo que as maiores proteínas mutadas do *APC* podem exibir um efeito dominante negativo, resultando em diminuição do *APC* e expressão da HCEPR (WALLIS *et al.*, 1994).

Somado a isto, os pacientes com mutação entre os códons 1445 e 1578 não expressam HCEPR, mas desenvolvem tumores desmóides severos (CASPARI *et al.*, 1995).

As mutações encontradas entre os códons 767 e 1513 estão associadas a HCEPR, assim como osteomas e hepatoblastoma (BISGAARD e BULOW, 2006). A Figura 4 esquematiza regiões mutadas associadas com o fenótipo de manifestações extra-colônicas.

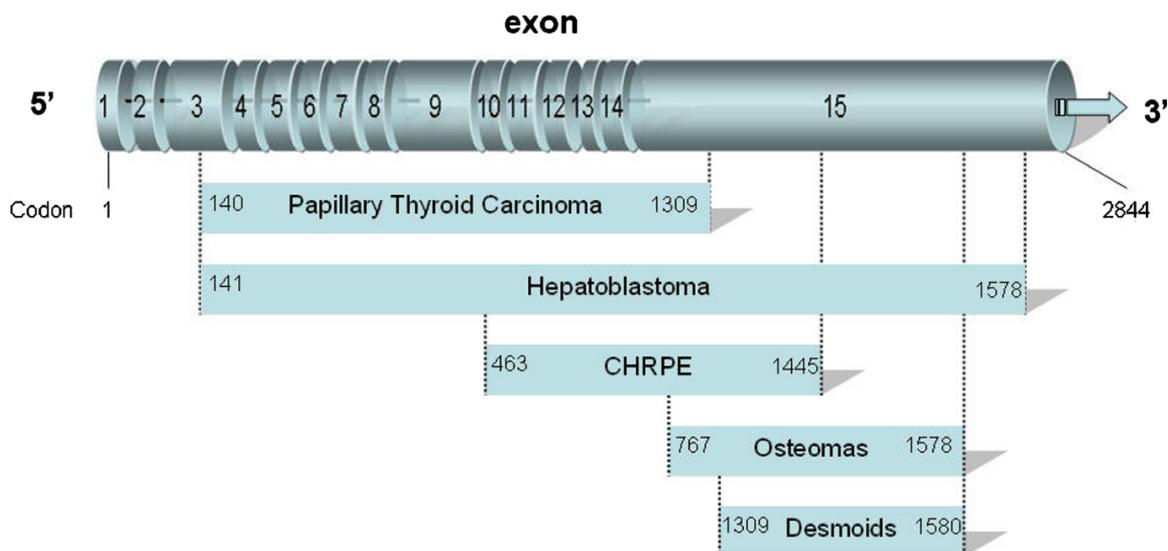


Figura 4 – Relação Genótipo/Fenótipo das manifestações extra-colônicas.

Outros autores confirmam os achados acima de correlação genótipo/fenótipo, e ainda acrescentam que mutações em sítios mais distais, estão associados com idade mais precoce do início dos sintomas e um maior número de pólipos colônicos (BUNYAN *et al.*, 1995).

Uma proporção dos casos de CCR são devido uma variante da *PAF* chamada síndrome de Gardner. Que além dos pólipos adenomatosos com transformação maligna observados na *PAF*, outras anomalias que incluem os osteomas de mandíbula e e desmóides. Embora o fenótipo *PAF* e o fenótipo Gardner pareçam ser reproduzidos em famílias, até o momento é desconhecido porque alguns pacientes desenvolvem *PAF* e outros desenvolvem a síndrome de Gardner (NUSSBAUM, 2008)

A severidade de algumas características da síndrome de Gardner podem estar relacionadas ao genótipo na *PAF*. Por exemplo, mutações 3' de códon 1444 tem significativamente mais lesões na radiografia dental panorâmica, assim como maior incidência de tumores desmóides que famílias com mutações no final 5' (DAVIES *et al.*, 1995).

Numa análise de 150 pacientes, não relacionados, com *PAF*, não foi encontrado nenhuma relação das manifestações extracolônicas (como osteomas e tumores desmóides) com o tipo ou localização intragênica de alguma mutação germinativa (NAGASE *et al.*, 1992).

O paciente com deleção de cinco pares de base no códon 1309 tem sintomas gastrointestinais e a morte por câncer colorretal ocorre cerca de 10 anos antes dos pacientes com outras mutações (CASPARI et al., 1994; GAYTHER et al., 1994).

Outros estudos descrevem que as mutações nos códons 542-1309 estão associadas com lesões retinianas pigmentares, enquanto as mutações nos códons 1465, 1546 e 2621 estão associadas a múltiplas manifestações extraintestinais. Pacientes sem manifestações extraintestinais ou tem mutações no *APC* não truncadas ou não tem mutações detectadas no mesmo (GIARDIELLO et al., 1997).

Embora muitos estudos mostrem a correlação genótipo/fenótipo como descrito acima, alguns autores em seus estudos não encontraram uma clara correlação (BRENSINGER et al., 1998).

Apesar da baixa incidência, as síndromes hereditárias colorretais são um importante problema de saúde pública, devido sua alta penetrância gênica, a idade precoce de desenvolvimento da doença e, principalmente pela falta de métodos efetivos de *screening* (Oliveira et al., 2009).

A identificação das mutações responsáveis pelo aparecimento das síndromes hereditárias colorretais possibilita a identificação pelo diagnóstico molecular de familiares portadores dessas alterações e que se encontram em risco de desenvolvimento da doença (Bellolio et al., 2006). Ressalta-se que diferentes mutações germinativas são identificadas em famílias de etnias distintas, demonstrando a necessidade de identificação das alterações responsáveis por essas síndromes na população brasileira e, em especial, na região Norte, onde uma alta incidência de tumores gastrointestinais é observada (GUILFORD, BLAIR e MORE, 2007; TUNCA et al., 2010; INCA, 2013).

Além disso, não há uma política de saúde que suporte a inclusão de indivíduos de alto risco de câncer na rede pública, e que avalie o custo-efetividade de métodos preventivos e de diagnóstico precoce nesses indivíduos em relação ao tratamento e reabilitação de pacientes com câncer sendo, portanto, necessário desenvolver estratégias direcionadas ao diagnóstico, seguimento, tratamento de indivíduos com síndromes de câncer hereditário e seus familiares dentro do Sistema Único de Saúde (SUS). Além de se realizar estudos de custo-benefício para avaliar o impacto social e econômico dos programas de rastreamento clínico e molecular em decorrência da inclusão de indivíduos de alto risco na rede pública de saúde.

Uma estimativa do Conselho Nacional de Secretários de Saúde - CONASS (2007) revelou que seriam necessários pelo menos 30 centros de genética clínica na região Norte e 102 na Nordeste. No entanto, apenas 18% dos médicos geneticistas encontram-se fora do eixo Sul-Sudeste (CONASS, 2007). Dessa forma, faz-se necessária a formação de recursos humanos e um novo centro de referência em tumores hereditários para o atendimento das populações nas regiões Norte e Nordeste, minimizando as desigualdades regionais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar mutações na linhagem germinativa do gene *APC* em famílias portadoras de Polipose Adenomatosa Familiar (*PAF*) com a finalidade de identificar um perfil mutacional da referida síndrome em famílias do Estado do Pará.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar o *screening* molecular, por sequenciamento direto, do gene *APC*;
- Padronizar um teste genético para diagnosticar a *PAF* com melhor custo benefício que o sequenciamento direto;
- Relacionar as mutações encontradas no trabalho com o fenótipo do paciente.

3 METODOLOGIA

3.1 Casuística

Um total de 15 pacientes provenientes de cinco famílias diferentes foi analisado neste estudo. Todos foram atendidos no Ambulatório de Coloproctologia da Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON) do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) da Universidade Federal do Pará (UFPA). Esta pesquisa foi aprovada em Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (protocolo 274/12).

3.2 Extração de DNA

Amostras de sangue periférico foram coletadas em tubos com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), em seguida foram extraídas usando o kit *QIAamp® DNA blood Mini Kit (Qiagen)* de acordo com instruções do fabricante.

