

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Ciências**  
**Departamento de Biologia Animal**



# **Estudo de mutações somáticas no gene *APC* em doentes com cancro do cólon e recto em idade jovem**

**Renata Bordeira Costa Carriço**

**Mestrado em Biologia Humana e Ambiente**

**2007**







Universidade de Lisboa  
Faculdade de Ciências  
Departamento de Biologia Animal



Dissertação

# **Estudo de mutações somáticas no gene *APC* em doentes com cancro do cólon e recto em idade jovem**

Centro de Investigação e Patobiologia Molecular do Instituto Português de Oncologia de  
Lisboa Francisco Gentil

**Renata Bordeira Costa Carriço**

**Mestrado em Biologia Humana e ambiente**

**Orientação externa: Doutora Jacinta Serpa**

**Orientação interna: Prof. Doutora Deodália Dias**

2007





*À memória de meus avós Veladomiro e Celeste  
e de meu pai Jacinto José*





## **Agradecimentos**

Após a realização deste trabalho, quero agradecer a todas as pessoas que foram importantes para a sua concretização e sem as quais não teria sido possível consegui-lo.

Ao Doutor Sérgio Dias, director do Centro de Investigação e Patobiologia Molecular do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (CIPM/IPOLFG), por me permitir desenvolver o presente trabalho na referida instituição.

À Doutora Marília Cravo, por ter respondido ao meu contacto e permitido a minha participação neste projecto, no Grupo de Gastroenterologia do CIPM/IPOLFG.

Ao Doutor Xavier Llor, pela contribuição para a realização deste projecto ao fornecer amostras de indivíduos provenientes do Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, em Barcelona, e à Doutora Isabel Veiga, pelas amostras provenientes do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil.

À Doutora Jacinta Serpa, quero expressar a minha gratidão por ter sido incansável na orientação que me deu ao longo de todo o trabalho, por ter estabelecido um elevado nível de exigência que foi fundamental para a minha formação, tendo-me criticado quando necessário (e quando não era preciso também), por estar sempre presente e disponível, pelo apoio e pela amizade, e por ser um exemplo excelente do que é trabalhar em Ciência, com honestidade e rectidão, razões pelas quais a considero a minha mentora.

À Prof. Doutora Deodália Dias, por ter aceite contribuir para a minha orientação neste trabalho, tendo mostrado sempre disponibilidade e simpatia para os esclarecimentos que foram sendo solicitados ao longo do corrente curso.

Aos colegas do grupo de Gastroenterologia do CIPM, por me terem ajudado a desenvolver a metodologia necessária à elaboração deste trabalho. Em particular, quero agradecer à Sofia, à Cheila e ao Bruno, que foram as pessoas que mais me ajudaram, mesmo quando já desesperavam com tanta pergunta, estiveram sempre lá.

Aos meus amigos, pelo apoio que me deram, pelos desabafos que ouviram e leram, principalmente a Ana, por todo o apoio que me deu, a Sendi, pelo constante apoio além fronteiras, e a Teresa, que ainda tentou ler o meu projecto, assistiu às apresentações e mobilizou apoiantes. Aos que também têm estado de presentes, como o João, a Catarina, a Inês e a Marisa. Aos meus amigos que, mesmo distantes, aguentaram os meus desabafos e me brindaram sempre com alegria e boa disposição, como o Paulo, o Pombo e a Susana.

Às minhas “manas”, Constança, Ivone e Margarida, por...serem isso mesmo.

Aos meus tios, Francisco e Susana, por terem sido desde sempre como uns avós para mim.

À minha mãe, por ser o principal pilar da minha vida e a quem devo o que sou até hoje.

Não posso deixar de referir aqui três pessoas que infelizmente já não estão entre nós, mas que foram e são extremamente importantes para mim, sendo a eles que dedico este trabalho: o meu pai, Jacinto José, por ter sido um pai exemplar, que sempre acreditou em mim e me incentivou a atingir objectivos mais altos; e os meus avós, que estiveram sempre presentes na minha vida, sendo muito mais que “avós”, amparando-me em todo o meu percurso, enquanto isso lhes foi possível.

## Resumo

O cancro colorectal (CCR) é uma das doenças malignas mais comuns no mundo ocidental, sendo mais frequente após os 50 anos, embora também possa surgir em pessoas com idade mais jovem. Existem três padrões específicos do CCR: hereditário, familiar e esporádico. O *Hereditary non-polyposis colon cancer* (HNPCC) e a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) são provocados por mutações germinais, nos genes de reparação *mismatch* (MMR) e no gene supressor tumoral *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*), respectivamente. O cancro do cólon esporádico, sem qualquer predisposição familiar ou hereditária, pode ser causado, em 80% dos casos, por mutações somáticas no *APC*. A perda alélica do *APC* ou a hipermetilação do seu promotor podem também estar na origem desta doença. Alterações noutros genes, como o *BRAF*, *K-ras* e *β-catenina*, podem também provocar um aumento da sinalização Wnt, ocorrendo em cerca 10%, 30-40% e em menos de 5% dos CCR.

O objectivo deste trabalho foi encontrar uma possível causa genética para o desenvolvimento precoce de CCR esporádico. Para tal o trabalho experimental foi efectuado em dois grupos de indivíduos, com idade  $\leq 45$  anos e  $\geq 50$  anos, nos quais foi feita a pesquisa de mutações somáticas no gene *APC*, análise de perda alélica análise do estado de metilação do promotor do *APC*, e a pesquisa de mutações nos hot-spots mutacionais dos genes *K-ras*, *BRAF* e *β-catenina*.

Os resultados observados indicam que a incidência de mutações no *APC* é inferior nos indivíduos mais jovens, sendo que a maioria das mutações que ocorrem nos indivíduos mais jovens originam proteínas truncadas que retêm mais de 2 domínios de regulação da *β-catenina*. Nos indivíduos jovens foram também observados níveis de instabilidade de microssatélites mais elevados, e maior incidência de mutações no *K-ras* e na *β-catenina*, embora em níveis mais baixos do que os observados noutros estudos, sendo a frequência de indivíduos com alterações no *APC* e noutros genes mais elevada, comparativamente aos indivíduos de idade mais avançada. Isto sugere que alterações no *APC* ou nos restantes genes analisados neste estudo, por si só, não estão na origem de CCR esporádico em idade jovem, mas levanta a hipótese de que a origem precoce desta doença poderá estar na ocorrência de mutações simultâneas em vários genes, que resulte numa maior agressividade na progressão maligna, ou eventualmente em alterações noutro gene não analisado neste estudo.

Palavras-chave: *APC*; cancro colorectal esporádico; instabilidade de microssatélites; LOH; *K-ras*; *β-catenina*

## Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common malignancies in the western world, mostly affecting patients over 50 years old, but it can also affect younger people. There are three specific patterns of CRC: hereditary, familial and sporadic. Hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC) and Familial Adenomatous Poliposis (FAP) are caused by germinal mutations, in mismatch repair genes (*MMR*) and in the tumour suppressor gene *Adenomatous Polyposis Coli* (*APC*), respectively. Sporadic CRC, with no hereditary or familial predisposition, can be caused, in 80% of the cases, by somatic mutations in the *APC* gene. Allelic loss of *APC* gene or hipermethylation of its promoter region can also cause this disease. *BRAF*, *K-ras* and *β-catenin* mutations can also increase Wnt signalling and may occur in 10%, 30-40% and less than 5% of CRC, respectively.

The aim of this study was to evaluate the profile of somatic *APC* gene alterations in patients with early-onset CRC. Tumour and mucosal samples from patients aged lower 45 and from patients aged over 50 were studied for *APC* truncating mutation, allelic loss, *APC* promoter hipermethylation, and *BRAF*, *K-ras* and *β-catenin* mutations.

The results show that younger patients have lower incidence of *APC* mutations, and these occur mainly in a region that origins truncated proteins with more than 2  $\beta$ -catenin regulating domains. Younger patients also have higher microsatellite instability, and higher frequency of *K-ras* and *β-catenin* mutations, though at lower levels than in other studies. This group also has a higher frequency of mutations in *APC* together with other genes, comparing with older patients. These results suggest that *APC* mutations *per se* are not the main cause for early on-set sporadic CRC, neither mutations in the other genes analysed here. However, it raises the hypothesis that early on-set sporadic CRC may result from mutations in more than one gene, so leading to a more aggressive malignant progression, or can result from mutations in other gene that was not analysed in this study.

Key-words: *APC*, *sporadic colorectal cancer*; *microsatellite instability*; *LOH*; *K-ras*; *β-catenin*

## Índice

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Índice.....	IX
Abreviaturas.....	XI
1. Introdução.....	1
1.1. Histologia do cólon.....	3
1.2. O cancro colorectal.....	5
1.3. A via de sinalização Wnt.....	6
1.4. O gene APC.....	8
1.5. Tumorigénese colorectal.....	11
1.6. Eventos epigenéticos.....	14
1.7. Perda alélica.....	15
1.8. Activação da via Wnt para além das mutações no <i>APC</i> .....	15
2. Objectivos.....	17
3. Procedimento experimental.....	19
3.1. Material biológico.....	21
3.2. Métodos.....	21
3.2.1. Extracção de ADN.....	21
3.2.2. <i>Polimerase Chain Reaction</i> (PCR).....	21
3.2.3. Protein Truncation Test (PTT).....	23
3.2.4. <i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i> (DGGE).....	24
3.2.5. Perda de Heterozigotia (LOH).....	26
3.2.6. Tratamento com Bissulfito.....	27
3.2.7. <i>Single Strand Conformational Polymorphism</i> (SSCP).....	28
3.2.8. Sequenciação automática.....	30
4. Resultados.....	33
5. Discussão.....	39
6. Conclusões.....	49
Bibliografia.....	53
Anexos.....	XIII



## Abreviaturas

- ADN – ácido desoxirribonucleico
- ADNc – ADN complementar
- APC – *Adenomatous polyposis coli*
- ARN – ácido ribonucleico
- ARNm – ARN mensageiro
- BRAF – *v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*
- CCR – cancro colorectal
- CK1 $\alpha/\epsilon$  – *casein kinase  $\alpha/\epsilon$*
- DGGE – *denaturing gradient gel electrophoresis*
- Dsh – *Disheveled*
- EB1 – *end-binding protein*
- EDTA – *ethylenediaminetetraacetic acid*
- GSK3 $\beta$  – *glycogen synthase kinase 3 $\beta$*
- hDLG – *human disc large*
- HMG box – *high mobility group box*
- HNPCC – *hereditary non-polyposis colorectal cancer*
- kDa – kilodaltons
- K-ras – *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- Lef-1 – *lymphoid enhancer factor-1*
- LOH – *loss of heterozygosity* (perda de heterozigotia)
- MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase*
- MCR – *Mutation Cluster Region*
- MLH1 – *mutL homolog 1*
- MMR – *mismatch repair*
- MSH2 – *mutS homolog 2*
- MSH6 – *mutS homolog 6*
- NaOH – hidróxido de sódio
- NES – sinal de exportação nuclear
- NLS – sinal de localização nuclear
- PAF – polipose adenomatosa familiar
- pb – pares de bases
- PCR – *polymerase chain reaction*
- PTT – *protein truncation test*

SSCP – *single stranded conformational polymorphism*

TAE – Tris-Acetato-EDTA

TBE – Tris-Borato-EDTA

TCF – *T cell factor*

TE – Tris-EDTA

Wnt – *wingless + integrated*

# **Introdução**

---



## **1. Introdução**

O cancro colorectal (CCR) é uma das doenças malignas mais comuns no mundo ocidental, sendo mais frequente após os 50 anos (1, 2). Estima-se que tenham surgido cerca de 875000 casos de cancro colorectal em todo o mundo, em 1996, constituindo cerca de 8.5% dos novos casos de cancro (3). Nos EUA, foram registados aproximadamente 140000 novos casos e 50000 óbitos por ano, enquanto na Europa registaram-se cerca de 213000 novos casos e 110000 óbitos por ano (4). As taxas de incidência variam aproximadamente 20 vezes em todo o mundo, sendo as taxas mais altas atingidas nos países desenvolvidos e as taxas mais baixas na Índia (3). Esta diferença na incidência de CCR parece resultar de factores ambientais e principalmente nutricionais (4). Embora na maioria dos estudos os resultados não sejam significativos, parece haver um risco aumentado de cancro do cólon com a ingestão de quantidades elevadas de carne e gordura animal. Por outro lado, existem resultados consistentes que apontam para uma redução desse risco com o elevado consumo de vegetais e fibras (3).

### **1.1. Histologia do cólon**

A histologia do cólon normal é caracterizada por criptas com cerca de 50 células de profundidade (3). No intestino delgado, as criptas e as vilosidades conferem uma maior área de superfície para a absorção de nutrientes. No intestino grosso não se observa esse aumento de superfície, mas é aqui que ocorre a absorção de água (3), drogas (5) e ácidos gordos de cadeia curta, como o acetato, propionato e butirato (6). Estes últimos resultam da fermentação bacteriana das fibras e hidratos de carbono e são rapidamente absorvidos pelas células do cólon, das quais o butirato constitui a principal fonte de energia (6). O efeito protector conferido pelas fibras ao intestino é em grande parte atribuído ao butirato, que é fundamental para impedir o desenvolvimento de doenças como a colite ulcerosa, a doença de Crohn ou a doença inflamatória do intestino (7). Ao nível metabólico o butirato pode seguir duas vias: a  $\beta$ -oxidação através da qual é degradado e origina acetil-CoA, que posteriormente entra no ciclo de Krebs com o objectivo de obtenção de energia, ou pode ser canalizado para a síntese de ácidos gordos de cadeia longa (8). Contudo, o butirato também desempenha um importante papel como inibidor de desacetilases de histonas (7, 9, 10), permitindo a transcrição de genes silenciados a nível epigenético (11). Deste modo, tem a capacidade de modular a expressão génica, transdução sinal e vias de sinalização proteica (7), desempenhando um papel fundamental na proliferação celular, ciclo celular, diferenciação celular e apoptose (7, 10).

A mucosa do intestino, tanto do cólon como do intestino delgado, é formada por epitélio colunar simples (12), constituído por 4 tipos de células diferenciadas: células de absorção, células de Goblet, células enteroendócrinas e células de Paneth (13, 14). As células de absorção são responsáveis pela absorção dos nutrientes resultantes da digestão, secretando também enzimas que contribuem para a hidrólise de açúcares e proteínas (12, 13); as células de Goblet secretam muco, que protege contra a abrasão e danos químicos, sendo mais abundantes na região posterior do intestino, nomeadamente no cólon; as células enteroendócrinas secretam hormonas como serotonina, substância P, colestoquinina, gastrina e secretina (13, 15); e as células de Paneth, que existem apenas no intestino delgado (12, 15, 16), secretam péptidos antimicrobianos como defensinas, assim como enzimas como lisozimas e fosfolipase A2 (13, 17), contribuindo para o controlo da flora intestinal (12).

As células estaminais estão localizadas na base da cripta e estão constantemente em divisão mitótica, dando origem a células indiferenciadas (16), com elevada capacidade de proliferação (14, 16). Estas células progenitoras encontram-se nos dois terços inferiores da cripta (14, 15) e migram no sentido ascendente à medida que se dividem até atingirem o terço superior da cripta, onde param de se dividir e começam a diferenciar-se (14). A estrutura das criptas e a dinâmica da replicação celular asseguram que as células progenitoras estejam de certo modo protegidas do ambiente mutagénico do lúmen do cólon (3). As células têm capacidade de auto-renovação bastante limitada; após 3 ou 4 divisões celulares diferenciam-se numa das linhagens celulares típicas do cólon (15). Ao atingirem a superfície, as células normais da cripta já estão diferenciadas e entram em apoptose (3), sendo absorvidas pelas células do estroma ou descartadas para o lúmen (16, 18). As diferentes linhagens celulares do cólon seguem esta dinâmica, no intestino delgado as células de Paneth migram no sentido descendente e ocupam a base da cripta (13, 14, 16, 19)(Fig.1). Estima-se que cada cripta contenha cerca de 1 a 6 células estaminais e no intestino de rato cada uma delas parece dividir-se uma vez por dia (13). Apesar do número de células estaminais no cólon e intestino delgado de humanos e ratos ser semelhante, a incidência de cancro em humanos é cerca de 70 vezes maior que em ratos, por razões ainda desconhecidas (13). Sabe-se que a via de sinalização Wnt está envolvida em diversos aspectos da biologia das células estaminais, incluindo a sua manutenção, proliferação e diferenciação nas criptas intestinais e subsequente posicionamento das células diferenciadas (14, 15). A proliferação ocorre sob a influência de factores de crescimento da família Wnt que poderão ser produzidos no estroma sob as células estaminais ou as próprias células epiteliais (14, 20). A migração das células progenitoras também é controlada por proteínas Wnt (21) e quando estas param de se dividir será provavelmente devido ao afastamento do local onde as proteínas Wnt são produzidas (14).