3.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

3.3.1 Análise genotípica

O DNA extraído do sangue periférico de um membro de cada uma das famílias afetadas foi submetido ao sequenciamento direto para fazer o *screening* molecular do gene *APC*, na plataforma Ion Torrent (Life Technologies). Este método baseia-se no processamento paralelo massivo de fragmentos de DNA, já que pode ler bilhões de fragmentos ao mesmo tempo. E diferentemente dos demais sequenciadores que utilizam uma DNA polimerase para gerar a fita complementar ao template, bases marcadas por fluoróforos e câmaras a detecção, o Ion Torrent faz a detecção diretamente pela detecção de um sinal elétrico ocasionada pela alteração

do pH oriunda de uma reação de polimerização. A escolha deste método foi baseada no melhor custo-benefício para projetos de alta demanda de dados e o sequenciamento muito mais rápido e eficiente. Os outros membros das cinco famílias foram genotipados pelo Sistema de Amplificação Refratária de Mutação (ARMS).

3.3.2 Sistema de Amplificação Refratária de Mutação

As amostras dos pacientes foram também testadas para a identificação das mutações através da técnica de PCR em tempo real utilizando placas *qBiomarker Somatic Mutation PCR Arrays*[®] (Qiagen), de acordo com as informações do fabricante. Tais placas foram customizadas com um painel de mutações para o gene *APC*, do qual fazem parte: a) o conjunto de mutações germinativas, reveladas neste trabalho, das famílias portadoras de *PAF* do Norte do Brasil; b) o conjunto de mutações germinativas, descritas nos dois trabalhos publicados na literatura, das famílias com *PAF* do sudeste do Brasil e c) um conjunto de mutações selecionadas dos bancos de dados e da literatura científica, por peritos da empresa Qiagen, com base em sua relevância clínica, funcional e na sua frequência de ocorrência na *PAF*. Cada placa de 96 poços pode analisar duas amostras (48 poços para cada amostra). Desta forma, para cada paciente a placa oferece reagentes para a detecção de 44 mutações do gene *APC* e 4 controles (endógenos e de amplificação) (Figura 5).

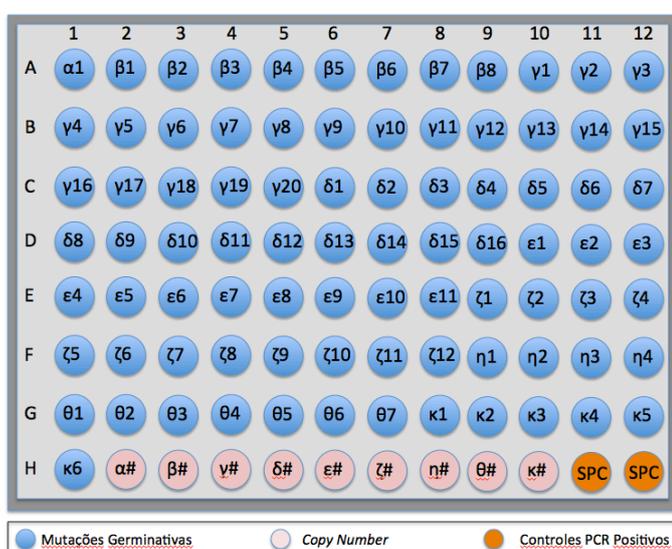


Figura 5. Exemplo de *layout* de placa para detecção de mutações do gene *APC*, *qBiomarker Somatic Mutation PCR Arrays* (Qiagen, 2011).

A técnica se baseia em um teste simples de amplificação específica do alelo mutado, que é possível detectar através da tecnologia ARMS, a qual é baseada na discriminação pela *Taq polimerase* entre um “*match*” e um “*mismatch*” na extremidade 3' do *primer* da *PCR* (Figura 6) (NEWTON, GRAHAM e HEPTINSTALL,1989).

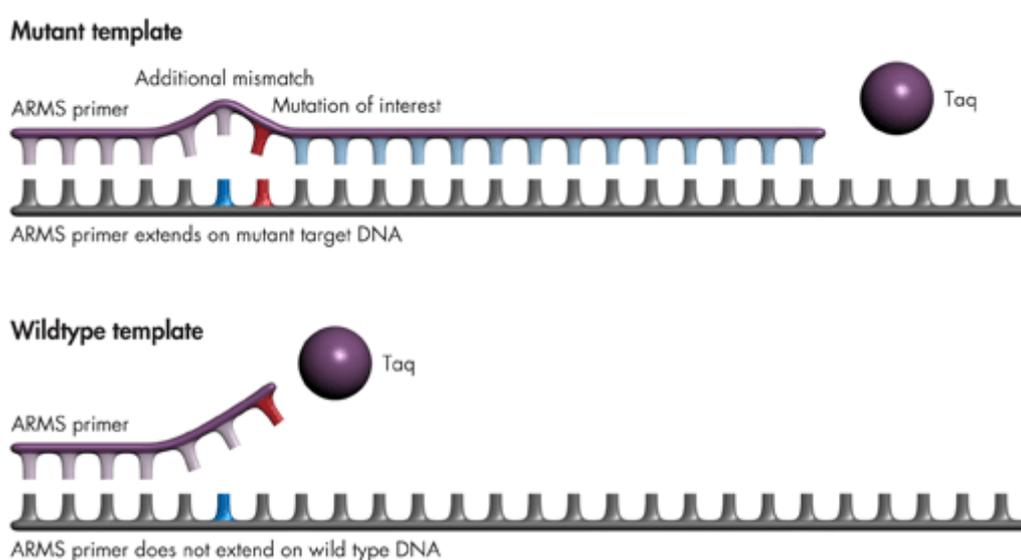


Figura 6. Esquema da técnica de Sistema de Amplificação Refratária de Mutação (ARMS) (Qiagen, 2011).

Este método demonstrou ser simples, rápido e de confiança para a detecção de qualquer mutação que envolva mudanças simples de bases ou deleções pequenas (FERRIE *et al.*, 1992).

Através da técnica ARMS, foi possível identificar em todos os membros de cada uma das cinco famílias, todas as mutações que foram detectadas pelo sequenciamento direto em um representante de cada família analisada. Por este motivo, após a execução deste trabalho, as placas de ARMS continuarão sendo utilizadas para o diagnóstico e/ou prognóstico de pacientes com PAF, atendidos no ambulatório de Coloproctologia do UNACON.

A identificação de mutações por meio da metodologia ARMS esta exemplificado na Figura 7.



Figura 7. Gráfico de detecção de mutações pela técnica ARMS por PCR em tempo real. Em cima, na cor roxa, o controle endógeno da reação; abaixo nas cores vermelho, azul e verde, três diferentes mutações detectadas pelas sondas específicas contidas nas placas.

3.4 Análise de dados – Estatística Descritiva

As análises foram realizadas pelos *softwares* que acompanham os equipamentos utilizados neste estudo.

4 RESULTADOS

Um total de 15 pacientes provenientes de cinco famílias diferentes foi analisado neste estudo. Algumas das características destes pacientes estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Identificação dos pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar

Pacientes	Sexo	Idade ao diagnóstico	Mutação no gene APC
Família 1 (PAF1)			
PAF 1A	Feminino	23	+
PAF 1B	Feminino	25	+
PAF 1C	Feminino	18	+
PAF 1D	Masculino	14	+
PAF 1E	Masculino	17	+
Família 2 (PAF2)			
PAF 2F	Feminino	40	+
PAF 2G	Masculino	?	+
PAF 2H	Feminino	15	+
PAF 2I	Masculino	ND*	+
Família 3 (PAF3)			
PAF 3J	Masculino	30	+
PAF 3K	Feminino	ND*	+
PAF 3L	Feminino	ND*	+
PAF 3M	Feminino	ND*	+
Família 4 (PAF4)			
PAF 4N	Masculino	40	+
Família 5 (PAF5)			
PAF 5O	Masculino	25	+

*ND = Não detectado

Em nosso estudo encontramos 8 pacientes do sexo feminino, com média de idade ao diagnóstico de 24,2 anos (três pacientes não tinham em prontuário o

registro da idade ao diagnóstico. Enquanto 7 pacientes eram do sexo masculino com média de idade ao diagnóstico de 25,2 anos (2 pacientes não tinham idade registrada ao diagnóstico).

Por meio de entrevistas com familiares e busca de prontuários, foi possível a construção de heredogramas de três das cinco famílias envolvidas no estudo – PAF1, PAF 2 e PAF 3 – que coincidentemente são as famílias com maior número de indivíduos afetados pela doença em gerações próximas, e o mais importante, sem pular nenhuma geração (Figuras 8, 9 e 10). A análise genealógica das duas famílias restantes não foi possível, devido a carência de informações dos pacientes sobre seus familiares.

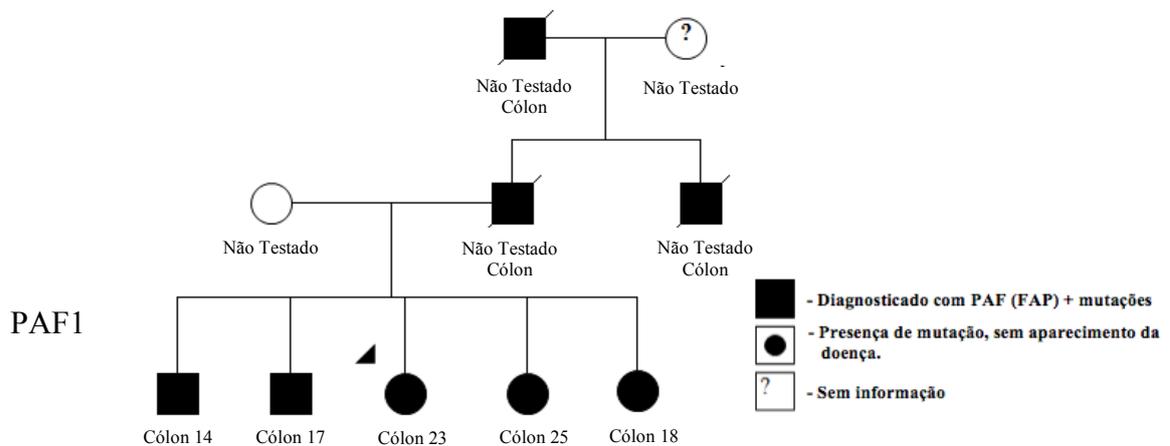


Figura 8. Heredograma da família PAF1 afetada pela polipose adenomatosa familiar.

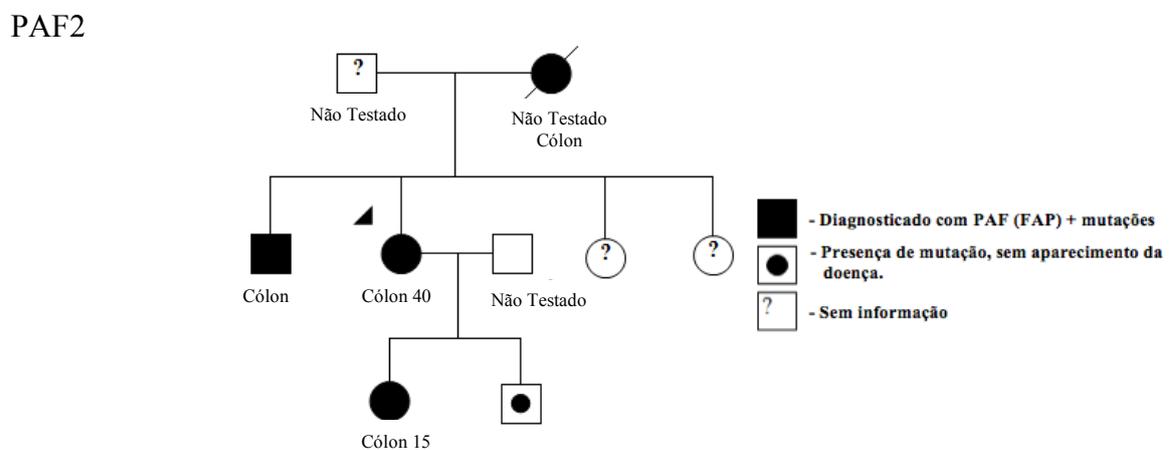


Figura 9. Heredograma da família PAF2 afetada pela polipose adenomatosa familiar.

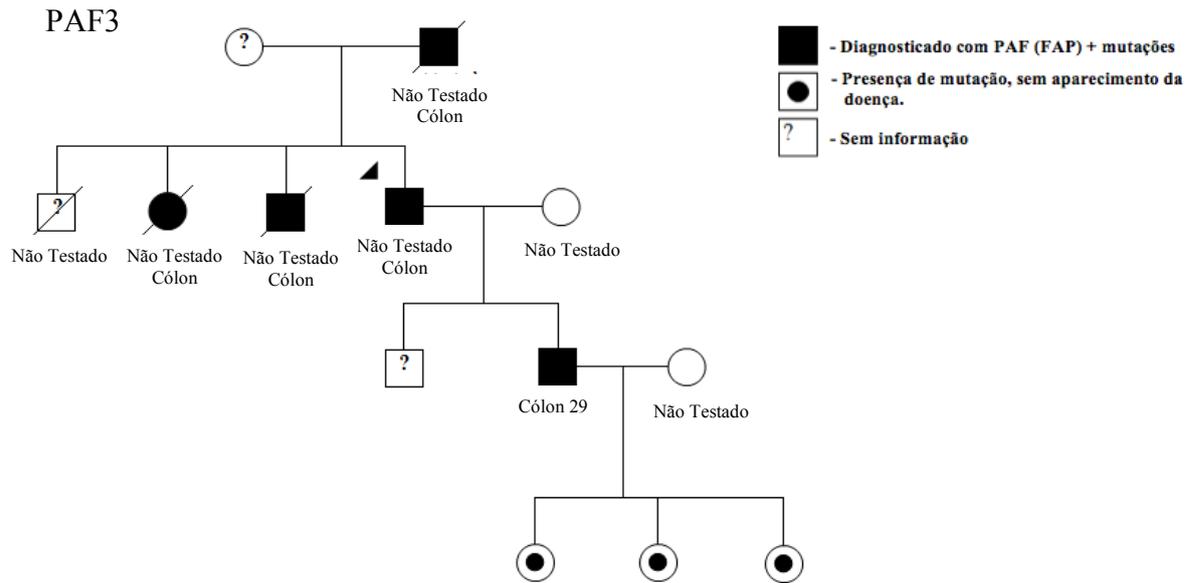


Figura 10. Heredograma da família PAF3 afetada pela polipose adenomatosa familiar.

O sistema *ARMS* encontrou nos descendentes e/ou irmãos dos pacientes com *PAF*, as mesmas mutações encontradas no gene *APC* dos pacientes que sofreram “*screening*” molecular para esse gene na plataforma Ion Torrent (Life Technologies). Na avaliação da *PAF*, e como discutido posteriormente, a presença de “*clusters*” de mutação no gene *APC* nos permitiu elaborar um painel de mutações, o qual tornou o diagnóstico molecular mais rápido e barato.

Desta forma, todos os 15 pacientes, das cinco famílias com *PAF*, apresentaram mutações na linhagem germinativa do gene *APC*, as famílias *PAF* 1 – 3 são oriundas do interior do estado do Pará, enquanto que as famílias 4 e 5 são da capital, Belém. A maioria das mutações foi detectada no éxon 15 do gene *APC*, porém mutações no éxon 11 e no éxon 14 também foram identificadas em 2 famílias, ambas do interior do Estado. A mutação no éxon 15 estava presente nas 5 famílias estudadas. A seguir, os Quadros 1- 5 resumem a análise mutacional desse gene.

No total foram reveladas 20 diferentes tipos de mutações: oito do tipo “*frameshift*” (40%); sete mutações silenciadoras (35%); quatro do tipo “*nonsense*” (20%); e uma mutação do tipo “*missense*” (5%) (Tabela 2).