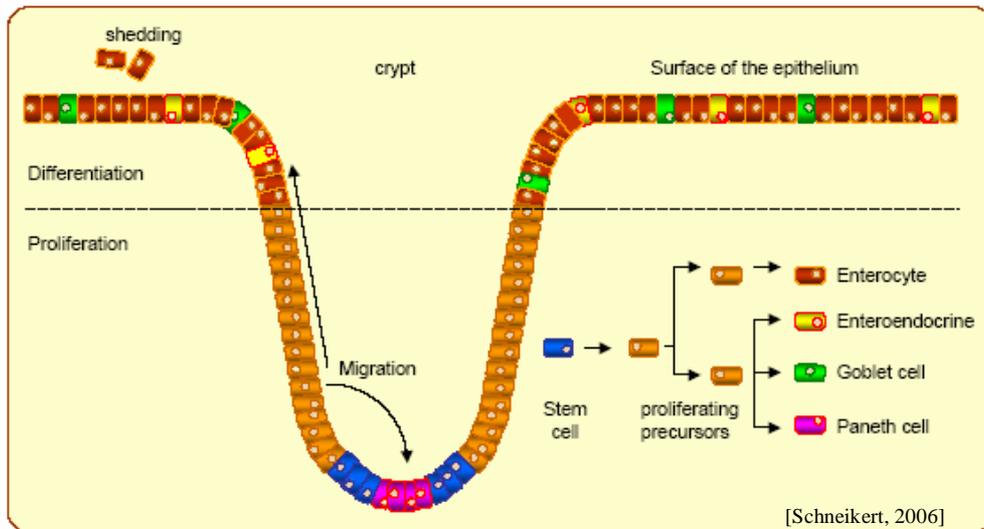


Fig. 1. Representação esquemática do epitélio intestinal. Tem uma superfície que forma invaginações designadas criptas em intervalos regulares. As células estaminais produzem permanentemente células proliferativas que migram e se diferenciam como enterócitos, células enteroendócrinas, células de goblet e células de Paneth.

## 1.2. O cancro colorectal

Os tumores colorectais passam por uma série de alterações histológicas, que constituem a sequência adenoma-carcinoma (que será apresentada no ponto 1.5.), cada uma delas acompanhada por uma alteração num oncogene ou gene supressor tumoral específicos (4). Este processo neoplásico nas células epiteliais do cólon pode ser iniciado por perda ou mutação do gene supressor tumoral *Adenomatous Polyposis Coli (APC)* (22).

Existem três principais grupos de CCR: hereditário, familiar e esporádico. Cancro colorectal hereditário não associado a polipose (*Hereditary non-polyposis colon cancer – HNPCC*), que inclui o síndrome de Lynch e o síndrome X (23). O síndrome de Lynch é uma doença autossómica caracterizada por alguns adenomas e ocorrência de cancros extra-cólicos específicos que se desenvolve a partir de alterações germinais em genes de reparação do ADN (*mismatch repair, MMR*) como *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, e contribui para 1-5% de incidência de CCR (24). O Síndrome X é uma doença que tem um fenótipo semelhante ao síndrome de Lynch, porém a origem genética é ainda desconhecida (23). A polipose adenomatosa familiar (PAF) é uma desordem autossómica dominante que contribui para menos de 1% dos diagnósticos de CCR. Doentes com PAF desenvolvem centenas a milhares de pólipos adenomatosos durante a 2ª e 3ª décadas de vida, e o número de pólipos aumenta o risco de CCR em cerca de 100% (24). A base genética para a PAF reside numa mutação germinal no gene *APC* (25). Uma segunda mutação somática ou perda alélica, inactiva o alelo normal do *APC* e leva a uma transformação maligna (24). O cancro do cólon esporádico, sem qualquer

predisposição familiar ou hereditária, é comum em pessoas com idade superior a 50 anos (1, 2), provavelmente como resultado de factores ambientais, principalmente a nível nutricional (2, 3). O CCR esporádico constitui aproximadamente 70% dos CCR na população, enquanto menos de 10% dos pacientes tem predisposição hereditária para o cancro do cólon (2). Mutações somáticas no *APC* surgem em cerca de 80% dos tumores colorectais esporádicos e ocorrem precocemente na tumorigénese colorectal (25-28).

O CCR esporádico, embora surja tipicamente em pessoas com idade mais avançada, também se desenvolve em pessoas mais jovens. Existem algumas diferenças nas características dos CCR destes dois grupos etários, tanto a nível clínico como a nível molecular (29), embora ainda seja desconhecida a causa do aparecimento de CCR esporádico em fases mais precoces da vida. Em doentes de idade mais avançada o carcinoma é geralmente mais diferenciado, enquanto que na maioria dos doentes jovens o CCR é pouco diferenciado, do tipo mucinoso, sendo patologicamente mais agressivo e encontrando-se num estágio mais avançado (29). Estes carcinomas pouco diferenciados estão associados a taxas de sobrevivência mais baixas (29). A nível molecular, em doentes jovens foi observada uma maior incidência de mutações no *p53* e maior quantidade de casos com instabilidade do microssatélites do que a observada em doentes de idade mais avançada (29).

Como já referido anteriormente, a instabilidade de microssatélites está associada ao HNPCC, ocorrendo em cerca de 90% dos casos (29), embora estas alterações em genes MMR possam também estar presentes em cerca de 10 a 15% dos CCR esporádicos (29-31). O CCR esporádico com instabilidade de microssatélites de alto grau caracteriza-se por uma baixa frequência de mutações nos genes *APC*, *β-catenina*, e *K-ras*, tendo elevada metilação do ADN e mutações no gene *BRAF*. (32). A maioria dos CCR esporádicos com instabilidade de microssatélites de alto grau desenvolvem adenomas serrados ou pólipos hiperplásicos, estando as mutações no *BRAF* restritas a esses adenomas (32).

### **1.3. A via de sinalização Wnt**

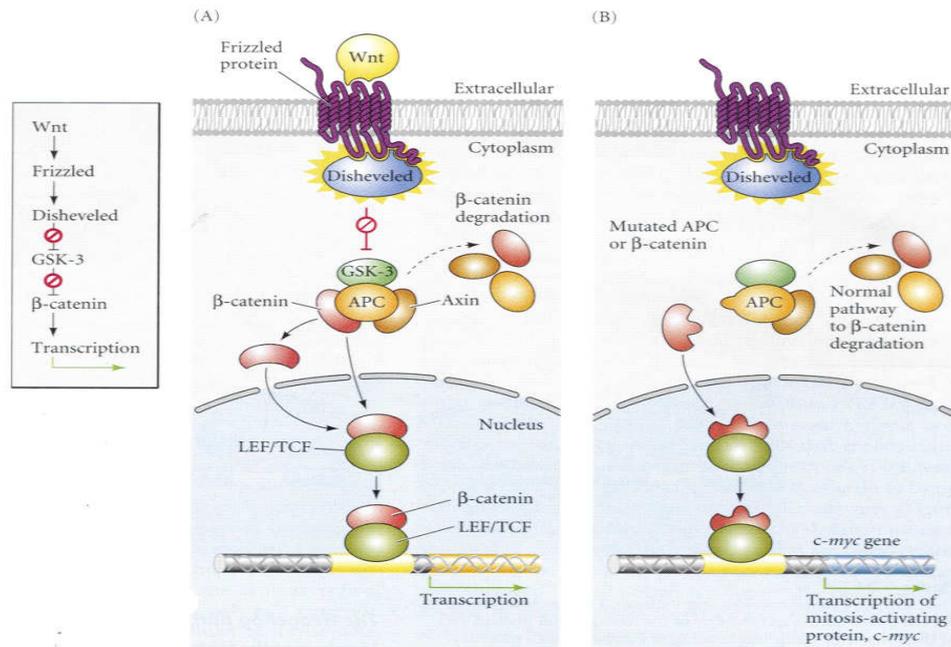
As proteínas Wnt formam uma família de moléculas de sinalização muito conservadas que regulam a embriogénese (33), ao induzir as células dorsais dos sómitos a diferenciarem-se em músculo, sendo também fundamentais no estabelecimento da polaridade do membros dos insectos e vertebrados e no desenvolvimento do sistema urogenital (34). A cascata de sinalização canónica Wnt controla o comportamento celular ao promover a ligação ao ADN de proteínas activadoras da transcrição pertencentes às famílias TCF (*T cell factor*) e Lef-1 (*lymphoid enhancer factor-1*). As proteínas Wnt induzem a estabilização da *β-catenina*

citoplasmática, que se liga ao TCF/Lef-1 no núcleo, activando a expressão de genes-alvo específicos (14, 34).

Na ausência de sinais Wnt, os níveis de  $\beta$ -catenina citoplasmática são normalmente controlados por um complexo de destruição multiproteico que marca a  $\beta$ -catenina para degradação em proteossomas (14, 28, 35). Este complexo é composto por um componente sequestrador, a axina ou a sua homóloga condutina (axina 2), que contém domínios de ligação à  $\beta$ -catenina, o supressor tumoral APC e as cinases GSK3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) e CK1 $\alpha/\epsilon$  (*casein kinase  $\alpha/\epsilon$* ). A principal função do complexo de destruição é promover a fosforilação da  $\beta$ -catenina (14, 36): a axina promove a ligação entre o APC e a GSK-3. O APC é fosforilado pela GSK-3, o que permite a ligação à  $\beta$ -catenina, que por sua vez também vai ser fosforilada pela GSK-3 (22). Estas alterações nos níveis de fosforilação marcam o complexo para ubiquitinação e subsequente degradação nos proteossomas (14, 22).

Quando as moléculas de sinalização Wnt se ligam aos seus receptores, que são membros da família *Frizzled*, é activada uma cascata de sinalização, conduzindo à activação de uma proteína designada por *Disheveled* (Dsh) (22, 33, 34, 37). Alguns trabalhos demonstram que, quando activada, a Dsh inibe a GSK-3 e o APC dissocia-se da  $\beta$ -catenina (34), enquanto que outros demonstram que a Dsh activada vai ligar-se directamente à axina, por um mecanismo ainda desconhecido (33) levando à sua degradação (14). De qualquer forma, com a activação da Dsh, a formação do complexo de destruição é impedida e conseqüentemente há acumulação de  $\beta$ -catenina citoplasmática livre. A  $\beta$ -catenina fica então disponível para ser translocada para o núcleo (33, 34) onde se liga a proteínas TCF/Lef que actuam como factores de transcrição, ligando-se à HMG box altamente conservada existente nos promotores de genes-alvo da via Wnt (33, 35, 36, 38, 39) como *c-MYC*, *TCF1*, *ciclina D1*, *CD44* (33, 36, 37, 40-42) (Fig. 2A). Se o APC estiver mutado, não se liga à  $\beta$ -catenina, pelo que esta entra no núcleo e pode activar genes de divisão celular e provocar a transformação celular (Fig. 2B) (34).

A via de sinalização Wnt desempenha um papel central na homeostasia intestinal e no cancro, regulando o equilíbrio entre a formação de células estaminais e a proliferação e diferenciação celulares no indivíduo adulto (36, 43). Esta regulação não só se observa nas criptas do intestino, como também nos folículos pilosos da pele (44), nas glândulas mamárias (45) e nos tecidos hematopoiéticos (36, 46). Assim, a activação constitutiva da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina pode desencadear a tumorigénese na pele (47), mama (48) e medula (20, 36).



[Gilbert, 2000]

Fig. 2. A via de sinalização Wnt. (A) A proteína Wnt liga-se ao seu receptor, membro da família de proteínas Frizzled. A proteína Frizzled activa então a Dishevelled, que vai inibir a GSK-3. Esta, quando activa, impede a dissociação da proteína APC da  $\beta$ -catenina, marcando esta para degradação (seta a tracejado). Então, inibindo a GSK-3, a sinalização Wnt permite que a  $\beta$ -catenina se associe com as proteínas LEF ou TCF para se tornar um factor de transcrição activo. (B) Se o gene APC ou da  $\beta$ -catenina estiverem mutados, de tal modo que as duas proteínas não se podem ligar, a  $\beta$ -catenina pode entrar no núcleo, activando certos genes de divisão celular e iniciando tumores.

## 1.4. O gene APC

O gene *APC* codifica uma proteína multifuncional que pode participar em vários processos como adesão celular e migração, transdução de sinal, organização dos microtúbulos e segregação cromossómica (4, 28, 49), apoptose, regulação do ciclo celular (28, 49), mitose e diferenciação neuronal (50). No entanto, apesar de cada um destes papéis estar potencialmente ligado ao cancro, parece que a principal função do *APC* como supressor tumoral reside na sua capacidade de regular os níveis intracelulares de  $\beta$ -catenina (4).

O gene *APC* nos humanos localiza-se na banda cromossómica 5q21-q22 (33) e consiste em 8535pb ao longo de 21 exões (25), dos quais apenas 16 são expressos (33). O ARNm tem 8538 nucleótidos e codifica uma proteína de 321-kDa (33) constituída por 2843 aminoácidos na sua isoforma mais comum (25, 33). O exão 10A, localizado a 3' do exão 10, é alvo de *splicing* alternativo que adiciona 18 aminoácidos à proteína APC quando traduzida. O exão 15 abrange mais de 75% da sequência codificante do *APC*, sendo o alvo mais comum de mutações truncantes germinais e somáticas (25).

A proteína APC possui um domínio de oligomerização e uma região *armadillo* na extremidade N-terminal; uma região central de sequências repetitivas de 15 e 20 aminoácidos,

que correspondem a domínios de ligação e de regulação da  $\beta$ -catenina, respectivamente (25, 33); e na extremidade C-terminal contém um domínio básico e de ligação à *end-binding protein* (EB1) (51) e à proteína *human disc large* (hDLG) (22, 25, 33, 52).

O domínio de oligomerização consiste em múltiplas repetições de resíduos hidrófobos que regulam a formação de homodímeros de APC (22). A retenção dos aminoácidos 6-57 no APC é essencial para esta oligomerização (25, 53). A presença de um domínio de oligomerização na extremidade N-terminal significa que o APC normal pode formar dímeros tanto com proteínas APC normais como com proteínas APC truncadas (25, 28). Se a quantidade de APC normal disponível for reduzida, não só pela presença de uma proteína mutante, como também pela dimerização da proteína APC normal que permanece, é possível que mutantes APC possam exercer um efeito dominante negativo na redução da função de supressor tumoral do APC (25, 54, 55).

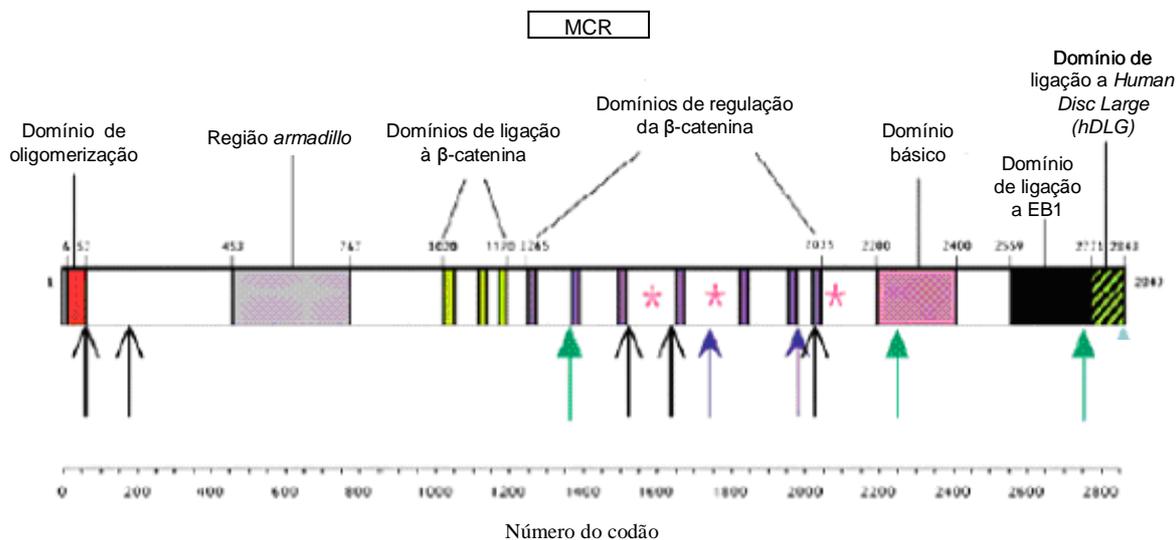
A região *armadillo* localiza-se entre os aminoácidos 453 e 766 e consiste em sete cópias de 42 aminoácidos. Os domínios *armadillo* foram identificados em diversas proteínas com diferentes actividades, incluindo o transporte nuclear, a adesão celular, a regulação do ciclo celular e a estabilização dos microtúbulos. De um modo geral, é aceite que se trata de um domínio de interacção proteína-proteína (33).

A  $\beta$ -catenina, por um lado tem actividade oncogénica quando a via de sinalização Wnt está activada, e por outro é um componente estrutural das junções aderentes nas células (33). No APC, uma série de 3 domínios de ligação à  $\beta$ -catenina (entre os resíduos 1020 e 1169) e uma série de 7 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina estão envolvidos na subexpressão deste oncogene (22). No CCR, os domínios de regulação da  $\beta$ -catenina são muitas vezes interrompidos por mutações truncantes, enquanto os domínios de ligação à  $\beta$ -catenina permanecem (33). Esta conclusão resulta do facto de tanto a proteína APC normal como a mutante se poder ligar à  $\beta$ -catenina (25). A degradação da  $\beta$ -catenina requer no mínimo três domínios de regulação (22). A *Mutation Cluster Region* (MCR) somática no gene APC encontra-se localizada aproximadamente entre as posições 1286 e 1513 (22, 25, 56), coincidindo a sua extremidade 3' com o final da sequência de regulação da  $\beta$ -catenina. Deste modo, a maioria das mutações no APC resultam em proteínas truncadas que perderam a região de regulação da  $\beta$ -catenina (22, 49, 57, 58). Existem “repeats” Ser-Ala-Met-Pro (SAMP) que constituem locais de ligação à axina ou à condutina (14, 25, 50). Na maioria das proteínas APC truncadas, pensa-se que a formação do complexo de destruição da  $\beta$ -catenina possa ser impedida devido à remoção dos locais SAMP da proteína APC, estando a extremidade 3' da MCR muito próxima do primeiro local SAMP (50).

A extremidade C-terminal do APC pode desempenhar um papel na progressão do ciclo celular ou controlo do crescimento (33, 51, 52). Esta região possui um domínio básico que se localiza entre os aminoácidos 2200 e 2400 e que confere à proteína APC a capacidade de se ligar aos microtúbulos e a proteínas que lhes estão associadas quando expresso transientemente nas células epiteliais, regulando também a polimerização de tubulina *in vitro* (22, 33).

Nos últimos anos, foi identificado um sinal de localização nuclear (NLS) na proteína APC (22). A proteína APC é demasiado grande para entrar no núcleo de forma independente mas os transportadores da membrana nuclear reconhecem a NLS e translocam a proteína através da membrana nuclear de forma dependente de fosforilação e de energia (22). Foram identificadas duas NLS entre os aminoácidos 1767-1772 (22, 33) e 2048-2053 (22). Consistente com a sua presença no núcleo, o APC tem 3 domínios que podem ligar-se preferencialmente a sequências promotoras ricas em A/T, regulando a transcrição de alguns genes (25).

Recentemente, vários grupos identificaram a presença de um sinal de exportação nuclear (NES) na extremidade N-terminal e na região de regulação da  $\beta$ -catenina no APC (33). Estas sequências NES altamente conservadas são usadas para exportar a  $\beta$ -catenina do núcleo para o complexo de destruição citoplasmático (25, 33). A ausência destas sequências NES levam à acumulação da  $\beta$ -catenina no núcleo, que causa uma activação dos genes alvo da via Wnt, o que pode resultar no desenvolvimento de tumores (33)(Fig. 3).



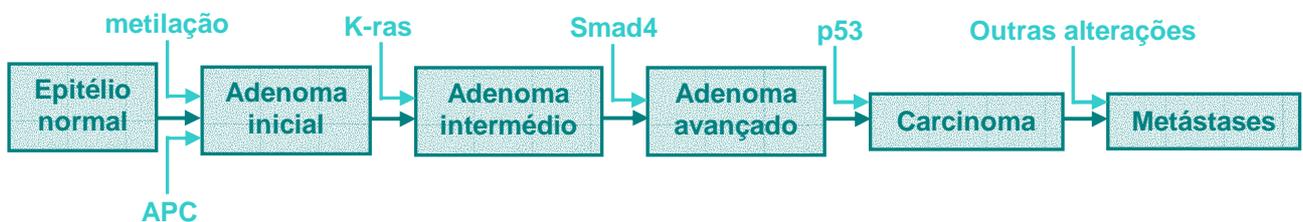
[Adaptado de Fearnhead et al., 2001]

Fig. 3. Domínios funcionais da proteína APC. Os asteriscos a rosa indicam domínios SAMP de ligação à axina. As setas a preto apontam para NES activas. As setas a roxo indicam regiões NLS. Setas verdes marcam domínios de ligação ao ADN.

## 1.5. Tumorigénese colorectal

Fearon e Vogelstein descreveram a base molecular de cancro do cólon esporádico como um modelo “multistep” de carcinogénese, designado de sequência adenoma-carcinoma, que descreve uma acumulação de eventos genéticos, cada um deles conferindo uma vantagem selectiva de crescimento a uma célula do cólon afectada (2, 59). Cada um destes eventos genéticos corresponde a diferentes lesões que a maioria dos cancros colorectais vão adquirindo à medida que progridem para um estágio mais invasivo (60) (Fig. 4).

As 4 principais conclusões do modelo de carcinogénese descrito para PAF mas que também se aplica a CCR esporádico (61, 62) são: 1) CCR resulta da activação mutacional de oncogenes e a inactivação de genes supressores tumorais; 2) são necessárias mutações somáticas em pelo menos 4 ou 5 genes de uma célula para que ocorra transformação maligna (2, 15, 59, 63); 3) a acumulação de múltiplas mutações genéticas determina o comportamento biológico do tumor, embora mutações no APC em geral ocorram precocemente no processo, enquanto que as mutações no *K-ras* e subsequentemente no gene supressor tumoral *p53* e deleções no cromossoma 18q ocorrem mais tardiamente no processo (2, 59, 61); 4) características do processo tumorigénico do CCR aplicam-se a outros tumores sólidos, como o cancro da mama e do pâncreas (2, 59, 63) (Fig. 4).



[Adaptado de Jubb et al. 2001]

Fig.4. Sequência adenoma-carcinoma: modelo genético para o desenvolvimento de cancro colorectal esporádico.

O desenvolvimento de CCR considera-se que ocorre principalmente através de 2 vias distintas: a via supressora e a via mutadora (62). A via supressora corresponde à já referida sequência adenoma-carcinoma e caracteriza-se pela ocorrência frequente de perda alélica em genes supressores tumorais e oncogenes e está associada a instabilidade cromossómica (61), levando geralmente à formação de clones tumorais aneuplóides (62). A via supressora está relacionada com a tumorigénese em PAF e em CCR (61, 62). A via mutadora é caracterizada pela inactivação de *mismatch repair genes (MMR)*, provocando instabilidade de microsatélites (61, 62), sendo a via pela qual se desenvolve o Síndrome de Lynch(62).

Knudson propôs uma hipótese explicativa para o facto de mutações em genes supressores tumorais provocarem cancro pela inactivação de forma independente de ambos os alelos – hipótese *two-hit* (2, 64). Quando um alelo de gene supressor tumoral com uma mutação germinal é herdado, só é necessária a anulação do alelo normal para que se dê a perda de função do gene (2, 64, 65).

Mais recentemente foi demonstrado que o APC não segue este modelo de forma exacta, pois parece haver uma interdependência entre os dois eventos, tanto em PAF onde se observa um evento germinal e outro somático (66) como em CCR esporádico onde se observam dois eventos somáticos (67, 68), tendo sido proposto o modelo *just-right signalling* para PAF (49). Segundo este modelo, de acordo com a posição da mutação germinal em relação aos domínios de regulação da  $\beta$ -catenina, existem três cenários possíveis:

1) se a mutação germinal resultar numa proteína truncada sem nenhum domínio de regulação (região a 3' da MCR), a maioria dos segundos eventos mutacionais resultam em proteínas truncadas com um, ou menos frequentemente dois, domínios de regulação;

2) quando a mutação germinal resulta numa proteína truncada com apenas um domínio de regulação (na região próxima do codão 1300), na maioria dos tumores o alelo normal do APC é removido por perda alélica (ou perda de heterozigotia – LOH); e

3) quando a mutação germinal resulta numa proteína truncada com pelo menos dois domínios de regulação (na região próxima do codão 1450), a maioria das mutações somáticas correspondentes resulta numa proteína truncada sem nenhum domínio de regulação da  $\beta$ -catenina (Fig. 5.) (49).

As regiões correspondentes aos codões 1300 e 1450 correspondem a dois “hot-spots” para mutações somáticas, localizados na MCR (25). Mais de 60% de todas as mutações somáticas do APC ocorrem em menos de 10% da região codificante MCR (25, 58). Em particular, as mutações germinais por volta do codão 1300 estão associadas a perda do alelo normal remanescente, enquanto as mutações a 3' e a 5' desta região mostram uma segunda mutação truncante (27). Esta situação é típica de PAF mas também se observa uma relação semelhante em CCR esporádicos (27, 67). Mutações no codão 1309 e na região imediatamente a 3' desse codão tendem a causar um fenótipo mais severo da PAF (25, 69).

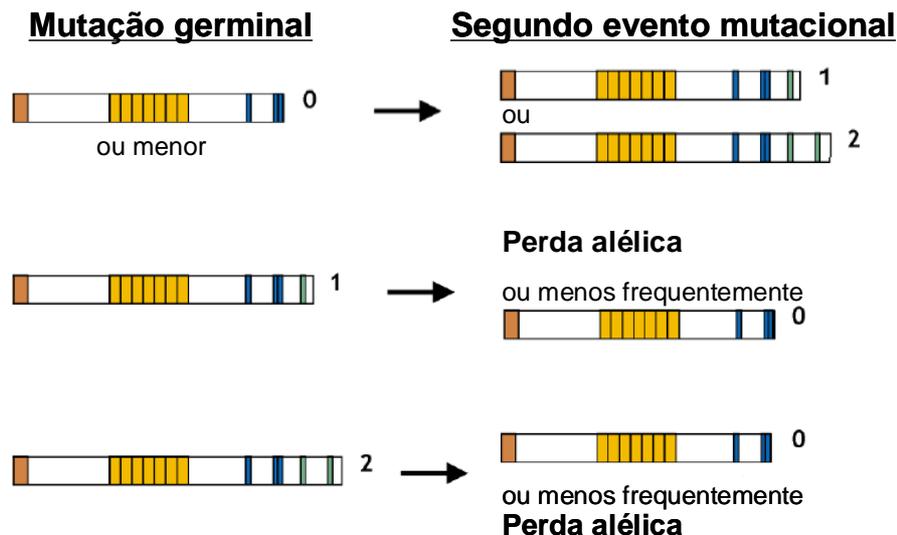
Segundo o modelo *just-right signalling*, parece haver uma vantagem selectiva para um dos dois eventos que resultam numa proteína truncada que retém um ou dois domínios de regulação da  $\beta$ -catenina (49, 67, 68). Ainda não se sabe porque razão há vantagem em manter uma proteína APC truncada em vez da deleção da sequência completa (50).

Uma hipótese avançada é que a proteína truncada possa desempenhar funções que a própria proteína normal não exerce (50). De acordo com esta hipótese, foi demonstrado que a

proteína APC truncada influencia a migração das células do cancro do cólon (70), aumenta a instabilidade cromossómica de forma dominante (27) e regula a degradação da  $\beta$ -catenina catalisada pela proteína APC normal (50, 69). A proteína truncada pode exercer funções essenciais, pelo que as células não sobrevivem a uma deleção completa de ambos os alelos (50). Recentemente foi demonstrado que a proteína APC truncada é necessária para níveis óptimos de proliferação celular e de replicação de ADN (50, 71).

O mecanismo de selecção pode também estar relacionado com a capacidade do APC regular a via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (49). Uma proteína truncada com apenas um domínio de regulação da  $\beta$ -catenina ainda tem capacidade de exportar a  $\beta$ -catenina do núcleo, contribuindo para reduzir a sua actividade sinalizadora (49, 72, 73). Proteínas truncadas com dois ou três domínios de regulação têm actividade residual considerável e podem reduzir a expressão de  $\beta$ -catenina de forma quase tão eficiente como a proteína APC quando esta é sobre-expressa *in vitro* (49, 69, 74-76). Nos casos em que uma segunda mutação somática resulta numa proteína truncada sem nenhum domínio de regulação da  $\beta$ -catenina, pensa-se que estas proteínas truncadas possam ter um efeito dominante negativo ao dimerizarem com a proteína mutante germinal e interferir na sua função, reduzindo assim a sua actividade residual a um nível vantajoso para a formação de tumores (49, 77-79). Foi também demonstrado que a sobre-expressão de  $\beta$ -catenina pode induzir apoptose quando transfectada para linhas celulares (49, 80) e promover a acumulação de p53 (49, 76). De acordo com o modelo *just-right signalling*, a regulação da via de transdução sinal Wnt/ $\beta$ -catenina pelo APC deve ser reduzida a um nível compatível com a sobrevivência celular (49). A selecção de proteínas APC truncadas com actividade residual suporta fortemente um modelo em que a inactivação completa do APC é menos vantajosa para a formação de tumor do que a manutenção de um nível residual específico de actividade (49).

Além das duas principais vias referidas anteriormente, foram identificadas outras vias, incluindo a serreada e a epigenética (61). A via serreada caracteriza-se pelo desenvolvimento de adenomas intermédios com histologia “serreada”. Esta via está associada a CCR com elevada instabilidade de microssatélites, mutações no gene *BRAF* e extensa metilação do ADN (81, 82). A via epigenética relaciona-se com o surgimento de efeitos epigenéticos associados à idade como potencial causa da carcinogénese colorectal (83).



[Adaptado de Albuquerque et al.2002]

Fig. 5. Localização e tipo de segundo evento mutacional em pólipos de PAF, dependendo da localização da mutação germinal. As mutações germinais e somáticas são representadas pelas respectivas proteínas truncadas (vermelho – domínio de oligomerização; laranja – região *armadillo*; azul – domínios de ligação à  $\beta$ -catenina; verde – domínios de regulação da  $\beta$ -catenina). Os números a seguir às proteínas indicam o número de domínios de regulação da  $\beta$ -catenina que permanecem na proteína truncada.

## 1.6. Eventos epigenéticos

Os eventos epigenéticos promovem alterações na expressão génica sem alterar o código genético, através da metilação de resíduos de citosina no ADN e diversas alterações covalentes nas histonas, com conseqüente reestruturação da cromatina (84). Estas alterações epigenéticas contribuem para uma utilização selectiva da informação genómica, através da activação ou inactivação da transcrição de genes durante a gametogénese, embriogénese ou diferenciação celular (85).

A metilação do ADN é um mecanismo epigenético de supressão da actividade genética (86). De um modo geral, nos tumores o ADN apresenta uma hipometilação global (87), com a ocorrência de zonas de hipermetilação (26, 87). De acordo com a hipótese de Knudson qualquer combinação de eventos genéticos e epigenéticos, como a metilação do promotor, inactivação mutacional ou LOH, podem constituir os dois eventos necessários para a inactivação do gene (88).

A metilação da citosina ocorre nos dinucleótidos 5'-CpG-3' (84). Em células somáticas normais, cerca de 70% das citosinas dos dinucleótidos CpG estão metilados, contudo a maioria das “ilhas” CpG estão em estado de hipometilação (85, 89-91). Estas ilhas CpG são sequências de ADN em que a proporção de dinucleótidos CpG é cerca de 60-70% mais elevada do que noutras regiões do ADN (85) e encontram-se no promotor de vários genes (84,

85). A metilação do ADN está associada à heterocromatização da cromatina (92), sendo que a heterocromatina consiste em cromatina inactiva a nível transcricional, caracterizada pela desacetilação das histonas, metilação do ADN e compactação dos nucleossomas (93).

Podem ocorrer alterações epigenéticas anómalas em estados precoces da carcinogénese (60, 84). A hipermetilação de promotores de genes constitutivamente expressos (*housekeeping*) e genes de expressão específica de tecido, associada à hipometilação global do genoma, podem levar a uma transformação maligna das células ou ao desenvolvimento de doenças autoimunes (85). Em células cancerosas pode existir um decréscimo do número de citosinas metiladas (hipometilação genómica) mas simultaneamente uma hipermetilação em regiões reguladoras (84, 94) que está fortemente associada ao silenciamento dos genes (60, 92).