Quadro 1. Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF1			
Exon	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Tipo de Mutação
11	c.1458T>C	p.Tyr486Tyr	Silenciadora
14	c.1635G>A	p.Ala545Ala	Silenciadora
15	c.4479G>A	p.Thr1493	Silenciadora
15	c.3956delC	p.P1319fs*2	<i>Frameshift</i>
15	c.4460_4469del10	p.T1487fs*17	<i>Frameshift</i>
15	c.3183_3187delACAAA	p.Gln1062x	<i>Frameshift</i>
15	c.4729G>T	p.E1577*	<i>Nonsense</i>

Quadro 2: Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF2			
Exon	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Tipo de mutação
11	c.1458T>C	p.Tyr486Tyr	Silenciadora
14	c.1635G>A	p.Ala545Ala	Silenciadora
15	c.4479G>A	p.Thr1493	Silenciadora
15	c.5268T>G	p.Ser1756Ser	Silenciadora
15	c.5034G>A	p.Gly1678Gly	Silenciadora
15	c.5880G>A	p.Pro1960Pro	Silenciadora
15	c.4326T>A	p.Pro1442	Silenciadora
15	c.3927_3931delAAAGA	p.E1309fs*4	<i>Frameshift</i>
15	c.3921_3925delAAAAG	p.E1309fs*4	<i>Frameshift</i>
15	c.3956delC	p.P1319fs*2	<i>Frameshift</i>
15	c.3925G>T	p.E1309*	<i>Nonsense</i>
15	c.5465T>A	p.Val1822Asp	<i>Missense</i>

Quadro3: Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF3			
Exon	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Tipo de mutação
15	c.3956delC	p.P1319fs*2	<i>Frameshift</i>
15	c.4233delT	p.S1411fs*4	<i>Frameshift</i>
15	c.4460_4469del10	p.T1487fs*17	<i>Frameshift</i>
15	c.4731_4734delATGT	p.C1578fs*71	<i>Frameshift</i>

Quadro 4: Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF4			
Exon	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Tipo de mutação
15	c.4132C>T	p.Q1378*	<i>Nonsense</i>
15	c.4729G>T	p.E1577*	<i>Nonsense</i>
15	c.4081_4082delCC	p.P1361fs*13	<i>Frameshift</i>
15	c.2626C>T	p.R876*	<i>Nonsense</i>
15	c.3956delC	p.P1319fs*2	<i>Frameshift</i>

Quadro 5: Mutações encontradas no gene APC pertencentes à família PAF5			
Exon	Mudança de base	Mudança de aminoácido	Tipo de mutação
15	c.3921_3925delAAAAG	p.E1309fs*4	<i>Frameshift</i>
15	c.3925G>T	p.E1309*	<i>Nonsense</i>
15	c.3927_3931delAAAGA	p.E1309fs*4	<i>Frameshift</i>
15	c.3956delC	p.P1319fs*2	<i>Frameshift</i>
15	c.4460_4469del10	p.T1487fs*17	<i>Frameshift</i>

Tabela 2. Tipos de Mutações no gene APC: relação entre o genótipo e o fenótipo dos pacientes com polipose adenomatosa familiar.

Famílias	Exons	Códon	Mutação	Fenótipo*	Referências
MUTAÇÕES DO TIPO NONSENSE					
PAF1 e PAF4	15	876	c.2626C>T	Intermediário	Stella et al.,1994
PAF2 e PAF5	15	1309	c.3925G>T	Severo	Miyoshi et al.,1992
PAF4	15	1378	c.4132C>T	Severo	Miyaki et al.,1994
PAF4	15	1577	c.4729G>T	Intermediário	Thirlwell et al.,2010
MUTAÇÕES DO TIPO FRAMESHIFT					
PAF1	15	1061	c.3183_3187delACAAA	Intermediário	Ficari et al.,2000; Jarry <i>et al.</i> ,2011
PAF2 e PAF5	15	1309	c.3921_3925delAAAAG	Severo	Miyaki et al.,1994; Mulkens <i>et al.</i> , 1998
PAF2 e PAF5	15	1309	c.3927_3931delAAAGA	Severo	Miyoshi et al.,1992; Jarry <i>et al.</i> ,2011
PAF1-PAF5	15	1319	c.3956delC	Severo	Miyaki et al.,1994
PAF4	15	1361	c.4081_4082delCC	Severo	Thirlwell et al.,2010
PAF3	15	1411	c.4233delT	Severo	Miyaki et al.,1994
PAF1;PAF3 e PAF5	15	1487	c.4460_4469del10	Intermediário	Thirlwell et al.,2010
PAF3	15	1578	c.4731_4734delATGT	Intermediário	Thirlwell et al.,2010
MUTAÇÕES SILENCIADORAS					
PAF1 e PAF2	11	486	c.1458T>C	Intermediário	Chen et al.,2006; Kaufmann et al., 2009; Sheng et al.,2010
PAF1 e PAF2	14	545	c.1635G>A	Intermediário	Chen et al.,2006 ; Sheng et al.,2010
PAF2	15	1442	c.4326T>A	Severo	Løvig et al.,2002
PAF1 e PAF2	15	1493	c.4479G>A	Intermediário	Crabtree et al.,2004; Chen et al.,2006 ; Sheng et al.,2010
PAF2	15	1678	c.5034G>A	Atenuada	Crabtree et al.,2004
PAF2	15	1756	c.5268T>G	Atenuada	Chen et al.,2006 ; Sheng et al.,2010
PAF2	15	1960	c.5880G>A	Atenuada	Chen et al.,2006 ; Sheng et al.,2010
PAF2	15	1822	MISSENSE - c.5465T>A	Atenuada	Wallis et al., 1999; Plawski et al. 2008

5 DISCUSSÃO

Considerando o total de tumores, exceto os de pele não melanoma, os tumores colorretais estão entre os grupos mais incidentes no Brasil, com aproximadamente 32.600 casos estimados para o ano de 2014, sendo o terceiro mais frequente em homens, e o segundo entre as mulheres (INCA, 2013).

Cerca de 90% dos casos de câncer são esporádicos, ou seja, são decorrentes de alterações que ocorrem nas células somáticas. No entanto, estudos demonstram que cerca de 10% dos casos de câncer têm um indicativo de origem familiar, com alterações genéticas ocorrendo nas células da linhagem germinativa (YAGHOUBI *et al.*, 2004).

A *PAF* e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) são os dois tipos de síndromes de câncer hereditário que afetam o intestino grosso e são responsáveis por cerca de 6% dos casos de câncer colorretal (FEARNHEAD *et al.*, 2002; DAVIDSON, 2007; DANTAS *et al.*, 2009). A *PAF* é causada por mutações germinativas, principalmente no gene *APC* e menos frequentemente no gene *MAP*, e apresenta herança autossômica dominante. Sua principal característica clínica é o desenvolvimento, a partir das segunda e terceira décadas de vida, de múltiplos (centenas a milhares) pólipos adenomatosos no cólon e/ou reto com capacidade de transformação maligna a partir da quarta década de vida (ROSSI *et al.*, 1998; HALF, BERCOVICH e ROZEN, 2009; HOSOGI *et al.*, 2009).

A inativação do gene *APC* ocorre por perda alélica e, principalmente, por mutação. As mutações geralmente produzem uma proteína truncada, sem a região carboxila terminal, com perda da sua função (TOYOTA *et al.*, 1999; LESKO, GOSS e PROSPETRI, 2013).

Por meio do sequenciamento direto do gene *APC*, identificamos mutações patogênicas nos 5 membros (um de cada família), e posteriormente pela técnica *ARMS*, conseguimos identificar mutações em todos os indivíduos do estudo. As mutações encontradas foram predominantemente do tipo “*frameshift*” (40%); silenciadoras (35%); e “*nonsense*” (20%). Essa distribuição não coincide com outro estudo brasileiro, em 20 pacientes do sudeste do País, onde a predominância de mutações foi do tipo “*nonsense*” (45%) e “*frameshift*” (20%) (DE QUEIROZ ROSSANESE *et al.*, 2013), o que demonstra uma diferença no espectro de alterações do gene *APC* em famílias com *PAF* de acordo com a região geográfica do Brasil. Provavelmente este fenômeno acontece porque existem diferenças étnicas de miscigenação entre as populações do sul e do norte do país (BATISTA DOS SANTOS *et al.*, 1999; PENA *et al.*, 2009)

Relatos da literatura revelam que a maioria das mutações encontradas na *PAF* ($\geq 60\%$) está localizada na região central da proteína (entre os códons 1281–1556), que é denominada de Região Cluster de Mutações (*MCR*). A região *MCR* coincide com a região do gene *APC* que codifica o domínio da proteína responsável pela regulação da beta-catenina (MIYOSHI *et al.*, 1992; CHEADLE *et al.*, 2002; DE ROSA *et al.*, 2003; CHRISTIE *et al.*, 2013). As mutações que ocorrem nessa região geralmente produzem uma proteína truncada, responsável por um aumento da porção livre de beta-catenina, que é transportada para o núcleo, ativando a transcrição de genes envolvidos na proliferação celular (MINDE *et al.*, 2011). Das 20 mutações reveladas nas famílias com *PAF* deste trabalho, 12 (60%) ocorreram na região *MCR*, corroborando as descrições da literatura e confirmando essa região como *hotspot* para mutações dentro do gene *APC*.