A hipermetilação afecta frequentemente o promotor do *APC*, estando associada à perda de expressão de gene numa fase precoce da tumorigénese colorectal e ocorre em outros carcinomas de regiões do tracto gastrointestinal para além do cólon, como o estômago (34%), pâncreas (33%), fígado (33%) e esófago (15%) (26). Alguns estudos demonstraram que o promotor do *APC* está hipermetilado em 18% de CCRs esporádicos primários e adenomas, sendo que em 95% destes casos só o alelo normal é afectado; em PAF não está descrita a hipermetilação do promotor do alelo normal do *APC* (26).

### **1.7. Perda alélica**

A perda de heterozigotia de um gene supressor tumoral é considerada uma das etapas principais da carcinogénese do CCR. A LOH, a perda de um alelo num *locus* específico, é causada por uma deleção ou perda de um cromossoma de um par cromossómico. Quando ocorre num *locus* de um gene supressor tumoral em que um dos alelos já está mutado, pode resultar numa transformação neoplásica. Em CCRs, foi identificada perda alélica frequente nos cromossomas 5q (30%), 8p (40%), 17p (75-80%), 18q (80%) e 22q (20-30%) (95, 96). Em PAF, como referido anteriormente, a perda alélica é o segundo evento observado em cerca de 62% dos casos com mutação no codão 1300, sendo este o evento mais frequente (49). A análise de perda alélica tornou-se uma forma eficaz de identificação de possíveis genes supressores tumorais (95).

### **1.8. Activação da via Wnt para além das mutações no APC**

A activação da via Wnt pode resultar, não só de mutações no *APC*, mas também noutros genes. As alternativas melhor caracterizadas são as mutações activantes da  $\beta$ -catenina, que

podem causar a deleção completa do exão 3 ou a substituição de resíduos de serina e treonina que são codificados por este exão (97, 98). Estes resíduos são fosforilados pelo complexo de destruição, logo a mutação dos mesmos impede a ligação do complexo à  $\beta$ -catenina (97). As mutações na  $\beta$ -catenina e no APC não ocorrem em simultâneo, embora tenham efeitos diferentes pois as funções da região C-terminal do APC, que é removida pela maioria das mutações que ocorrem no gene, não têm equivalência em nenhuma região da  $\beta$ -catenina (97). Esta diferença entre as duas proteínas parece explicar porque, apesar de bastar uma mutação num só alelo da  $\beta$ -catenina para se desenvolver carcinoma, as mutações neste gene ocorrem em menos de 5% dos CCR, sendo necessários eventos noutros genes para terem o mesmo efeito que as mutações no APC (97).

A axina é um importante componente do complexo de destruição, pelo que mutações neste gene também podem provocar uma activação da via Wnt, estando descritas diversas mutações somáticas em CCR, principalmente nos códons 101, 102, 123, 395, 411 e 418 (97, 99). Alguns CCR que apresentam mutações na axina possuem também mutações no APC, mostrando que a axina não pode ser a única causa da activação da via Wnt nestes tumores. Em alguns tecidos, a condutina (axina 2) pode substituir a axina no complexo de destruição, estando descritas mutações neste gene em CCR com instabilidade de microssatélites, que envolvem inserções ou deleções em pequenos oligonucleótidos (97, 100).

O factor de transcrição TCF4 também é uma molécula chave na tumorigénese colorectal, contém um pequeno oligonucleótido que frequentemente sofre “slippage” em CCR com instabilidade de microssatélites. Esta alteração origina uma proteína truncada mais activa (97, 99).

A proteína *BRAF*, assim como a *K-ras*, integram a via de sinalização RAS/RAF/MAPK. Mutações activantes no oncogene *K-ras* actuam de forma sinérgica às mutações no APC pois também levam à acumulação de  $\beta$ -catenina no núcleo, e isso pode resultar num maior desenvolvimento tumoral e aumento da sua malignidade (36, 101). A *K-ras* activada provoca a fosforilação dos resíduos de tirosina da  $\beta$ -catenina, levando à sua libertação da E-caderina das junções aderentes e conseqüente aumento da sinalização Wnt no núcleo (36, 102). De modo semelhante, mutações somáticas activantes noutros genes da via RAS/RAF/MAPK, como o *BRAF*, encontradas em cerca de 10% dos CCR esporádico, parecem aumentar a via de sinalização Wnt através da fosforilação dos resíduos de tirosina da  $\beta$ -catenina, impedindo a ligação desta à E-caderina (36, 103-105). As mutações no *K-ras* estão presentes em 30-40% dos CCR (97, 103-106). Estudos *in vitro* mostram que mutações no *K-ras* também podem induzir uma activação da via Wnt através da estabilização da  $\beta$ -catenina, possivelmente inibindo a actividade da GSK-3 (97, 106).

## 1.9. Objectivos

Apesar da incidência de CCR esporádico ser muito mais elevada em indivíduos com idade mais avançada, esta doença também pode surgir em pessoas jovens. O objectivo deste trabalho foi encontrar uma possível causa genética para o desenvolvimento precoce de CCR esporádico.

Para tal, o trabalho experimental foi desenvolvido em dois grupos de indivíduos, com idade  $\leq 45$  anos e  $\geq 50$  anos, e decorreu segundo as seguintes etapas:

- Pesquisa de mutações somáticas no gene *APC*. A análise das mutações foi efectuada inicialmente a nível dos codões 654-1264 e 989-1700 do exão 15, que correspondem à região mais mutada (MCR) do *APC*. Em seguida foi analisada a restante região do exão 15 e os exões de 1 a 14 para os indivíduos que não apresentaram mutações na MCR.

- Análise de perda alélica utilizando marcadores de microssatélites localizados no cromossoma 5 numa região próxima do *APC*: o D5S1965 a 5' do *APC* e os restantes marcadores (D5S346, D5S656 e D5S421) a 3' do *APC*.

- Análise do estado de metilação do promotor do *APC*.

- Pesquisa de mutações nos hot-spots mutacionais dos genes *K-ras*, *BRAF* e  *$\beta$ -catenina*.



## **Procedimento experimental**

---



## **2. Procedimento experimental**

### **2.1. Material biológico**

O ADN analisado foi extraído de amostras congeladas de mucosa normal e de tecido tumoral de doentes com cancro do cólon esporádico. Foram analisados 2 grupos de doentes, divididos em função da sua faixa etária:

- Doentes com idade inferior a 45 anos (grupo  $\leq 45$  anos)
- Doentes com idade superior a 50 anos (grupo  $\geq 50$  anos)

A utilização das amostras analisadas neste estudo foi devidamente autorizada pelos doentes em questão.

As amostras dos doentes do grupo  $\geq 50$  anos provieram dos serviços de Gastrenterologia e de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG) – EPE. As amostras do grupo  $\leq 45$  anos foram disponibilizadas pelos serviços de Gastrenterologia e de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil (IPOLFG) – EPE, serviço de Genética do Instituto Português de Oncologia do Porto Francisco Gentil (IPOPG) – EPE e Fundació Institut d’Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, em Barcelona.

### **2.2. Métodos**

#### **2.2.1. Extração de ADN**

A extração de ADN dos tecidos foi realizada através da técnica de *salting-out* (107).

#### **2.2.2. Polimerase Chain Reaction (PCR)**

A PCR foi utilizada para amplificar as sequências do gene *APC* analisadas posteriormente pelos métodos referidos adiante. As PCR foram realizadas num volume final de 12,5  $\mu$ L com 100 ng de ADN, 3  $\mu$ mol de cada *primer* e 0,5 U de enzima *Taq polimerase* (Amersham), num termociclador (*Biometra*). No caso de fragmentos muito longos, com mais de 1000 pb como o caso dos fragmentos JQ, PT, as PCR foram realizadas com o *kit* comercial *Expand Long Template PCR System* (Roche). Relativamente à PCR para a análise da metilação do promotor do APC, foi utilizado o *kit AmpliTaq Gold with GeneAmp 10x PCR Buffer* (Roche). As condições de PCR específicas de cada fragmento são apresentadas na Tabela I.

A amplificação foi confirmada num gel de agarose 1,2% ou 2% em TBE com brometo de etídio (Anexo 1) consoante o tamanho dos fragmentos amplificados e visualizado no sistema de aquisição de imagem *Eagle-eye Stratagene*.



### 2.2.3 Protein Truncation Test (PTT)

A PTT consiste na transcrição *in vitro* de sequências codificantes, previamente amplificadas por PCR, que são depois traduzidas *in vitro* na respectiva proteína (108). O exão 15 do gene APC foi dividido em 4 fragmentos, que foram analisados por PTT, uma vez que as mutações que neles ocorrem originam codões STOP, resultando numa proteína truncada. Os fragmentos do exão 15 analisados foram: AF (654-1276), EJ (codões 989-1700), JQ (codões 1595-2334) e PT (codões 2101-2844).

Na amplificação por PCR, o *primer forward* utilizado (Tabela I) possui a 5' da sequência que se pretende amplificar, o promotor do vírus T7 para a iniciação da transcrição e um codão de iniciação da tradução (ATG), de modo a que estes processos possam ocorrer posteriormente *in vitro* (108).

A reacção de PTT foi feita utilizando o *kit TNT T7 Quick Coupled Transcription/Translation System (Promega)*. A mistura das reacções de PTT continha 9,3 µL de *master mix*, 0,25 µL de *enhancer* e 0,4 µL de metionina marcada com S<sup>35</sup>. Adicionou-se 3,5 µL de produto de PCR a esta mistura e deixou-se a incubar durante 1 h a 37°C. Como controlo positivo utilizou-se o ADNc de luciferase. A cada reacção juntou-se 25 µL de solução STOP, constituída por 1000 µL de tampão de amostra (Anexo 1) e 25 µL de β-mercaptoetanol. O marcador de tamanho utilizado (*Amersham Biosciences*) tem proteínas marcadas com <sup>14</sup>C com os seguintes pesos moleculares: 220,0 kDa; 97,4 kDa; 66,0 kDa; 46,0 kDa; 30,0 kDa; 14,3 kDa. As reacções foram preservadas a -20°C. As proteínas obtidas nesta reacção foram depois sujeitas a uma electroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (*SDS-PAGE*) (Anexo 2). Antes de serem aplicadas no gel, as amostras foram desnaturadas a 100°C durante 10 min e centrifugadas durante 3 min a 14000 rpm. A electroforese decorreu 30 min a 30 mA e cerca de 2h30 min a 254 V. O gel foi fixado numa solução de metanol 20% e ácido acético 10% durante 10 min, lavado com água destilada e colocado durante 20 min numa solução amplificadora de cintilante orgânico (*Amplify, Amersham Biosciences*). O gel foi seco a 80°C em vácuo, sendo posteriormente impressionado numa chapa radiográfica (*KODAK*) durante cerca de 1 semana, à temperatura ambiente. A chapa foi depois revelada num aparelho de revelação, *M35-M X-OMAT Processor (KODAK)*.

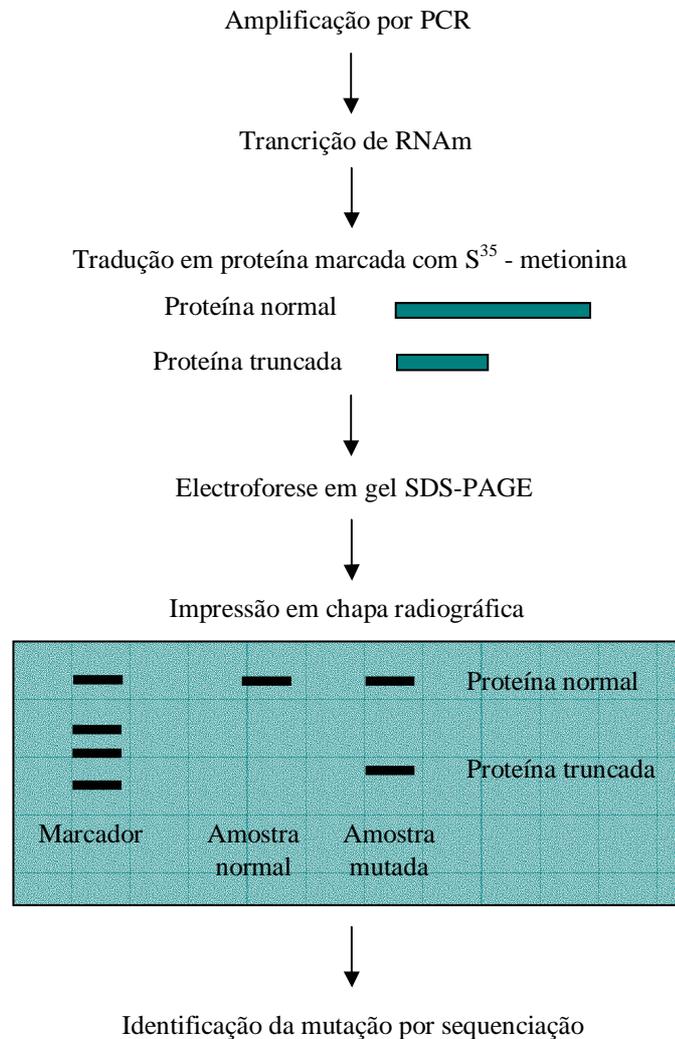
O codão alterado foi estimado com base numa recta de calibração, na qual se representa o logaritmo do peso molecular das diferentes proteínas que constituem o marcador de peso molecular em função da distância (cm) percorrida pelas mesmas proteínas no gel. A partir do peso molecular da proteína truncada procedeu-se ao cálculo da posição do codão STOP, através das seguintes equações:

$$AF = 654 + (...kDa) * 10 - 100$$

$$EJ = 989 + (...kDa) * 10 - 100$$

$$JQ = 1595 + (...kDa) * 10 - 100$$

$$PT = 2101 + (...kDa) * 10 - 100$$



**Fig.6** – Representação esquemática das principais etapas da PTT. Após a impressão radiográfica é possível distinguir proteínas mutadas de normais, que percorrem diferentes distâncias. As proteínas do marcador de peso molecular são fundamentais uma vez que, com base na distância por percorrida por cada uma, permitem a elaboração de uma recta de calibração, a partir da qual é depois calculado o peso molecular das proteínas truncadas.

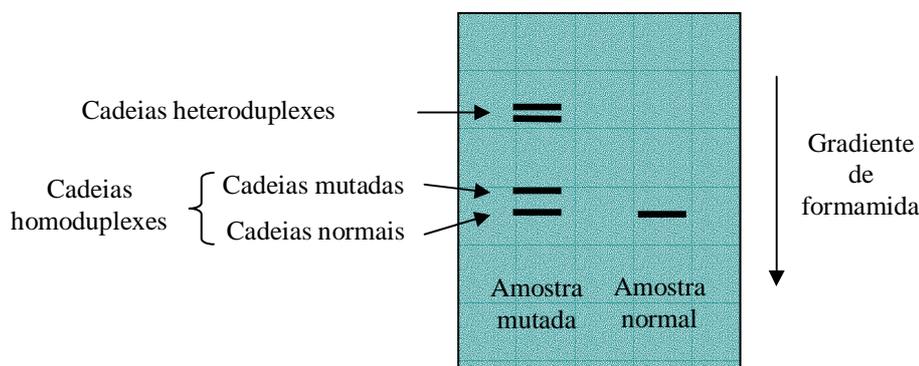
#### 2.2.4. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

Para os indivíduos que não apresentaram mutações no exão 15 do APC, foram analisados os exões de 1 a 14 do gene APC por *denaturing gradient gel electrophoresis* (DGGE).

A DGGE permite detectar a presença de mutações em fragmentos entre 200 e 700 pb, baseando-se nas diferentes forças de emparelhamento entre cadeias normais e cadeias mutadas (109). O passo inicial desta técnica é a amplificação por PCR da sequência a analisar. Esta reacção tem a particularidade de ter um gradiente de temperaturas que vão de 80°C a 20°C durante 15 seg cada, à excepção da temperatura de hibridação dos primers, cujo passo decorre a 30 seg. Este gradiente é muito importante pois permite a abertura e re-emparelhamento das cadeias permitindo a formação de homoduplexes e de heteroduplexes. O primer forward possui uma cauda rica em CG a 5' da sequência a amplificar, que é importante para garantir uma hibridação mais forte entre as cadeias amplificadas e impede a desnaturação total das cadeias na electroforese com gradiente de formamida (110).

Depois da PCR, adicionou-se ao produto da reacção 3,7 µL de solução de deposição (Anexo 3) e aplicou-se a mistura num gel de acrilamida com gradiente desnaturante de formamida (Anexo 3). A electroforese decorreu em tampão TAE 1x (Anexo 3), a 160 V e a uma temperatura constante de 60°C, sendo que o tempo de electroforese variou consoante o fragmento analisado (Anexo 3). Após a electroforese, o gel foi lavado com água e depois mergulhado numa solução com brometo de etídio, sendo posteriormente visualizado no sistema de aquisição de imagem *Eagle-eye Stratagene*.