Até o presente momento foram registrados, no banco de dados *The Human Gene Mutation Database* (HGMD) (acessado em 24 de fevereiro de 2014), 858 diferentes tipos de mutação no gene *APC*. Entre os códons 1055 e 1309 ocorrem 23% das alterações germinativas desse gene. As três mutações germinativas mais frequentes são as deleções de 5 pares de bases (pb) dos códons 1309 e 1061 e a deleção de 4 pb do códon 1064 (PLAWSKI *et al.*, 2013).

Neste estudo detectamos duas das três mutações germinativas mais frequentes: a mutação no códon 1309, revelada nas famílias *PAF2* e *PAF5* (Quadros 2 e 5) e a mutação no códon 1061, encontrada na família *PAF1* (Quadro1). Half,

Bercovich e Rozen (2009) encontraram uma associação da mutação no códon 1309 com 10% dos pacientes com *PAF* da literatura, o que está de acordo com o estudo de Torrezan *et al.* (2013) que identificaram essa mutação em 9% das 23 famílias com *PAF* do sudeste do Brasil. Neste estudo, a mutação no códon 1309 acometeu 40% das cinco famílias com *PAF*, essa frequência é maior do que a média mundial, por este motivo atualmente estamos aumentando o número amostral de famílias com *PAF* para verificar se esta frequência será mantida.

A mutação no códon 1061 acomete 5% dos pacientes da literatura, segundo o levantamento realizado por Half, Bercovich e Rozen (2009). Essa mutação foi encontrada em 7 a 14% dos 15 indivíduos com *PAF* do Estado do Pará analisadas neste trabalho, porém não foi detectada no estudo com famílias do sudeste do Brasil realizado por Torrezan *et al.* (2013) e De Queiroz Rossanese *et al.* (2013), o que reforça a diferença encontrada entre os tipos de alterações do gene *APC* e a região geográfica do Brasil à qual pacientes com *PAF* pertencem.

A *PAF* é causada por um espectro muito heterogêneo de mutações, as quais são compartilhadas entre pacientes de diferentes famílias, como mostrado neste trabalho (POWELL *et al.*,1992; GOSS e GRODEN, 2000). Em um amplo estudo realizado na população Canadense (JARRY *et al.*,2011), demonstraram que em várias famílias com *PAF* há a ocorrência das mutações c.3183_3187delACAAA e c.3927_3931delAAAGA, as quais também foram descritas em neste estudo.

Nossos resultados demonstraram que a grande maioria das mutações foi comum a mais de uma família com *PAF* (Quadros 1 ao 5 e Tabela 2), principalmente a mutação c.3956delC que foi a única que se repetiu em todas as famílias do estudo. Desta forma, a mutação c.3956delC demonstrou ser uma causa importante da *PAF* no norte do Brasil e decorre de um efeito fundador, provavelmente com origem em comunidades japonesas, onde essa mutação foi descrita pela primeira vez por Miyaki *et al.* (1994) em tumores colorretais de três famílias não aparentadas. No nosso conhecimento, não há relatos que descrevam a mutação c.3956delC na linhagem germinativa de famílias com *PAF*, como no presente trabalho.

É provável que, a partir de 1929, com o desembarque de imigrantes japoneses em Belém (SUZUKI, 1992), essa mutação germinativa tenha sido introduzida na população do estado do Pará ou que a c.3956delC é uma mutação “*de novo*” que surgiu na população nativa do norte do Brasil. Independente da sua

origem, a mutação c.3956delC é um forte candidato a biomarcador desta síndrome de câncer hereditário em famílias do norte do Brasil. Esperamos que com a chegada de amostras de famílias com *FAP* do estado do Maranhão e do Amazonas possamos confirmar o efeito fundador dessa mutação.

O fenótipo da *PAF* (número de pólipos e agressividade da doença) pode ser determinado a partir das mutações que acometem o gene *APC*. Os fenótipos para *PAF* podem ser definidos como (1) Severo/Profuso: para mutações localizadas entre os códons 1250 a1464; (2) Intermediário: para mutações localizadas entre os códons 158 a1595, exceto para as mutações localizadas entre os códons 312 e 412 e para as mutações localizadas entre os códons 1250 e 1464; (3) Atenuada: para mutações localizadas no exon 9 e nas proximidades da posição 5' e 3' do gene *APC* (NEWTON, GRAHAM e HEPTINSTALL, 1989; BUNYAN et al., 1995; SORAVIA et al.,1998; WALLIS et al.,1999; GROVES et al., 2002; VANDROVCOVÁ et al., 2004; NIEUWENHUIS e VASEN, 2007).

Nas famílias participantes deste estudo foram detectadas mutações compatíveis com os três fenótipos, as do fenótipo severo foram encontradas nas famílias PAF1, PAF2; PAF4 e PAF5, as mutações do fenótipo intermediário foram detectadas nas famílias PAF1, PAF3, PAF4 e PAF5 e as mutações do fenótipo de atenuado foram encontradas na família PAF2 (Tabela 2). A avaliação clínica dos pacientes confirmou a correlação entre a localização da mutação no gene *APC* e o fenótipo da *PAF*.

Embora as famílias PAF1, PAF4 e PAF5 apresentarem mutações compatíveis com *PAF* do fenótipo severo e intermediário, as suas características clínicas as enquadram como do fenótipo severo, visto que seus membros desenvolveram a doença entre a segunda e a terceira década de vida, com aparecimento de milhares de pólipos, transformação celular e agressividade tumoral. Essa observação também se aplica para a família PAF2 que tem características clínicas do fenótipo severo, embora apresentasse mutações compatíveis com os fenótipos severo e atenuado. Por outro lado, a família PAF3 foi a única que se enquadrou no fenótipo intermediário da doença, visto que seus membros tiveram o surgimento de centenas de pólipos por volta da quarta década de vida.

Segundo Crabtree et al. (2002), a presença de mutação na região *MCR* confere a *PAF* o fenótipo severo, independente do acometimento de mutações

características de outros fenótipos. No presente estudo essa premissa foi verdadeira, visto que todas as famílias com *PAF* que apresentaram mutações compatíveis com dois fenótipos da doença tinham em comum a presença de mutação no códon 1309 ou nas suas proximidades, isto é na região *MCR*.

A relação entre o genótipo-fenótipo na *PAF* é um fator determinante para o direcionamento clínico e aconselhamento genético e também para simplificar a pesquisa de mutações nos pacientes portadores de *PAF* e seus familiares (GROVES *et al.*, 2002; VANDROVCOVÁ *et al.*, 2004).

O diagnóstico da *PAF* severa na população de estudo variou em torno da segunda e terceira década de vida, enquanto da *PAF* intermediária se revelou na quarta década. Essa cronologia está de acordo com as diretrizes do manejo da *PAF* publicadas por Vasen *et al.*, (2008), que demonstraram que pacientes com tipo severo de *PAF* tem uma idade de aparecimento da doença em média 10 anos antes dos portadores do tipo intermediário e atenuado, como por exemplo, neste estudo a família PAF1 apresentou a forma mais precoce da doença, um dos seus membros teve a síndrome diagnosticada aos 14 anos de idade, com a presença de milhares de pólipos por todo o intestino. Esse fenótipo agressivo se justifica pela presença de um amplo espectro de mutações, entre as quais a c.3956delC, relacionadas ao fenótipos severo. Por este motivo, e de acordo com as diretrizes supracitadas, é necessário que se faça avaliações clínicas e diagnósticas em todos os membros de famílias com *PAF*, a partir da segunda década de vida.

Apesar da alta frequência de alterações em *APC*, em alguns casos, onde o fenótipo do paciente é consistente com a *PAF*, mas apresenta histórico familiar negativo ou compatível com padrão recessivo de herança, uma busca por alterações no gene *MAP* é recomendada (DAVIDSON, 2007; MACRAE, SART e NASIOULAS, 2009). Neste trabalho essa investigação não foi necessária, visto que todos os pacientes analisados revelaram, no sangue periférico, mutações no gene *APC*. As mutações encontradas neste estudo foram amplamente descritas em pacientes portadores de malignidades colorretais de etnias e regiões geográficas diferentes, principalmente de populações asiáticas e europeias (Tabela 2), o que reforça o papel da miscigenação da nossa população no aparecimento de diversas mutações germinativas em pacientes com *PAF*.