À medida que as amostras percorrem o gel são separadas em função da desnaturação das cadeias pela acção da formamida. As cadeias heteroduplexes possuem ligações mais fracas, pelo que desnaturam e estabilizam a uma concentração mais baixa de formamida. Por outro lado, as cadeias homoduplexes estabelecem ligações mais fortes entre si, sendo necessária uma concentração mais elevada de formamida para que as cadeias desnaturem e estabilizem (109) (Fig. 7).



**Fig.7** – Esquema representativo de um gel de DGGE com uma amostra normal e uma amostra mutada e as diferentes localizações das respectivas cadeias. A amostra normal possui apenas cadeias homoduplexes normais, pelo que apresenta apenas uma banda. A amostra mutada exemplificada apresenta 4 bandas que correspondem a cadeias homoduplexes e heteroduplexes que estabilizam a diferentes concentrações diferentes de formamida.

### 2.2.5. Perda de heterozigotia (LOH)

Para a detecção de perda de heterozigotia (LOH), através de *GeneScan*, foram usados marcadores de microssatélites associados ao gene *APC*. Os marcadores usados neste estudo foram: D5S346, D5S421, D5S656, D5S1965, cuja localização se encontra indicada na Tabela II. Os marcadores localizam-se no braço longo do cromossoma 5, o D5S1965 a 5' do *APC* e os restantes a 3' do *APC*. Os marcadores foram amplificados através da utilização de um *primer forward* marcado com um fluorocromo (Tabela I).

**Tabela II** – Localização dos marcadores de microssatélites e do gene *APC* no cromossoma 5.

	Localização no cromossoma 5	Fluorocromo
<b>D5S421</b>	112882115-112882284pb	Tet
<b>D5S656</b>	112702941-112703127pb	Fam
<b>D5S346</b>	112241523-112241647pb	Hex
<b>Gene APC</b>	112203931-112204146pb	–
<b>D5S1965</b>	111837483-111837716pb	Tet

Neste método foram analisadas duas amostras de cada indivíduo em estudo, uma de tecido normal e outra de tecido tumoral, de modo a detectar a perda alélica no tumor. Foram adicionados 0,5 µL de produto de PCR directamente a 12 µL de formamida desionizada e 0,5 µL de *GeneScan Internal Lane Size Standard* marcado com o fluorocromo *Tamra*. Estas amostras foram então desnaturadas a 95°C durante 5 min, sendo colocadas em gelo imediatamente depois para impedir a renaturação das cadeias. A detecção dos marcadores foi realizada no *ABI Prism 319 Genetic Analyser* e os dados analisados através do *GeneScan Analysis Software* (111).

O cálculo da LOH foi feito com base no peso molecular dos alelos:

$$LOH = \frac{AN2/AN1}{AT2/AT1}$$

AN1 – área do pico do alelo da mucosa normal de menor peso molecular

AN2 – área do pico do alelo da mucosa normal de maior peso molecular

AT1 – área do pico do alelo da mucosa tumoral de menor peso molecular

AT2 – área do pico do alelo da mucosa tumoral de maior peso molecular

Um valor de  $LOH \leq 0,67$  indica que as amostras de tumor têm uma perda significativa do alelo de maior área, enquanto um valor  $\geq 1,5$  indica que as amostras de tumor têm uma perda significativa do alelo menor (111).

A análise pode ser informativa, quando o indivíduo é heterozigótico, e não informativa, quando o indivíduo é homozigótico. Isto porque quando o indivíduo é homozigótico, os alelos têm o mesmo peso, pelo que não se conseguem distinguir (111).

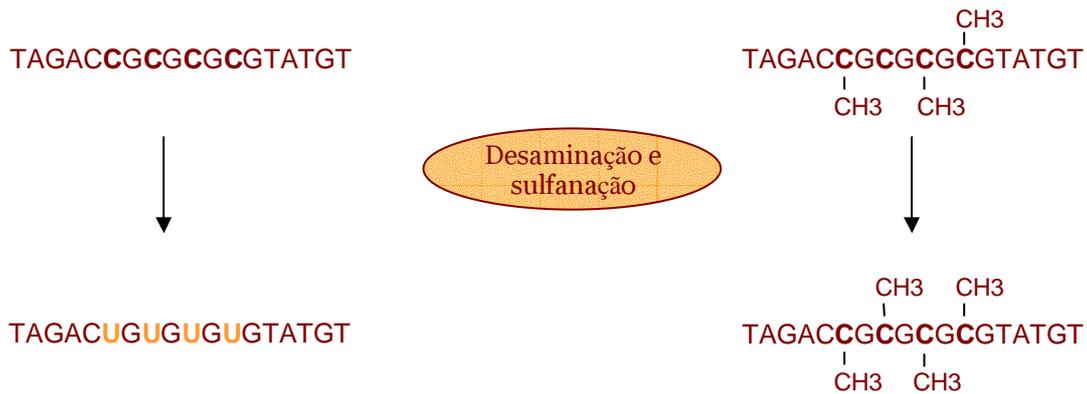
### 2.2.6. Tratamento com Bissulfito

Para a analisar a metilação do ADN foi utilizada a técnica de modificação pelo bissulfito (26) seguida de sequenciação.

O tratamento com bissulfito de sódio promove a alteração das citosinas que não estão metiladas, sendo convertidas em uracilos através de desaminação e sulfanação, enquanto que as 5-metilcitosinas não sofrem qualquer alteração. Deste modo, a sequência de ADN tratado difere, consoante o seu estado de metilação (112).

O tratamento com bissulfito foi realizado através do *CpGenome DNA Modification kit* (Chemicon International). Num tubo de 1,5 mL adicionou-se 7,0 µL de NaOH 3M previamente preparado a 1,0 µg de ADN em 100 µL de H<sub>2</sub>O e misturou-se. O ADN ficou a incubar durante 10 min a 50°C. Adicionou-se a esta mistura 550 µL de Reagente I de modificação de ADN preparado na altura e agitou-se no *vortex*, incubando novamente a 50°C por 4-16 h, protegido da luz. Adicionou-se 5 µL de Reagente III às soluções de ADN nos tubos. Juntou-se 750 µL de Reagente II, misturou-se e deixou-se a incubar durante 5-10 min. Centrifugou-se durante 10 seg a 5000 G e rejeitou-se o sobrenadante. Lavou-se o precipitado com 1,0 mL de etanol 70%, agitou-se em *vortex* e centrifugou-se durante 10 s a 5000 G, voltando a rejeitar o sobrenadante. Este procedimento foi repetido 3 vezes. Foram adicionados 50 µL de uma solução de NaOH 20 mM e etanol 70% às amostras, ressuspendendo o precipitado e deixou-se a incubar durante 5 min à temperatura ambiente. Adicionou-se 1,0 mL de etanol 90%, agitou-se em *vortex* para lavar o precipitado e centrifugou-se durante 10 seg a 5000 G, removendo depois o sobrenadante, e repetiu-se este procedimento mais uma vez. Após a remoção de todo o sobrenadante deixou-se o precipitado secar à temperatura ambiente durante 10-20 min. Depois de seco adicionou-se 10 µL de TE. A amostra ficou a incubar durante 15 min a 50-60°C para dissolver o ADN.

Posteriormente foi feita uma PCR na qual são usados *primers* específicos para o ADN tratado com bissulfito, que flanqueiam a região rica em CG do promotor do *APC* (Tabela I) entre as posições -366 e -42 relativamente ao codão de iniciação do exão 1 do *APC* (26). A região amplificada foi posteriormente sequenciada, de modo a analisar a existência de citosinas caso o ADN estivesse metilado, ou a existência de timidinas se o ADN não estivesse metilado.



**Fig. 8** – Representação esquemática das alterações que a sequência do ADN sofre aquando do tratamento com bissulfito de sódio. O ADN cujos resíduos de citosina não estão metilados sofrem desaminação e sulfanação, sendo transformados em uracilos, enquanto o ADN cujos resíduos de citosina estão metilados não sofre qualquer alteração.

### 2.2.7. *Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP)*

Os genes *BRAF*, *K-ras* e  *$\beta$ -catenina* foram analisados nas regiões onde se localizam os respectivos *hot-spots* mutacionais, através de SSCP (Tabela III). As condições de PCR encontram-se indicadas na Tabela I.

O SSCP permite a detecção de mutações em sequências de ADN de fragmentos entre 150 e 300 pb (110). Baseia-se na capacidade que a cadeia simples de ADN tem de formar uma estrutura secundária (110), ao serem estabelecidas ligações intermoleculares não covalentes em diversos locais da cadeia. Alterações nos nucleótidos de cada sequência induzem uma estrutura conformacional diferente das cadeias mutadas relativamente às cadeias normais, o que resulta numa velocidade de migração diferente durante a electroforese no gel de acrilamida-bisacrilamida não desnaturante (113).

Foram utilizados 2  $\mu$ L do produto de PCR das amostras a analisar, aos quais foram adicionados cerca de 5  $\mu$ L de solução de deposição desnaturante (Anexo 4) que confere densidade ao produto de PCR contribuindo para a sua deposição no gel (Anexo 4), permite controlar a frente de corrida e promove também a desnaturação das cadeias duplas permitindo a separação das cadeias simples que podem então adquirir a sua conformação característica ao longo do gel. As amostras foram sujeitas a desnaturação a 95°C durante 10 min, após o que foram colocadas em gelo imediatamente para evitar renaturação, sendo depois aplicadas no gel.

A electroforese decorreu a uma potência de cerca de 30 W e a uma temperatura de 4°C. O tampão utilizado na electroforese foi TBE 1x a 4°C. As condições de electroforese dos géis

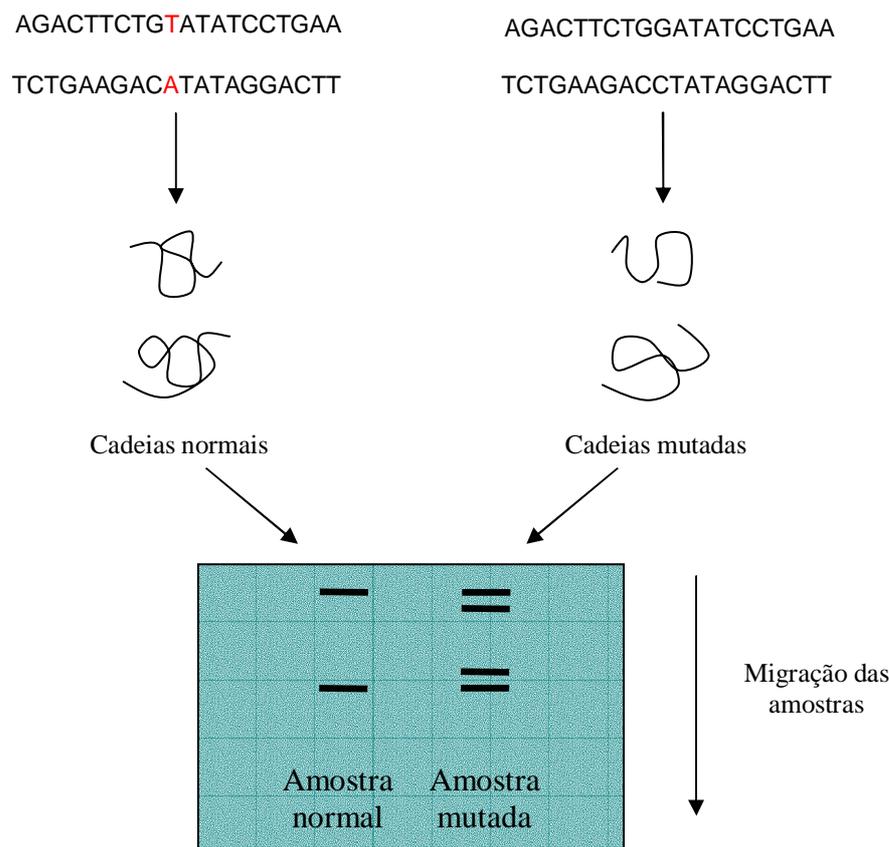
de SSCP utilizadas estão indicadas na Tabela III. No caso do gene *BRAF*, o gel utilizado continha também glicerol, que confere maior viscosidade à malha de poliacrilamida.

**Tabela III** – Condições de electroforese dos géis de SSCP para os diferentes genes analisados.

Gene	Exão	Gel acrilamida	Distância de migração (cm)
<i>BRAF</i>	15	8% com glicerol	32
<i>K-ras</i>	2	10% sem glicerol	23
<i><math>\beta</math>-catenina</i>	3	8% sem glicerol	20

Depois da electroforese, procedeu-se à coloração do gel com nitrato de prata. Começou-se por colocar o gel em etanol 10% durante 5 min, sem agitar. Em seguida recolheu-se o etanol e cobriu-se o gel com ácido nítrico 1.5%, deixando agitar durante 5 min. Após recolher o ácido nítrico, lavou-se abundantemente com água, colocando-se o gel numa solução com nitrato de prata (0,01M) durante 15 min, deixando-se a agitar protegido da luz. Em seguida recolheu-se o nitrato de prata e lavou-se abundantemente com água. Lavou-se com carbonato de sódio (0,3M), recolheu-se e em seguida juntou-se ao gel cerca de 250 ml de carbonato de sódio (0,3M) com 150  $\mu$ L de formaldeído (37%), agitou-se suavemente até visualizar bandas. Depois de recolher esta solução, adicionou-se uma solução de ácido acético 10%, durante 5 min, de modo a parar a reacção de revelação e fixar o gel. Depois de recolher o ácido acético, lavou-se abundantemente o gel com água, e em seguida fez-se aderir o gel a papel *Whatman 3MM*, cobriu-se com película aderente, e deixou-se secar.

As amostras mutadas foram posteriormente analisadas por sequenciação.



**Fig 9** – Esquema exemplificativo da análise por SSCP. Uma alteração a nível e um único nucleótido é suficiente para provocar uma alteração na conformação das cadeias simples 5' e 3', que vão migrar a uma velocidade diferente das cadeias 5' e 3' normais, resultando em diferentes bandas no gel após a electroforese. Em teoria a amostra mutada tem 4 bandas, porque tem duas cadeias forward e duas reverse pois além das normais tem também as cadeias mutadas. No entanto isto não é linear porque uma cadeia pode ter mais do que uma estrutura estável.

### 2.2.8. Sequenciação automática

A existência e a localização das mutações foram confirmadas por sequenciação automática. O ADN sequenciado serve de molde para a síntese de novas cadeias de ADN. A interrupção da polimerização das cadeias dá-se pela adição de 5'-trifosfato-2',3'-didesoxinucleótidos (ddNTPs), que são nucleótidos modificados que não possuem grupo hidroxilo na posição 3', não podendo estabelecer ligações fosfodiéster com novos dNTPs (114, 115).

Esta sequenciação automática baseia-se no método de *PCR cycle sequencing*, que envolve a amplificação linear com um único *primer* (114). Para isso são preparadas 2 reacções de sequenciação de cada amostra, uma para o *primer forward* e outra para o *reverse*, de modo às 2 cadeias de ADN poderem ser sequenciadas em separado. A reacção de sequenciação dá-se ao longo de 30 ciclos de desnaturação, hibridação e extensão (114). Os ddNTPs, marcados com diferentes fluorocromos, são adicionados no final de cada cadeia,

formando-se os produtos de sequenciação, que podem depois correr todos no mesmo capilar de electroforese (114).

Os fragmentos amplificados por PCR, com *primers* específicos (Tabela I), foram purificados através do *GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare)* e posteriormente sequenciados. A reacção de sequenciação consistiu em 2,5µL de produto de PCR purificado, 3,2 pmol de *primer forward* ou *reverse* e 4,5µL de *Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)*, num volume final de 20µL, sendo realizada no *ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)* e analisados pelo *DNA Sequencing Analysis Software*.



## **Resultados**

---



### 3. Resultados

No grupo  $\leq 45$  anos observaram-se 58,3% de indivíduos com mutações no gene *APC* enquanto que nos indivíduos do grupo  $> 50$  anos foram detectadas mutações em 66% dos casos (Tabela IV). É também de evidenciar que os níveis de instabilidade no grupo de indivíduos mais jovens (25%) eram superiores aos dos indivíduos de idade mais avançada (10%) (Tabela IV). No grupo  $> 50$  anos foram incluídos indivíduos que tinham sido previamente analisados e que não tinham instabilidade de microsatélites. Porém, 20 dos indivíduos do grupo  $> 50$  anos foram analisados de novo e desses 20 apenas 2 (10%) tinham instabilidade, pelo que os resultados podem ser considerados significativos.

No que diz respeito às mutações no gene *APC* na região a 5' da MCR do gene *APC*, que originam proteínas truncadas sem domínios de regulação da  $\beta$ -catenina, a frequência de indivíduos mutados do grupo  $> 50$  anos era cerca de 35%, sendo apenas 25% nos indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos (25%). Dois indivíduos do grupo  $> 50$  anos tinham mutações truncantes no codão 232, enquanto no grupo  $\leq 45$  anos, apenas um tinha uma mutação truncante fora do exão 15, mais precisamente no codão 499. As restantes mutações a 5' da MCR localizavam-se no exão 15, destacando-se o codão 1114, que se encontrava mutado em 2 indivíduos de ambas as faixas etárias.

Relativamente às mutações na MCR, as mais frequentes ocorreram entre os codões 1300 e 1367, que originam proteínas truncadas que retêm um domínio de regulação da  $\beta$ -catenina (97), correspondendo a 21% e 28% dos indivíduos mutados no *APC* nos grupos  $\leq 45$  anos e  $> 50$  anos, respectivamente (Tabela V). Outra região do gene *APC* frequentemente afectada foi a que se encontra na proximidade do codão 1450, que origina uma proteína truncada que retém dois domínios de regulação da  $\beta$ -catenina, e ocorreu mais frequentemente no grupo  $> 50$  anos, constituindo 36% dos indivíduos deste grupo com mutações no *APC*, correspondendo a 28,5% dos indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos (Anexo 5).

Foram também observadas mutações a 3' da MCR em apenas 2 indivíduos (5,4%) do grupo  $> 50$  anos (Tabela V), no codão 1556, originando proteínas truncadas que retêm 3 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina (Anexo 5). No grupo  $\leq 45$  anos, 29,2% dos indivíduos tinham mutações a 3' da MCR, embora a localização fosse diferente da observada no grupo  $> 50$  anos, pois localizavam-se entre os codões 1905 e 2820, dando origem a proteínas truncadas com mais de 5 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina (Anexo 5).

**Tabela IV** – Casos estudados para os genes APC, BRAF, K-ras e  $\beta$ -catenina nos grupos etários  $\leq 45$  anos e  $> 50$  anos.

Grupo	Casos n	APC n (%)		LOH n (%)		Braf n (%)		Kras n (%)		$\beta$ -catenina n (%)		
				Normal	Mutado	Normal	Mutado	Normal	Mutado	Normal	Mutado	
$\leq 45$	24	<b>Normal</b> (41,7%)	N	4 (16,6%)	4 (16,6%)	0 (0%)	4 (16,6%)	0 (0%)	4 (16,6%)	0 (0%)	4 (16,6%)	0 (0%)
			LOH	3 (12,5%)	3 (12,5%)	0 (0%)	2 (8,3%)	1 (4,2%)	3 (12,5%)	0 (0%)		
			NI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			I	3 (12,5%)	3 (12,5%)	0 (0%)	3 (12,5%)	0 (0%)	3 (12,5%)	0 (0%)		
		<b>Mutado Simples</b> (58,3%)	N	4 (16,6%)	4 (16,6%)	0 (0%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)	4 (16,6%)	0 (0%)		
			LOH	2 (8,3%)	2 (8,3%)	0 (0%)	1 (4,2%)	1 (4,2%)	2 (8,3%)	0 (0%)		
			NI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			I	5 (20,8%)	5 (20,8%)	0 (0%)	5 (20,8%)	0 (0%)	4 (16,6%)	1 (4,2%)		
		<b>Duplo</b> (12,5%)	N	1 (4,2%)	1 (4,2%)	0 (0%)	1 (4,2%)	0 (0%)	1 (4,2%)	0 (0%)		
			LOH	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			NI	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			I	2 (8,3%)	2 (8,3%)	0 (0%)	2 (8,3%)	0 (0%)	1 (4,2%)	1 (4,2%)		
$> 50$	37	<b>Normal</b> (32,4%)	N	6 (16,2%)	6 (16,2%)	0 (0%)	5 (13,5%)	1 (2,7%)	6 (16,2%)	0 (0%)		
			LOH	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)		
			NI	3 (8,1%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)		
			I	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)		
		<b>Mutado Simples</b> (67,6%)	NA	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)		
			N	9 (24,3%)	9 (24,3%)	0 (0%)	8 (21,6%)	0 (0%)	9 (24,3%)	0 (0%)		
			LOH	3 (8,1%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)		
			NI	3 (8,1%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)		
		<b>Duplo</b> (21,6%)	I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)		
			NA	2 (5,4%)	2 (5,4%)	0 (0%)	2 (5,4%)	0 (0%)	2 (5,4%)	0 (0%)		
			N	3 (8,1%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)	3 (8,1%)	0 (0%)		
			LOH	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)		
	NI	2 (5,4%)	2 (5,4%)	0 (0%)	2 (5,4%)	0 (0%)	2 (5,4%)	0 (0%)				
	I	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)				
	NA	1 (2,7%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)	1 (2,7%)	0 (0%)				

N- normal  
 LOH- perda de heterozigotia  
 NI- não informativo  
 I- instável  
 NA- não foi avaliado

Em termos globais, no total de indivíduos analisados, o padrão de domínios de regulação da  $\beta$ -catenina mais frequente foi aquele cujas mutações originam proteínas truncadas sem nenhum domínio de regulação e com mais de dois domínios de regulação, tendo uma frequência de 23% no total de indivíduos mutados no *APC* (Tabela V).

A quantidade de indivíduos com duas mutações truncantes no *APC* foi maior nos indivíduos do grupo  $> 50$  anos (29,7%), em comparação com o grupo  $\leq 45$  anos (12,5%) (Tabela V). Dos 14 indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos com mutação no *APC*, 5 (35,7%) tinham uma segunda alteração no gene, por LOH ou mutação pontual (Tabela VI). No grupo  $> 50$  anos, dos 25 indivíduos que tinham o *APC* afectado, 12 (48%) tinham uma segunda alteração no gene (Tabela VI). Observou-se que o segundo evento que ocorria com maior frequência nos dois grupos analisados foi uma mutação truncante no *APC*, sendo a incidência mais elevada nos indivíduos com idade superior a 50 anos (32%), comparativamente aos indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos (21,4%) (Tabela VI). No total das amostras analisadas, apenas 19% dos tumores tinham LOH no cromossoma 5q, não havendo diferenças significativas entre ambos os grupos etários (Tabelas VI). A incidência de LOH como segundo evento foi de 14,3% no grupo  $\leq 45$  anos e 16% no grupo  $> 50$  anos. Foram observados casos em que não foram detectadas mutações no *APC*, mas que apresentaram perda alélica do *APC*.

Apesar de ter sido efectuada a pesquisa do estado de metilação do promotor do *APC*, não foi possível obter resultados conclusivos, possivelmente devido ao mau estado do ADN das amostras analisadas.

A pesquisa de mutações na  $\beta$ -catenina demonstrou que apenas 2 indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos estavam mutados (8%), que correspondem a apenas 3% no total de indivíduos (Tabela VI). As mutações identificadas na  $\beta$ -catenina localizavam-se no codão 45, sendo uma das quais uma substituição de 134C $\rightarrow$ T, que levou a uma alteração de serina para fenilalanina, e a outra uma deleção de 3 pb que levou à perda do aminoácido serina (Anexo 5). Foi também observado que ambos os indivíduos mutados na  $\beta$ -catenina tinham mutações pontuais no gene *APC*, sendo um deles duplamente mutado neste gene (Tabela VI). Estes indivíduos eram também os únicos com instabilidade para os 4 marcadores de microssatélites analisados (Anexo 5).

Não foram detectadas mutações no gene *BRAF* em nenhum dos indivíduos analisados neste estudo.

A pesquisa de mutações no gene *K-ras* demonstrou que 3 em 24 (12,5%) indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos tinham mutações no gene *K-ras*, uma no codão 12 e duas no codão 13 (Tabela IV). No grupo  $> 50$  anos, apenas 1 em 37 (2,7 %) indivíduos tinham mutação no *K-*

*ras* (Tabela IV), uma também no codão 13. No grupo  $\leq 45$  anos, 2 dos indivíduos com mutações no *K-ras* tinham mutações no *APC*, em que num dos casos, além de haver uma mutação no *APC*, havia também LOH (Tabela VI). Dos indivíduos com mutações no *K-ras*, nenhum tinha instabilidade de microsatélites (Tabela IV).

De um modo geral 8 (13%) indivíduos não apresentaram mutações em nenhum dos genes analisados, sendo que 3 (12,5%) pertenciam ao grupo  $\leq 45$  anos e 5 (13,5%) do grupo  $> 50$  anos (Anexo 5).

**Tabela V** – Padrão de domínios de regulação da  $\beta$ -catenina em indivíduos com mutação no *APC*.

Grupo	APC n	Domínios de regulação da $\beta$ -catenina					
		0 n (%)	1 n (%)	>2 n (%)	0/1 n (%)	0/>2 n (%)	1/>2 n (%)
$\leq 45$	14	2 (14,3%)	2 (14,3%)	7 (50%)	1 (7%)	2 (14,3%)	0 (0%)
$> 50$	25	4 (16%)	5 (20%)	5 (20%)	2 (8%)	7 (28%)	2 (8%)

**Tabela VI** – Casos com mutação no gene *APC*, com dados relativos a LOH, mutação no *BRAF*, *K-ras* e  $\beta$ -catenina.

Grupo	1º evento	2º evento				
	APC n	APC n (%)	LOH n (%)	Braf n (%)	Kras n (%)	b-catenina n (%)
$\leq 45$	14	3 (21,4%)	2 (14,3%)	0 (0%)	2 <sup>#</sup> (14,3%)	2 <sup>&amp;</sup> (14,3%)
$> 50$	25	8 (32%)	4* (16%)	0 (0%)	1 (4%)	0 (0%)

\* 1 dos casos possui 2 mutações no *APC* e LOH

# 1 dos casos tem LOH

& 1 dos casos tem 2 mutações no *APC*

## **Discussão**

---



#### 4. Discussão

Os valores observados para a incidência de mutações no gene APC nos dois grupos etários estudados, 58% no grupo  $\leq 45$  anos e 66% no grupo  $> 50$  anos, enquadram-se nos valores apresentados em estudos anteriores, que mostram uma frequência de mutações no gene APC entre os 50% e os 83% em casos de CCR esporádico (67, 116).

Relativamente à instabilidade de microssatélites, os resultados obtidos estão de acordo com outros estudos em que se observa um aumento da frequência da instabilidade em indivíduos mais jovens na ordem dos 25% (29) a 28% (117). Contudo, a frequência de instabilidade em indivíduos mais velhos no nosso estudo (10%) difere dos valores obtidos nesses estudos, sendo mais baixa do que os 20,6% observados no primeiro (29) e mais alta do que os 5,9% obtidos no segundo estudo referido (117). Em termos globais, cerca de 12% dos casos aqui analisados têm instabilidade de microssatélites, que é um valor próximo dos 15% descritos para CCR esporádicos (29, 118-120). A hipermetilação da região do promotor *MLH1* foi sugerida como um possível mecanismo primário para o desenvolvimento de CRC esporádico (29, 119). Perante os valores de instabilidade de microssatélites observados no grupo  $\leq 45$  anos, e sendo significativamente superiores aos valores observados nos indivíduos com idade  $> 50$  anos, é de considerar a hipótese de existirem alterações, a nível epigenético ou genético, nos genes *MMR* na origem de CCR esporádico precoce.

Estudos anteriores indicam que CCR com instabilidade de microssatélites de alto grau têm determinadas características clínico-patológicas, nomeadamente reduzida diferenciação tumoral, acumulação extracelular de mucinas (29, 32, 118, 121, 122), geralmente localizam-se no cólon direito (29, 118, 121, 122) e ocorrem mais frequentemente em idade jovem, ao contrário do que se observa nos CCR estáveis (29, 121). O fenótipo característico de instabilidade de microssatélites de alto grau é característico de *HNPCC* (29, 32, 122) mas também ocorre em CCR esporádico (32). No presente estudo, os indivíduos jovens com instabilidade nos 4 marcadores estudados não tinham tumores localizados no cólon direito mas sim no esquerdo. Porém, num destes casos o tumor era do tipo mucinoso, o que está de acordo com as referidas características dos tumores com instabilidade de alto grau. Na literatura encontram-se estudos que consideram que doentes com instabilidade de microssatélites cujos tumores se caracterizam por serem pouco diferenciados e mucinosos estão associados a um melhor prognóstico do que os tumores estáveis (29, 118, 120, 123). Contudo, outros estudos defendem que tumores pouco diferenciados estão associados a uma taxa de sobrevivência mais baixa (29), e a observação clínica de que os pólipos associados a

HNPCC se tornam malignos mais rapidamente do que os pólipos esporádicos estáveis, sugerem que as alterações nos genes MMR, que resultam na instabilidade de microsatélites, podem acelerar a progressão tumoral (119).

Alguns dos indivíduos analisados apresentaram mutações na região a 5' da MCR do gene *APC*, sendo a frequência maior no grupo > 50 anos (35%) do que no grupo ≤ 45 anos (25%). As mutações truncantes no codão 232 encontradas em indivíduos do grupo > 50 anos foram previamente descritas em doentes com PAF (124, 125). A única mutação truncante fora do exão 15 encontrada no grupo ≤ 45 anos localizava-se no codão 499, não tendo ainda sido descrita em estudos anteriores. A maioria das mutações a 5' da MCR ocorreu no exão 15 do *APC*, sendo que o codão 1114 estava mutado em dois indivíduos de ambos os grupos etários analisados, mutação já descrita em PAF e em CCR esporádico (67).

De um modo geral, as mutações localizadas na MCR ocorreram mais frequentemente entre os codões 1300 e 1367, que originam proteínas truncadas que retêm 1 domínio de regulação da  $\beta$ -catenina (97) e na proximidade do codão 1450, que originam proteínas truncadas que retêm 2 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina. No caso da região do codão 1450, foram consideradas mutações localizadas entre os codões 1397 e 1477, que originam o mesmo tipo de proteína, embora o 1450 tenha sido o codão mais frequentemente afectado nesta região. As regiões próximas dos codões 1300 e 1450 do *APC* correspondem a “hotspots” mutacionais, estando frequentemente mutadas em CCR esporádico e PAF (49, 67, 126). Foi também identificada uma mutação no codão 1465, no grupo > 50 anos, previamente descrita em PAF (127, 128) e em carcinoma do pulmão (129).

Na região a 3' da MCR foram também observadas mutações, havendo diferenças entre os dois grupos etários. No grupo > 50 anos detectaram-se mutações nesta região em apenas 2 indivíduos, mais precisamente no codão 1556, que originam uma proteína truncada com 3 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina. As mutações nesta região foram consideradas por alguns autores como um possível “hotspot” no *APC*, correspondendo a 15% das mutações truncantes em CCR esporádicos (67). Contudo, também em pólipos glandulares fúndicos de doentes com PAF (127, 130) e em cancro gastrointestinal, foi observada elevada frequência de mutações neste codão (67, 126, 131). As mutações nesta região estão associadas à ocorrência de adenomatose duodenal severa em doentes com PAF (130). No grupo ≤ 45 anos, o padrão mais frequente que se observou foram proteínas que retêm mais de 5 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina, encontrando-se as respectivas mutações entre os codões 1905 e 2820. Ou seja, a maioria das mutações encontradas nos indivíduos mais jovens estão numa região mais terminal do *APC*, originando proteínas truncadas que mantêm a maioria das funções do

APC, principalmente no que diz respeito à regulação da  $\beta$ -catenina. Em contrapartida, apenas 2 indivíduos do grupo  $> 50$  anos têm mutações a 3' da MCR, e numa região em que as respectivas proteínas retêm no máximo 3 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina. As mutações nas extremidades 5' e 3' do gene *APC* estão relacionadas com um fenótipo menos severo de PAF (132, 133). Seria de esperar que as mutações associadas a um fenótipo mais severo de PAF, como as próximas do codão 1300, e que parecem conferir vantagem à progressão tumoral (49), também estivessem associadas ao desenvolvimento de CCR esporádico numa idade mais jovem. É um pouco surpreendente que as mutações encontradas maioritariamente em doentes jovens com CCR esporádico estejam associadas a um fenótipo pouco severo de PAF. Isto sugere que a principal razão para o desenvolvimento de CCR esporádico em idade mais jovem não se deve a mutações no gene *APC*. Um estudo realizado em CCR esporádico (117), em que também foram comparados indivíduos jovens com indivíduos de idade mais avançada, refere que os CCR em indivíduos jovens há uma incidência mais elevada de tumores que atingem um estágio mais agressivo, e que estes tumores têm uma baixa frequência de mutações no gene *APC* e maior instabilidade de microssatélites. No presente estudo, apenas foi possível obter informações a nível clínico de 13 indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos, 5 (38%) dos quais tinham tumores num estágio mais agressivo e destes, apenas 1 não tinha mutações no *APC*. Acerca dos restantes indivíduos analisados, não foi possível obter mais informações acerca dos respectivos tumores, não sendo possível comparar os resultados nesse sentido. Os dados obtidos parecem contradizer o observado por outros autores, mas o reduzido número de casos não permite tirar conclusões nesse sentido. Todavia, o facto de estar descrita uma baixa incidência de mutações no *APC* em indivíduos jovens com tumores mais agressivos (117) apoia a hipótese de que o *APC* não terá um papel importante no desenvolvimento de CCR esporádico em idade jovem.