Mesmo com a descrição na literatura de relação entre algumas mutações na linhagem germinativa do *APC* e a hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (OLSCHWANG *et al.*, 1993; SPIRIO *et al.*, 1993; WALLIS *et al.*, 1994; CASPARI *et al.*, 1995; BISGAARD e BULOW, 2006), em nosso trabalho não foi possível identificar tal relação devido a ausência de registro em prontuário de avaliações oftalmológicas.

As placas confeccionadas para realizar o “*screening*” pela técnica ARMS detectou as mutações nos 15 indivíduos analisados, sendo que esta técnica tem um custo bem inferior ao sequenciamento direto. Por este motivo, estas placas continuarão sendo utilizadas para identificar as mutações de novos indivíduos portadores de *FAP* atendidos no UNACON do HUIBB determinando seu diagnóstico assim como ajudando no prognóstico.

A identificação das alterações responsáveis pelo aparecimento de uma síndrome hereditária de câncer gastrointestinal no paciente possibilita verificar nos seus familiares, por meio do diagnóstico molecular, se os mesmos são portadores dessas alterações e qual é o risco que apresentam para desenvolver essa síndrome (BELLOLIO *et al.*, 2006). Cabe ressaltar que diferentes mutações germinativas foram reveladas em famílias de etnias distintas (GUILFORD, BLAIR e MORE, 2007; TUNCA *et al.*, 2010; BLAIR, KAHOKHEHR e SAMMOUR, 2013), portanto, existe a necessidade de identificar as alterações responsáveis pelas síndromes de câncer hereditário na população brasileira e, em especial, nas populações das regiões norte e nordeste, onde uma alta incidência de tumores gastrointestinais é observada.

6 CONCLUSÃO

As síndromes genéticas, embora raras, levam a um grande número de casos de morte em pacientes jovens e em idade produtiva. Toda e qualquer ferramenta a mais que possa auxiliar no diagnóstico precoce, determinar prognóstico e orientar num seguimento mais adequado a estes pacientes é extremamente importante.

Embora existam muitos estudos mostrando o perfil de mutações no gene *APC* em várias populações, eles mesmos não são concordantes, o que nos leva a crer que devido a miscigenação étnica, o perfil de mutações pode mudar de uma população para outra.

Como este perfil não é conhecido em nossa região, este trabalho tornou-se extremamente importante para elucidar esta lacuna em nosso conhecimento, já que estas mutações tem relação com agressividade e apresentação da doença, assim como, algumas mutações estão presentes desde o início da carcinogênese podendo também levar a um diagnóstico mais precoce.

Neste estudo foram encontrados mutações nos 15 membros estudados (provenientes de 5 famílias), 40% das quais eram do tipo “*frameshift*”, 35% silenciadoras e 20% “*nonsense*”. Sendo que 60% de todas as mutações ocorreram na região *MCR*.

Entre as três mutações mais frequentes na literatura, neste estudo foram encontradas duas: códon 1309 (em 40% dos indivíduos) e no códon 1061 (em 10% dos indivíduos). Estes números foram bem diferentes dos encontrados na literatura, reforçando o papel da miscigenação na frequência das mutações.

A mutação c.3956delC foi a única encontrada em todas as famílias analisadas, o que pode comportar-se como um forte biomarcador desta síndrome. A avaliação clínica dos pacientes confirmou a correlação entre genótipo/fenótipo,

sendo um fator determinante para o direcionamento clínico e aconselhamento genético.

A plataforma confeccionada para análise de mutações pela técnica *ARMS* será de grande utilidade, já que conseguiu detectar mutações no 15 indivíduos estudados a um custo bem inferior que o sequenciamento direto por *PCR*.

Este estudo encontrou alterações moleculares em genes-alvo que servem para prognóstico, diagnóstico e acompanhamento de pacientes com câncer familiar.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Esperamos que a finalização deste trabalho seja mais um passo para:

- Implantar um centro de referência em tumores familiares no estado do Pará;
- Elaborar e padronizar procedimentos de boas práticas de laboratório, estabelecendo normas para obtenção, identificação, armazenamento, transporte e manipulação das amostras biológicas;
- Otimizar e viabilizar as tecnologias, de acordo com a demanda e disponibilidade dos mesmos;
- Realização de encontros para difusão e discussão dos métodos, interpretação dos resultados e verificar as limitações dos mesmos;
- Implantação de estudos clínicos de prevenção, diagnóstico e tratamento;
- Implementação do Banco de Tumores Hereditários, elaborando e padronizando os procedimentos para seleção, coleta, transporte, armazenamento, e disponibilização de amostras biológicas a pesquisadores;
- Criação de um registro de câncer colorretal hereditário que incluirá: (1) o registro do fenótipo apresentado pelos indivíduos e familiares; (2) heredogramas; (3) dados epidemiológicos de hábitos e exposições colhidos através de questionário específico;
- Publicações, comunicações e apresentações em congresso, realização de trabalhos de graduação e/ou pós-graduação sob orientação acadêmica.
- Interagir com diferentes centros de forma organizada, permitindo produzir conhecimento sobre aspectos clínicos e moleculares da PAF em amostras representativas das populações envolvidas, bem como a formação de recursos humanos na área de oncogenética.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, M. A.; SJÖBLOM, T. Molecular pathways in tumor progression: from discovery to functional understanding. **Mol. Biosyst.**, v. 5, n. 9, p. 902-908, set. 2009.

BAMBINO, P.B. **Imunoexpressão da E-caderina, Beta-catenina e TP53 em câncer gástrico familiar.** 2009, 78f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. 2009.

BATISTA DOS SANTOS, S.E. *et al.* Differential contribution of indigenous men and women to the formation of an urban population in the amazon region as revealed by mtDNA and y-DNA. **Am. J. Phys. Anthropol.**, v. 109, n. 2, p. 175-180, jun 1999.

BELLOLIO, F. *et al.* Cáncer colorrectal hereditario: análisis molecular de los genes APC y MLH1. **Rev. Méd. Chile.**, v. 134, p. 841-848, 2006.

BISGAARD, M.L.; BULOW, S. Familial adenomatous polyposis (FAP): genotype correlation to FAP phenotype with osteomas and sebaceous cysts. **Am. J. Med. Genet. A.**, v. 140, n. 3, p. 200-204, fev. 2006.

BLAIR, V.; KAHOKEHR, A.; SAMMOUR, T. Cancer in Māori: lessons from prostate, colorectal and gastric cancer and progress in hereditary stomach cancer in New Zealand. **ANZ. J. Surg.**, v. 83, n. 1-2, p. 42-48, jan-fev. 2013.

BRESINGER, J.D. *et al.* Variable phenotype of familial adenomatous polyposis in pedigrees with 3-prime mutation in the APC gene. **Gut.**, v. 43, n. 4, p. 548-552, out. 1998.

BUNYAN, D.J. *et al.* Genotype- phenotype correlations of new causative APC gene mutations in patients with familial adenomatous polyposis. **J. Med. Genet.**, v. 32, n. 9, p 728-731, set. 1995.

CASPARI, R. *et al.* Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. **Lancet**, v. 343, n. 8898, p. 629-632, mar. 1994.

CASPARI, R. *et al.* Familial adenomatous polyposis: desmoid tumours and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. **Hum. Mol. Genet.**, v. 4, n. 3, p. 337-340, mar. 1995.

CETTA, F. *et al.* The *ret/ptc1* oncogene is activated in familial adenomatous polyposis-associated thyroid papillary carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 83, n. 3, p. 1003-1006, mar. 1998.

CHEADLE, J.P. *et al.* Different combinations of biallelic APC mutation confer different growth advantages in colorectal tumours. **Cancer Res.**, v. 62, p. 363-366, 2002.

CHEN, S.P. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of the APC gene and colorectal cancer risk: a case-control study in Taiwan. **BMC Cancer.**, v. 6:83, p. 1-6, mar. 2006.

CHRISTIE, M. *et al.* Different APC genotypes in proximal and distal sporadic colorectal cancers suggest distinct WNT/ β -catenin signaling thresholds for tumourigenesis. **Oncogene**, v. 32, p. 4675-4682, set. 2013.

CONASS (2007) Nota Técnica: Política Nacional de Atenção Integral em Genética Clínica. Conselho Nacional dos Secretários de Saúde. 12 pg.