O padrão de domínios de regulação da  $\beta$ -catenina mais frequente foi aquele em que os indivíduos possuem simultaneamente mutações que originam proteínas truncadas sem nenhum domínio de regulação e com mais de 2 domínios de regulação, tendo uma frequência de 23% no total de indivíduos mutados no *APC* (Tabela V). Estes resultados diferem do que foi previamente descrito, pois cerca de 59% dos indivíduos com mutação próxima do codão 1300 e que retêm 1 domínio de regulação da  $\beta$ -catenina têm como segundo evento LOH (66, 67).

O facto de se observarem mais indivíduos com mutações truncantes no *APC* no grupo  $> 50$  anos (29,7%) comparativamente ao grupo  $\leq 45$  anos (12,5%), está de acordo com o esperado pois o número de eventos mutacionais tende a aumentar com a idade, uma vez que

com a idade aumenta a susceptibilidade para desenvolver neoplasias, havendo acumulação de alterações genéticas (117) (Tabela IV). Analisando apenas os indivíduos que tinham um “primeiro evento” no gene APC, cerca de 35,7% destes no grupo  $\leq 45$  anos tinham uma segunda alteração no gene, por LOH ou mutação pontual, comparativamente com 48% dos indivíduos do grupo  $> 50$  anos (Tabela VI). Estes valores estão abaixo dos valores previamente descritos para CCR esporádico em que 88% dos indivíduos com mutação no APC tinham um segundo evento no mesmo gene (67). O segundo evento mais frequente em ambos os grupos foi uma segunda mutação no APC, embora a incidência seja maior nos indivíduos com idade superior a 50 anos (32%), comparativamente aos indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos (21,4%). Relativamente à ocorrência de LOH como segundo evento no APC, não há diferenças entre os dois grupos etários, sendo o valor de LOH no total de indivíduos analisados 19% (Tabela VI), que é inferior ao que está descrito para CCR esporádico (48%) (67). Como já referido anteriormente, as mutações próximas do codão 1300 estão muitas vezes associadas a LOH no alelo remanescente, tanto em PAF como em CCR esporádico (49, 66, 67). Seria então de esperar que nestes casos aqui analisados com mutação na região do codão 1300, a incidência de LOH fosse mais elevada, mas não é isso que se observa pois apenas 30% dos casos de LOH ocorrem em indivíduos em que existe mutação na referida região do APC, ao contrário dos 59% determinados em linhas celulares de CCR esporádico (67).

Relativamente aos outros genes analisados, foram encontradas mutações na  *$\beta$ -catenina* em apenas 2 indivíduos, pertencentes ao grupo  $\leq 45$  anos (8%), que constituem apenas 3% do total de indivíduos (Tabela VI). Segundo alguns estudos, as mutações na  *$\beta$ -catenina* ocorrem em 10% dos CCR esporádicos (14) enquanto que outros autores demonstraram níveis muito baixos de mutações na  *$\beta$ -catenina* (122), pelo que se pode considerar que os 3% observados se enquadram nos valores descritos para CCR esporádico. As mutações identificadas na  *$\beta$ -catenina* localizavam-se no codão 45, que corresponde a uma serina localizada perto da extremidade N-terminal que é um local de fosforilação da  *$\beta$ -catenina* pela GSK-3 (134). Substituições de aminoácidos envolvendo os resíduos de serina ou treonina no exão 3 da  *$\beta$ -catenina* foram descritas em cancro colorectal e melanoma (135-137). Estes locais de fosforilação correspondem aos codões 31, 33, 37 e 45, onde as mutações têm um carácter oncogénico, sendo activantes da  *$\beta$ -catenina*, uma vez que a estabilizam, impedindo que seja marcada para degradação (122). Pensa-se que estes locais de fosforilação tenham um papel central na regulação que a GSK-3 e o APC fazem sobre a  *$\beta$ -catenina* (134).

Foi também observado que ambos os indivíduos com mutação na  $\beta$ -catenina têm mutações pontuais no gene APC, sendo um deles duplamente mutado neste gene (Tabela VI). Estes resultados contrariam resultados de estudos anteriores, que sugerem que as mutações no APC e na  $\beta$ -catenina são mutuamente exclusivas (122, 134), ou seja quando um dos genes se encontra mutado não se observam mutações no outro. Estes resultados são ainda mais interessantes, pois as mutações na  $\beta$ -catenina teriam supostamente o mesmo efeito que as mutações no APC, uma vez que ambas impedem a ligação do complexo de destruição à  $\beta$ -catenina, sendo essa a principal razão considerada para o facto de mutações nos dois genes não coexistirem no mesmo tumor.

Os dois indivíduos mutados na  $\beta$ -catenina eram os únicos que tinham instabilidade para os 4 marcadores de microssatélites analisados, o que é interessante porque está descrita uma associação entre mutações neste gene e instabilidade de microssatélites de alto grau pelo que as mutações na  $\beta$ -catenina parecem ser comuns na tumorigénese colorectal que segue a via mutadora (122, 134, 138). Vários estudos sugerem que em CCR com instabilidade de alto grau as mutações no APC são menos frequentes (138), o que não está de acordo com o observado nestes dois casos.

A ausência de mutações no gene BRAF nestes indivíduos não está de acordo com estudos anteriores que descrevem mutações no gene BRAF em cerca de 10% dos CCR esporádicos (103-105). Está também descrita uma correlação entre instabilidade de microssatélites e mutações no codão 600 do BRAF (118), o que não foi confirmado pelos resultados obtidos neste estudo, uma vez que não foram detectadas mutações neste gene em nenhum dos indivíduos com instabilidade. No entanto, isto pode ser justificado pelo facto de apenas 2 indivíduos com instabilidade de microssatélites serem instáveis nos 4 marcadores, sendo que os restantes tinham instabilidade apenas em um dos marcadores analisados, e a correlação entre instabilidade de microssatélites de baixo grau e mutações no BRAF é baixa (118).

A pesquisa de mutações no gene K-ras demonstrou que 3 em 24 (12,5%) indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos tinham mutações, uma no codão 12 e duas no codão 13. No grupo  $> 50$  anos, apenas 1 em 37 (2,7%) indivíduos tinha mutação, no codão 13 do K-ras (Tabela IV e Anexo 5). No grupo  $< 45$  anos, 2 dos indivíduos com mutações no K-ras tinham mutações no APC, e num dos casos apresentava também LOH (Tabela VI e Anexo 5), o que é curioso ocorrer em jovens, pois a tendência parece ser o número de mutações aumentar com a idade. Segundo estudos anteriores, as mutações mais frequentes no K-ras, que activam as suas propriedades oncogénicas, localizam-se nos codões 12, 13 e 61 (116, 139). Alsop e colaboradores (140)

demonstraram que apenas 6% dos CCR diagnosticados em indivíduos com idade inferior a 45 anos estavam associados a mutações activantes no *K-ras*, tendo sugerido que o *K-ras* não terá um papel central no desenvolvimento precoce de CCR. Porém, apesar das frequências de mutações no *K-ras* obtidas no presente estudo serem reduzidas comparativamente aos resultados de estudos anteriores, que apontam para frequências da ordem dos 30 a 50% (103-105, 117, 141, 142), essa redução observa-se em ambos os grupos etários, o que pode ser justificado por uma questão de amostragem. Contudo, observa-se um número mais elevado de mutações no *K-ras* nos indivíduos mais jovens, o que sugere que este gene poderá ter um papel importante no desenvolvimento precoce de CCR, ao contrário do que foi proposto por Alsop (140).

Por outro lado, as mutações activantes do *K-ras* parecem conferir às células tumorais um carácter mais invasivo, sendo a frequência de mutações no *K-ras* mais elevada em metástases do que em células de carcinomas primários (103). Foi também demonstrado que doentes com cancro colorectal com mutações no *K-ras* têm um pior prognóstico do que aqueles que não têm mutações no *K-ras* (116).

Dos indivíduos com mutações no *K-ras*, nenhum tinha instabilidade de microssatélites, o que está em consonância com outros estudos que indicam que CCRs com instabilidade de microssatélites geralmente não têm mutações nos genes *K-ras* nem no *p53* (118). Embora outros estudos descrevam mutações do *K-ras* em tumores colorectais independentemente do nível de estabilidade de microssatélites (103).

De um modo geral 8 (13%) indivíduos não apresentaram mutações em nenhum dos genes analisados, sendo que 3 eram do grupo  $\leq 45$  anos e 5 do grupo  $> 50$  anos. Uma hipótese é que algum destes genes estivesse mutado mas que essa mutação não tenha sido detectada pelos métodos utilizados, uma vez que só foram analisados “hot-spots” mutacionais para os genes *BRAF*, *K-ras* e  *$\beta$ -catenina*. Outra hipótese, e eventualmente a mais provável, é que estes indivíduos tenham mutações noutros genes envolvidos na tumorigénese colorectal e que afectem a via Wnt, como o *TCF-4*, a *axina* ou o *p53*. É ainda de considerar a possibilidade do *APC* nestes genes estar silenciado por metilação do promotor, pois devido à má qualidade das amostras foi-nos impossível avaliar o estado de metilação do promotor do *APC* nestes casos.

Em suma, dos genes analisados, nenhum por si só parece ser a causa principal para o desenvolvimento precoce de CCR esporádico. No entanto observa-se um maior número de indivíduos jovens com mutações em mais do que um gene: cerca de 17% considerando apenas as alterações no *APC* em simultâneo com as alterações na  *$\beta$ -catenina* e no *K-ras*, mas esse valor sobe para 33% se a esses casos adicionar os indivíduos que têm instabilidade de

microsatélites, o que pode dever-se a uma possível alteração nos genes *MMR*. Por outro lado, nos indivíduos com idade mais avançada, não foi encontrado nenhum caso com alterações em mais do que um gene, tornando os resultados observados nos jovens ainda mais interessantes, pois seria de esperar que indivíduos mais velhos tivessem mais mutações, inclusive em genes diferentes. Estes resultados levam a propor a hipótese de o desenvolvimento precoce de CCR esporádico poder ser causado, não por mutações num determinado gene, mas por um conjunto de mutações em vários genes diferentes, cuja acumulação de mutações tivesse como consequência um fenótipo mais agressivo e que, portanto se desenvolvesse mais precocemente. Apesar do modelo proposto por Vogelstein considerar que para ocorrer tumorigénese colorectal é necessária a ocorrência de mutações em vários genes, entre os quais, *APC*, *K-ras* e *BRAF*, mas também *SMAD4* ou *p53* (2, 59, 60), o que se observou neste estudo é que poucos indivíduos analisados tinham mutações em mais do que um gene, e a raridade de ocorrência de mutações em vários genes já foi observada noutros estudos (117, 122, 143). Isto poderá confirmar a hipótese de que a associação de mutações em genes diferentes poderá estar na origem de parte dos CCR esporádicos que surgem em idade jovem, podendo não ser um fenómeno tão frequente como se pensava. É, no entanto, de considerar a possibilidade da origem desta doença estar em alterações noutro gene envolvido na via Wnt, directa ou indirectamente, que não tenha sido analisado neste estudo.

Não se pode também descartar a possibilidade de estarmos a tratar de casos de síndrome de Lynch, relativamente aos indivíduos jovens estudados. O Síndrome de Lynch foi definido tendo por base uma série de características clínicas, patológicas e moleculares que incluem: uma história familiar de CCR, neoplasias extra-cólicas, desenvolvimento precoce de tumores, elevada frequência de instabilidade de microsatélites, perda de expressão de proteínas de reparação e uma mutação germinal num gene de reparação (32). Os indivíduos do grupo  $\leq 45$  anos analisados foram considerados como esporádicos por não obedecerem aos critérios clínicos que descrevem o Síndrome de Lynch. No entanto não foi efectuado um estudo a nível dos genes *MMR*, pelo que podem corresponder a casos de Síndrome de Lynch não diagnosticados. Os dois tipos de CCR associados a instabilidade desenvolvem-se por vias distintas: os CCR esporádicos seguem a via serrada, já referida anteriormente, estando associados a mutações no *BRAF* e a metilação do ADN, enquanto os CCR associados a *HNPCC* desenvolvem-se a partir de adenomas em que ocorrem mutações nos genes *APC*,  *$\beta$ -catenina* e/ou *K-ras* (32). O facto de estes indivíduos não apresentarem mutações no gene *BRAF* sugere que estes carcinomas não se desenvolveram pela via serrada, podendo ter seguido a via mutadora e tratar-se possivelmente de casos de Síndrome de Lynch.



## **Conclusões**

---



## 5. Conclusões

As principais conclusões que se podem tirar destes resultados são que a percentagem de indivíduos mais jovens com mutações no gene APC é inferior à dos indivíduos com idade superior a 50 anos. Além disso, a maioria das mutações que ocorrem nos indivíduos mais jovens originam proteínas truncadas que retêm mais de 2 domínios de regulação da  $\beta$ -catenina e que estão associadas a um fenótipo menos severo de PAF. Isto sugere que a principal razão para o desenvolvimento de CCR esporádico em idade mais jovem não se deve a mutações no gene APC.

Foi também observado que os níveis de instabilidade de microssatélites são mais elevados em indivíduos mais jovens, pelo que é possível que alterações nos genes MMR estejam relacionadas com alguns casos de CCR esporádico precoce.

A ausência de mutações nos genes *BRAF* sugere que este gene não está envolvido no desenvolvimento precoce de CCR esporádico nos casos analisados. Foram detectadas mutações no *K-ras* em 12,5% de indivíduos jovens e apenas em 5% de indivíduos do grupo > 50 anos, o que sugere que, apesar das percentagens serem muito inferiores às descritas em estudos anteriores, o facto de existirem mais mutações no gene KRAS do que no *BRAF* nos casos de CCR esporádico estudados está de acordo com o que geralmente se observa. É também interessante que existam mais casos de mutações no KRAS em jovens, que estão associadas a uma maior agressividade e pior prognóstico de CCR.

Foram também encontrados 2 indivíduos jovens mutados na  $\beta$ -catenina, com instabilidade de alto grau. O local afectado (codão 45) constitui um dos locais de fosforilação da  $\beta$ -catenina pela GSK-3, que marcam a proteína para degradação. Ou seja, é de algum modo equivalente às mutações no APC, pois impede a regulação da  $\beta$ -catenina pelo complexo de destruição. Por essa mesma razão as mutações no APC e na  $\beta$ -catenina deveriam ser mutuamente exclusivas, mas não o são nos casos aqui analisados, pois ambos têm mutações também no APC, facto que não estava descrito em CCR esporádico.

A origem de CCR esporádico em idade jovem não parece estar na alteração de um único gene, dentro dos que foram analisados neste estudo. Cerca de 33% dos indivíduos jovens tinham mutações em mais do que um gene, enquanto essa situação não foi observada em nenhum dos indivíduos com idade mais avançada. Estes resultados parecem sugerir que um conjunto de mutações em diversos genes tem como consequência um fenótipo mais agressivo, levando ao desenvolvimento precoce de CCR esporádico. Outra hipótese é que a origem desta

doença possa estar em alterações noutra gene que não tenha sido analisado neste estudo e que poderá, directa ou indirectamente, afectar a via Wnt.