CRABTREE, M.D. *et al.* Explaining variation in familial adenomatous polyposis: relationship between genotype and phenotype and evidence for modifier genes. **Gut.**, v. 51, n. 3, p. 420-423, Set. 2002.

CRABTREE, M.D. *et al.* Analysis of candidate modifier loci for the severity of colonic familial adenomatous polyposis, with evidence for the importance of the N-acetyl transferases. **Gut.**, v. 53, n. 2, p. 271-276, Fev. 2004.

DANTAS, E.L.R. *et al.* Genética do câncer hereditário. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 55, p. 263-269, 2009.

DAVIDSON, N.O. Genetic testing in colorectal cancer: who, when, how and why. **Keio J. Med.**, v. 56, n. 1, p. 14-20, mar. 2007.

DAVIES, D.R. *et al.* Severe Gardner syndrome in families with mutations restricted to a specific region of the APC gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 57, n. 5, p. 1151-1158, nov. 1995.

DE QUEIROZ ROSSANESE, L.B. *et al.* APC germline mutations in families with familial adenomatous polyposis. **Oncol. Rep.**, v. 30, n. 5, p. 2081-2088, nov. 2013.

DE ROSA, M. The mutation spectrum of the APC gene in FAP patients from southern Italy: Detection of known and four novel mutations. **Hum. Mutat.**, v. 21, n. 6, p. 655-656, jun. 2003.

DIHLMANN, S. *et al.* Dominant negative effect of the APC(1309) mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. **Cancer Res.**, v. 59, n. 8, p. 1857-1860, abr. 1999.

ETIENNE-MANNEVILLE, S.; HALL, A. Cdc42 regulates GSK-3-beta and adenomatous polyposis coli to control cell polarity. **Nature**, v. 421, n. 6924, p. 753-756, fev. 2003.

FEARNHEAD, N.S.; BRITTON, M.P.; BODMER, W.F. The ABC of APC. **Hum. Mol. Genet.**, v. 10, n. 7, p. 721-733, abr. 2001.

FEARNHEAD, N.S.; WILDING, J.L.; BODMER, W.F. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. **Br. Med. Bull.**, v. 64, n. 1, p. 27-43, dez. 2001.

FEARON, E.R.; VOGELSTEIN, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759-767, jun. 1990.

FERRIE, R.M. *et al.* Development, multiplexing, and application of ARMS tests for common mutations in the CFTR gene. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 51, n. 2, p. 251-262, ago. 1992.

FICARI, F. *et al.* APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. **Br. J. Cancer.**, v. 82, n. 2, p. 348-353, jan. 2000.

GAYTHER, S.A. *et al.* Regionally clustered APC mutations are associated with a severe phenotype and occur at a high frequency in new mutation cases of adenomatous polyposis coli. **Hum. Mol. Genet.**, v. 3, n. 1, p. 53-56, jan. 1994.

GENETICS HOME REFERENCE. Disponível em: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/APC>. Acesso em 19 jan. 2014.

GIARDIELLO, F.M. *et al.* APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis. **Gut.**, v. 40, n. 4, p. 521-525, abr. 1997.

GOSS, K.H.; GRODEN, J. Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. **J. Clin. Oncol.**, v. 18, n. 9, p. 1967-1979, mai. 2000.

GREEN, R.A.; KAPLAN, K.B. Chromosome instability in colorectal tumor cells is associated with defects in microtubule plus-end attachments caused by a dominant mutation in APC. **J. Cell Biol.**, v. 163, n. 5, p. 949-961, dez. 2003.

GRODEN, J. *et al.* Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. **Cell**, v. 66, n. 3, p. 589-600, ago. 1991.

GROVES, C. *et al.* Mutation cluster region, association between germline and somatic mutations and genotype-phenotype correlation in upper gastrointestinal familial adenomatous polyposis. **Am. J. Pathol.**, v. 160, n. 6, p. 2055-2061.

GUILFORD, P.; BLAIR, V.; MORE, H. A short guide to hereditary diffuse gastric cancer. *Hered.* **Cancer Clin. Pract.**, v. 5, n. 4, p. 183-194, dez. 2007.

HAAS, P.; ANTON, A.; DE FRANCISCO, A. Câncer colo retal no Brasil: consumo de grãos integrais como prevenção. **Rev. Bras. Anál. Clín.**, v. 39, p. 231-235, 2007.

HALF, E.; BERCOVICH, D.; ROZEN, P. Familial adenomatous polyposis. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 4:22, p. 1-23, out. 2009.

HANSON, C.A.; MILLER, J.R. Non-traditional roles for the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. **Gene**, v. 361, p. 1-12, nov. 2005.

HOSOGI, H. *et al.* Biallelic APC inactivation was responsible for functional adrenocortical adenoma in familial adenomatous polyposis with novel germline mutation of the APC gene: report of a case. **Jpn. J. Clin. Oncol.**, v. 39, n. 12, p. 837-846, dez. 2009.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil - Rio de Janeiro: INCA, 2013. 98pp.
JOSLYN, G. *et al.* Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. **Cell**, v. 66, n. 3, p. 601-613, ago. 1991.

JARRY, J. *et al.* A survey of APC mutations in Quebec. **Fam. Cancer**, v. 10, n. 4, dez. 2011.

KAPLAN, K. B. *et al.* A role for the adenomatous polyposis coli protein in chromosome segregation. **Nat. Cell Biol.**, v. 3, n. 4, p. 429-432, abr. 2001.

KAWASAKI, Y. *et al.* Asef, a link between the tumor suppressor APC and G-protein signaling. **Science**, v. 289, n. 5482, p. 1194-1197, ago. 2000.

KAWASAKI, Y.; SATO, R.; AKIYAMA, T. Mutated APC and Asef are involved in the migration of colorectal tumour cells. **Nat. Cell Biol.**, v. 5, n. 3, p. 211-215, mar. 2003.

KINZLER, K.W. *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. **Science**, v. 253, n. 5020, p. 661-665, ago. 1991.

KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. **Cell**, v. 87, n. 2, p. 159-170, out. 1996.

KOHLER, E.M. *et al.* Beta-catenin degradation mediated by the CID domain of APC provides a model for the selection of APC mutations in colorectal, desmoid and duodenal tumours. **Hum. Molec. Genet.**, v. 18, n. 2, p. 213-226, jan. 2009.

KOIFMAN, S. KOIFMAN, R.J. Stomach cancer incidence in Brazil: an ecologic study with selected risk factors. **Cad. Saúde Públ.**, v. 13(S1), p. 85-92, 1997.

LAMLUM, H. *et al.* The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet of Knudson's 'two-hit' hypothesis. **Nat. Med.**, v. 5, n. 9, p. 1071-1075, set. 1999.

LESKO, A. C.; GOSS, K.H.; PROSPETRI, J.R. Exploiting APC function as a novel cancer therapy. **Curr. Drug. Targets**, v. 15, n. 1, p. 90-102, jan. 2014.

LIBUTTI, S. K. *et al.* Cancer of the colon. *In* DE VITA, V. T., LAWRENCE, T. S., ROSENBERG, A. A. Cancer: principles & practice of oncology. 10th ed. Wolters Kluwer Health. 2015.

LØVIG, T. *et al.* APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal

carcinomas stratified by the microsatellite instability status. **Scand. J. Gastroenterol.**, v. 37, n. 10, p. 1184-1193, out. 2002.

MACRAE, F.; SART, D.; NASIOULAS, S. Familial adenomatous polyposis. **Best. Pract. Res. Clin Gastroenterol.**, v. 23, n. 2, p. 197-207, abr. 2009.

MIDGLEY, C.A. *et al.* APC expression in normal human tissues. **J. Pathol.**, v. 181, n. 4, p. 426-433, abr. 1997.

MINDE, D.P. *et al.* Messing up disorder: how do missense mutations in the tumor suppressor protein APC lead to cancer? **Mol. Cancer**, v. 10:101, p. 1-9, ago. 2011.

MIYAKI, M. *et al.* Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. **Cancer Res.**, v. 54, n. 11, p. 3011-3020, jun. 1994.

MIYOSHI, Y. *et al.* Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v. 89, n. 10, p. 4452-4456, mai. 1992.

MOUTINHO, V.; MAKINO, E. Epidemiological features of the gastric cancer in Belém (Brasil). **Arq. Bras. Cir. Dig.**, v. 3, p. 69-74. 1988.

MULKENS, J. *et al.* APC mutations in human colorectal adenomas: analysis of the mutation cluster region with temperature gradient gel electrophoresis and clinicopathological features. **J. Pathol.**, v. 185, n. 4, p. 360-365, ago. 1998.

NAGASE, H. *et al.* Screening for germ-line mutations in familial adenomatous polyposis patients: 61 new patients and a summary of 150 unrelated patients. **Hum. Mutat.**, v. 1, n. 6, p. 467-473, 1992.

NEUFELD, K.L.; WHITE, R.L. Nuclear and cytoplasmic localizations of the adenomatous polyposis coli protein. **Proc. Natl. Acad. Sci USA.**, v. n. 7, p. 3034-3039, abr. 1997.

NEUFELD, K.L. *et al.* Adenomatous polyposis coli protein contains two nuclear export signals and shuttles between the nucleus and cytoplasm. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 22, p. 12085-12090, out. 2000.

NEVES, F.J.; KOIFMAN, R.J.; MATTOS, I.E. Mortalidade por câncer de cólon e reto e consumo alimentar em capitais brasileiras selecionada. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 9, p. 112-120, 2006.

NEWTON, C.R.; GRAHAM, A.; HEPTINSTALL, L.E. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). **Nucleic Acids Res.**, v. 17, n. 7, p. 2503-2516, abr. 1989.

NIEUWENHUIS, M.H., VASEN, H.F.A. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 61, n. 2, p. 153-161, fev. 1997.

NISHISHO, I. *et al.* Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. **Science**, v. 253, n. 5020, p. 665-669, ago. 1991.

NUSSBAUM, R. Thompson & Thompson Genética Médica. Elsevier Brasil, 2008, 640p.

OLIVEIRA, C. *et al.* Quantification of epigenetic and genetic 2nd hits in CDH1 during hereditary diffuse gastric cancer syndrome progression. **Gastroenterology**, v. 136, n. 7, p. 2137–2148, jun. 2009.

OLSCHWANG, S. *et al.* Restriction of ocular fundus lesions to a specific subgroup of APC mutations in adenomatous polyposis coli patients. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 959-968, dez. 1993.

PARK, M.T.; LEE, S.J. Cell cycle and cancer. **J. Biochem. Mol. Biol.**, v. 36, n. 1, p. 60-65, jan. 2003.

PEIFER, M. Cancer, catenins, and cuticle pattern: a complex connection. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1667-1668, dez. 1993.

PENA, S.D. *et al.* DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 42, n. 10, p. 870-876, out. 2009.

PENMAN, G.A.; LEUNG, L.; NATHKE, I.S. The adenomatous polyposis coli protein (APC) exists in two distinct soluble complexes with different functions. **J. Cell Sci.**, v. 118, n. Pt 20, p. 4741-4750, out. 2005.

PLAWSKI, A.; SLOMSKI, R. APC gene mutations causing familial adenomatous polyposis in Polish patients. **J. Appl. Genet.**, v. 49, n. 4, p. 407-414, dez. 2008.

PLAWSKI, A. *et al.* Familial adenomatous polyposis of the colon. **Hered. Cancer Clin. Pract.**, v. 11, n. 1, p. 1-15, 2013.

POLAKIS, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1332, n. 3, p. 127-147, jun. 1997.

POWELL, S.M. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature.**, v. 359, n. 6392, p. 235-7, set. 1992.

POWELL, S.M. *et al.* APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. **Nature**, v. 359, n. 6392, p. 235-237, set. 1992.

RUBINFELD, B. *et al.* Association of the APC gene product with beta-catenin. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1731-1734, dez. 1993.

QIAGEN, qBiomarker Somatic Mutation PCR Handbook. 2011.

ROSIN-ARBESFELD, R.; TOWNSLEY, F.; BIENZ, M. The APC tumour suppressor has a nuclear export function. **Nature**, v. 406, n. 6799, p. 1009-1012, ago. 2000.

ROSSI, B.M. Síndrome de Lynch. In: **Rede Nacional de Câncer Familiar: Manual Operacional**. Instituto Nacional do Câncer, 2009, 229p.

ROWAN, A.J. *et al.* APC mutations in sporadic colorectal tumors: a mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 97, n. 7, p. 3352-3357, mar. 2000.

ROWLEY, P.T. Inherited susceptibility to colorectal cancer. **Annu. Rev. Med.**, v. 56, p. 539-554, 2005.

SANDAL, T. Molecular aspects of the mammalian cell cycle and cancer. **Oncologist**, v. 7, n. 1, p. 73-81, 2002.

SEGDITSAS, S. *et al.* Promoter hypermethylation leads to decreased APC mRNA expression in familial polyposis and sporadic colorectal tumours, but does not substitute for truncating mutations. **Exp. Mol. Pathol.**, v. 85, n. 3, p. 201-206, dez. 2008.

SHENG, J.Q. *et al.* APC gene mutations in Chinese familial adenomatous polyposis patients. **World. J. Gastroenterol.**, v. 16, n. 12, p. 1522-1526, mar. 2010.

SMITH, G. *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 99, n. 14, p. 9433-9438, jul. 2002.

SORAVIA, C. *et al.* Genotype-phenotype correlations in attenuated adenomatous polyposis coli. **Am. J. Hum Genet.**, v. 62, n. 6, p. 1290-1301, jun. 1998.

SORAVIA, C. *et al.* Familial adenomatous polyposis-associated thyroid cancer: a clinical, pathological, and molecular genetics study. **Am. J. Pathol.**, v. 154, n. 1, p. 127-135, jan. 1999.

SPIRIO, L. *et al.* Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 951-957, dez. 1993.

STELLA, A. *et al.* Four novel mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in FAP patients. **Hum. Mol. Genet.**, v. 3, n. 9, p. 1687-1688, set. 1994.

SUZUKI T. Produção acadêmica sobre a imigração e a cultura japonesa no Brasil. São Paulo: Agência Estado, 1992.

SU, L.K.; VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. **Science**, v. 262, n. 5140, p. 1734-1737, dez. 1993.

THIRLWELL, C. *et al.* Clonality assessment and clonal ordering of individual neoplastic crypts shows polyclonality of colorectal adenomas. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1441-1454, abr. 2010.

TORREZAN, Gb.T. *et al.* Mutational spectrum of the APC and MUTYH genes and genotype-phenotype correlations in Brazilian FAP, AFAP, and MAP patients. **Orphanet J. Rare Dis.**, v. 8:54, p. 1-17, abr. 2013.

TOYOTA, M. Aberrant methylation in gastric cancer associated with the CpG island methylator phenotype. **Cancer Res.**, v. 59, n. 21, p. 5438-5442, nov. 1999.

TUNCA, B. *et al.* Analysis of mismatch repair gene mutations in Turkish HNPCC patients. **Fam. Cancer.**, v. 9, n. 3, p. 365-376, set. 2010.

VANDROVCOVÁ, J. *et al.* Molecular Analysis of the APC and MYH genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. **Hum. Mutat.**, v. 23, n. 4, p. 397-404, abr. 2004.

VASEN, H.F.A. *et al.* Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). **Gut.**, v. 57, n. 5, p. 704-13, mai. 2008.

VIRMANI, *et al.* Aberrant methylation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene promoter 1A in breast and lung carcinomas. **Clin. Cancer Res.**, v. 7, n. 7, p. 1998-2004, jul. 2001.

WALLIS, Y.L. *et al.* Molecular analysis of the APC gene in 205 families: extended genotype-phenotype correlations in FAP and evidence for the role of APC amino acid changes in colorectal cancer predisposition. **J. Med. Genet.**, v. 36, n. 1, p. 14-20, jan. 1999.

WALLIS, Y.L. *et al.* Genotype-phenotype correlation between position of constitutional APC gene mutation and CHRPE expression in familial adenomatous polyposis. **Hum. Genet.**, v. 94, n. 5, p. 543-548, nov. 1994.

WEIR, B.; ZHAO, X.; MEYERSON, M. Somatic alterations in the human cancer genome. **Cancer Cell**, v. 6, n. 5, p. 433-438, nov. 2004.

YAGHOUBI, M. *et al.* Hereditary risk factors for the development of gastric cancer in younger patients. **BMC Gastroenterol.**, v. 4:28, out. 2004.