## **Bibliografia**

---



## Bibliografia

1. Kinzler, K. W. and Vogelstein, B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell*, 87: 159-170, 1996.
2. Calvert, P. M. and Frucht, H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*, 137: 603-612, 2002.
3. Potter, J. D. Colorectal cancer: molecules and populations. *J Natl Cancer Inst*, 91: 916-932, 1999.
4. Fodde, R. The APC gene in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, 38: 867-871, 2002.
5. Fetih, G., Habib, F., Katsumi, H., Okada, N., Fujita, T., Attia, M., and Yamamoto, A. Excellent absorption enhancing characteristics of NO donors for improving the intestinal absorption of poorly absorbable compound compared with conventional absorption enhancers. *Drug Metab Pharmacokinet*, 21: 222-229, 2006.
6. Wong, J. M., de Souza, R., Kendall, C. W., Emam, A., and Jenkins, D. J. Colonic health: fermentation and short chain fatty acids. *J Clin Gastroenterol*, 40: 235-243, 2006.
7. Olmo, N., Turnay, J., Perez-Ramos, P., Lecona, E., Barrasa, J. I., Lopez de Silanes, I., and Lizarbe, M. A. In vitro models for the study of the effect of butyrate on human colon adenocarcinoma cells. *Toxicol In Vitro*, 21: 262-270, 2007.
8. Stryer, L. *Biochemistry*, 4th edition. New York: W H Freeman, 1995.
9. Dashwood, R. H., Myzak, M. C., and Ho, E. Dietary HDAC inhibitors: time to rethink weak ligands in cancer chemoprevention? *Carcinogenesis*, 27: 344-349, 2006.
10. Lecona, E., Olmo, N., Turnay, J., Santiago-Gomez, A., Lopez de Silanes, I., Gorospe, M., and Lizarbe, M. A. Kinetic analysis of butyrate transport in human colon adenocarcinoma cells reveals two different carrier-mediated mechanisms. *Biochem J*, 2007.
11. Rada-Iglesias, A., Enroth, S., Ameer, A., Koch, C. M., Clelland, G. K., Respuela-Alonso, P., Wilcox, S., Dovey, O. M., Ellis, P. D., Langford, C. F., Dunham, I., Komorowski, J., and Wadelius, C. Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res*, 17: 708-719, 2007.
12. Junqueira, L. C., Carneiro, J. *Histologia básica*. In, 10ª edition, pp. 299-316. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2004.
13. Stainier, D. Y. No organ left behind: tales of gut development and evolution. *Science*, 307: 1902-1904, 2005.
14. Schneikert, J. and Behrens, J. The canonical Wnt signalling pathway and its APC partner in colon cancer development. *Gut*, 2006.
15. Radtke, F. and Clevers, H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*, 307: 1904-1909, 2005.
16. Senda, T., Iizuka-Kogo, A., Onouchi, T., and Shimomura, A. Adenomatous polyposis coli (APC) plays multiple roles in the intestinal and colorectal epithelia. *Med Mol Morphol*, 40: 68-81, 2007.
17. Jensen, J., Pedersen, E. E., Galante, P., Hald, J., Heller, R. S., Ishibashi, M., Kageyama, R., Guillemot, F., Serup, P., and Madsen, O. D. Control of endodermal endocrine development by Hes-1. *Nat Genet*, 24: 36-44, 2000.
18. Cabrera, C. M. and Lopez-Nevot, M. A. APC and chromosome instability in colorectal cancer. *Rev Esp Enferm Dig*, 97: 738-743, 2005.
19. Sancho, E., Batlle, E., and Clevers, H. Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol*, 15: 763-770, 2003.
20. Reya, T. and Clevers, H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature*, 434: 843-850, 2005.
21. Clevers, H. and Batlle, E. EphB/EphrinB receptors and Wnt signaling in colorectal cancer. *Cancer Res*, 66: 2-5, 2006.
22. Bright-Thomas, R. M. and Hargest, R. APC, beta-Catenin and hTCF-4; an unholy trinity in the genesis of colorectal cancer. *Eur J Surg Oncol*, 29: 107-117, 2003.
23. Jass, J. R. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol*, 12: 4943-4950, 2006.
24. Chow, E., Thirlwell, C., Macrae, F., and Lipton, L. Colorectal cancer and inherited mutations in base-excision repair. *Lancet Oncol*, 5: 600-606, 2004.
25. Fearnhead, N. S., Britton, M. P., and Bodmer, W. F. The ABC of APC. *Hum Mol Genet*, 10: 721-733, 2001.
26. Esteller, M., Sparks, A., Toyota, M., Sanchez-Cespedes, M., Capella, G., Peinado, M. A., Gonzalez, S., Tarafa, G., Sidransky, D., Meltzer, S. J., Baylin, S. B., and Herman, J. G. Analysis of

- adenomatous polyposis coli promoter hypermethylation in human cancer. *Cancer Res*, *60*: 4366-4371, 2000.
27. Tighe, A., Johnson, V. L., and Taylor, S. S. Truncating APC mutations have dominant effects on proliferation, spindle checkpoint control, survival and chromosome stability. *J Cell Sci*, *117*: 6339-6353, 2004.
  28. Polakis, P. The adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochim Biophys Acta*, *1332*: F127-147, 1997.
  29. Uy, G. B., Kaw, L. L., Punzalan, C. K., Querol, R. I., Koustova, E. V., Bowyer, M. W., Hobbs, C. M., Sobin, L. H., and Wherry, D. C. Clinical and molecular biologic characteristics of early-onset versus late-onset colorectal carcinoma in Filipinos. *World J Surg*, *28*: 117-123, 2004.
  30. Erdamar, S., Ucaryilmaz, E., Demir, G., Karahasanoglu, T., Dogusoy, G., Dirican, A., and Goksel, S. Importance of MutL homologue MLH1 and MutS homologue MSH2 expression in Turkish patients with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, *13*: 4437-4444, 2007.
  31. Bader, S., Walker, M., Hendrich, B., Bird, A., Bird, C., Hooper, M., and Wyllie, A. Somatic frameshift mutations in the MBD4 gene of sporadic colon cancers with mismatch repair deficiency. *Oncogene*, *18*: 8044-8047, 1999.
  32. Jass, J. R. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer*, *3*: 93-100, 2004.
  33. van Es, J. H., Giles, R. H., and Clevers, H. C. The many faces of the tumor suppressor gene APC. *Exp Cell Res*, *264*: 126-134, 2001.
  34. Gilbert, S. F. *Developmental Biology*, 7th edition, p. 152,161-162. Sunderland, Massachusetts: Sinauer and Associates, 2003.
  35. Seidensticker MJ, B. J. Biochemical interactions in the Wnt pathway. *Biochim. Biophys. Acta.*, *1495*: 168-182, 2000.
  36. Fodde, R. and Brabletz, T. Wnt/beta-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol*, *19*: 150-158, 2007.
  37. Cho, K. H., Baek, S., and Sung, M. H. Wnt pathway mutations selected by optimal beta-catenin signaling for tumorigenesis. *FEBS Lett*, *580*: 3665-3670, 2006.
  38. Behrens, J., von Kries, J. P., Kuhl, M., Bruhn, L., Wedlich, D., Grosschedl, R., and Birchmeier, W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*, *382*: 638-642, 1996.
  39. Molenaar, M., van de Wetering, M., Oosterwegel, M., Peterson-Maduro, J., Godsave, S., Korinek, V., Roose, J., Destree, O., and Clevers, H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell*, *86*: 391-399, 1996.
  40. Tetsu, O. and McCormick, F. Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature*, *398*: 422-426, 1999.
  41. He, T. C., Sparks, A. B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., da Costa, L. T., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Identification of c-MYC as a target of the APC pathway. *Science*, *281*: 1509-1512, 1998.
  42. Roose, J., Huls, G., van Beest, M., Moerer, P., van der Horn, K., Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. Synergy between tumor suppressor APC and the beta-catenin-Tcf4 target Tcf1. *Science*, *285*: 1923-1926, 1999.
  43. van de Wetering, M., Sancho, E., Verweij, C., de Lau, W., Oving, I., Hurlstone, A., van der Horn, K., Battle, E., Coudreuse, D., Haramis, A. P., Tjon-Pon-Fong, M., Moerer, P., van den Born, M., Soete, G., Pals, S., Eilers, M., Medema, R., and Clevers, H. The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells. *Cell*, *111*: 241-250, 2002.
  44. Lowry, W. E., Blanpain, C., Nowak, J. A., Guasch, G., Lewis, L., and Fuchs, E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev*, *19*: 1596-1611, 2005.
  45. Woodward, W. A., Chen, M. S., Behbod, F., and Rosen, J. M. On mammary stem cells. *J Cell Sci*, *118*: 3585-3594, 2005.
  46. Rey, T., Duncan, A. W., Ailles, L., Domen, J., Scherer, D. C., Willert, K., Hintz, L., Nusse, R., and Weissman, I. L. A role for Wnt signalling in self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature*, *423*: 409-414, 2003.
  47. Alonso, L. and Fuchs, E. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev*, *17*: 1189-1200, 2003.

48. Li, Y., Welm, B., Podsypanina, K., Huang, S., Chamorro, M., Zhang, X., Rowlands, T., Egeblad, M., Cowin, P., Werb, Z., Tan, L. K., Rosen, J. M., and Varmus, H. E. Evidence that transgenes encoding components of the Wnt signaling pathway preferentially induce mammary cancers from progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *100*: 15853-15858, 2003.
49. Albuquerque, C., Breukel, C., van der Luijt, R., Fidalgo, P., Lage, P., Slors, F. J., Leitao, C. N., Fodde, R., and Smits, R. The 'just-right' signaling model: APC somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the beta-catenin signaling cascade. *Hum Mol Genet*, *11*: 1549-1560, 2002.
50. Schneikert, J., Grohmann, A., and Behrens, J. Truncated APC regulates the transcriptional activity of beta-catenin in a cell cycle dependent manner. *Hum Mol Genet*, *16*: 199-209, 2007.
51. Su, L. K., Burrell, M., Hill, D. E., Gyuris, J., Brent, R., Wiltshire, R., Trent, J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. APC binds to the novel protein EB1. *Cancer Res*, *55*: 2972-2977, 1995.
52. Matsumine, A., Ogai, A., Senda, T., Okumura, N., Satoh, K., Baeg, G. H., Kawahara, T., Kobayashi, S., Okada, M., Toyoshima, K., and Akiyama, T. Binding of APC to the human homolog of the *Drosophila* discs large tumor suppressor protein. *Science*, *272*: 1020-1023, 1996.
53. Joslyn, G., Richardson, D. S., White, R., and Alber, T. Dimer formation by an N-terminal coiled coil in the APC protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *90*: 11109-11113, 1993.
54. Bodmer, W., Bishop, T., and Karran, P. Genetic steps in colorectal cancer. *Nat Genet*, *6*: 217-219, 1994.
55. Su, L. K., Johnson, K. A., Smith, K. J., Hill, D. E., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Association between wild type and mutant APC gene products. *Cancer Res*, *53*: 2728-2731, 1993.
56. Cetta, F., Curia, M. C., Montalto, G., Gori, M., Cama, A., Battista, P., and Barbarisi, A. Thyroid carcinoma usually occurs in patients with familial adenomatous polyposis in the absence of biallelic inactivation of the adenomatous polyposis coli gene. *J Clin Endocrinol Metab*, *86*: 427-432, 2001.
57. Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, *359*: 235-237, 1992.
58. Miyoshi, Y., Nagase, H., Ando, H., Horii, A., Ichii, S., Nakatsuru, S., Aoki, T., Miki, Y., Mori, T., and Nakamura, Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, *1*: 229-233, 1992.
59. Fearon, E. R. and Vogelstein, B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*: 759-767, 1990.
60. Jubb, A. M., Bell, S. M., and Quirke, P. Methylation and colorectal cancer. *J Pathol*, *195*: 111-134, 2001.
61. Takayama, T., Miyanishi, K., Hayashi, T., Sato, Y., and Niitsu, Y. Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *J Gastroenterol*, *41*: 185-192, 2006.
62. Chaves P, C. C., Lage P, Claro I, Cravo M, Leitão CN, Soares J Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype. *Journal of Pathology*, *191*: 355-360, 2000.
63. Hruban, R. H., Goggins, M., Parsons, J., and Kern, S. E. Progression model for pancreatic cancer. *Clin Cancer Res*, *6*: 2969-2972, 2000.
64. Knudson, A. G., Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res*, *45*: 1437-1443, 1985.
65. Knudson, A. G., Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *68*: 820-823, 1971.
66. Lamlum, H., Ilyas, M., Rowan, A., Clark, S., Johnson, V., Bell, J., Frayling, I., Efstathiou, J., Pack, K., Payne, S., Roylance, R., Gorman, P., Sheer, D., Neale, K., Phillips, R., Talbot, I., Bodmer, W., and Tomlinson, I. The type of somatic mutation at APC in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's 'two-hit' hypothesis. *Nat Med*, *5*: 1071-1075, 1999.
67. Rowan, A. J., Lamlum, H., Ilyas, M., Wheeler, J., Straub, J., Papadopoulou, A., Bicknell, D., Bodmer, W. F., and Tomlinson, I. P. APC mutations in sporadic colorectal tumors: A mutational "hotspot" and interdependence of the "two hits". *Proc Natl Acad Sci U S A*, *97*: 3352-3357, 2000.
68. Cheadle, J. P., Krawczak, M., Thomas, M. W., Hodges, A. K., Al-Tassan, N., Fleming, N., and Sampson, J. R. Different combinations of biallelic APC mutation confer different growth advantages in colorectal tumours. *Cancer Res*, *62*: 363-366, 2002.

69. Dihlmann, S., Gebert, J., Siermann, A., Herfarth, C., and von Knebel Doeberitz, M. Dominant negative effect of the APC1309 mutation: a possible explanation for genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*, 59: 1857-1860, 1999.
70. Mahmoud, N. N., Boolbol, S. K., Bilinski, R. T., Martucci, C., Chadburn, A., and Bertagnolli, M. M. Apc gene mutation is associated with a dominant-negative effect upon intestinal cell migration. *Cancer Res*, 57: 5045-5050, 1997.
71. Schneikert, J. and Behrens, J. Truncated APC is required for cell proliferation and DNA replication. *Int J Cancer*, 119: 74-79, 2006.
72. Henderson, B. R. Nuclear-cytoplasmic shuttling of APC regulates beta-catenin subcellular localization and turnover. *Nat Cell Biol*, 2: 653-660, 2000.
73. Galea, M. A., Eleftheriou, A., and Henderson, B. R. ARM domain-dependent nuclear import of adenomatous polyposis coli protein is stimulated by the B56 alpha subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*, 276: 45833-45839, 2001.
74. Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., and Polakis, P. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3046-3050, 1995.
75. Rubinfeld, B., Albert, I., Porfiri, E., Munemitsu, S., and Polakis, P. Loss of beta-catenin regulation by the APC tumor suppressor protein correlates with loss of structure due to common somatic mutations of the gene. *Cancer Res*, 57: 4624-4630, 1997.
76. Su, L. K., Barnes, C. J., Yao, W., Qi, Y., Lynch, P. M., and Steinbach, G. Inactivation of germline mutant APC alleles by attenuated somatic mutations: a molecular genetic mechanism for attenuated familial adenomatous polyposis. *Am J Hum Genet*, 67: 582-590, 2000.
77. Smith, K. J., Johnson, K. A., Bryan, T. M., Hill, D. E., Markowitz, S., Willson, J. K., Paraskeva, C., Petersen, G. M., Hamilton, S. R., Vogelstein, B., and et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 2846-2850, 1993.
78. Bourne, H. R. Colon cancer. Suppression with a difference. *Nature*, 353: 696-697, 1991.
79. Bourne, H. R. Colon cancer. Consider the coiled coil. *Nature*, 351: 188-190, 1991.
80. Kim, K., Pang, K. M., Evans, M., and Hay, E. D. Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators. *Mol Biol Cell*, 11: 3509-3523, 2000.
81. Jass, J. R., Baker, K., Zlobec, I., Higuchi, T., Barker, M., Buchanan, D., and Young, J. Advanced colorectal polyps with the molecular and morphological features of serrated polyps and adenomas: concept of a 'fusion' pathway to colorectal cancer. *Histopathology*, 49: 121-131, 2006.
82. Rosenberg, D. W., Yang, S., Pleau, D. C., Greenspan, E. J., Stevens, R. G., Rajan, T. V., Heinen, C. D., Levine, J., Zhou, Y., and O'Brien, M. J. Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. *Cancer Res*, 67: 3551-3554, 2007.
83. Shen, L., Kondo, Y., Rosner, G. L., Xiao, L., Hernandez, N. S., Vilaythong, J., Houlihan, P. S., Krouse, R. S., Prasad, A. R., Einspahr, J. G., Buckmeier, J., Alberts, D. S., Hamilton, S. R., and Issa, J. P. MGMT promoter methylation and field defect in sporadic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst*, 97: 1330-1338, 2005.
84. Paluszczak, J. and Baer-Dubowska, W. Epigenetic diagnostics of cancer - the application of DNA methylation markers. *J Appl Genet*, 47: 365-375, 2006.
85. Turek-Plewa, J. and Jagodzinski, P. P. The role of mammalian DNA methyltransferases in the regulation of gene expression. *Cell Mol Biol Lett*, 10: 631-647, 2005.
86. Chen, J., Rocken, C., Lofton-Day, C., Schulz, H. U., Muller, O., Kutzner, N., Malferteiner, P., and Ebert, M. P. Molecular analysis of APC promoter methylation and protein expression in colorectal cancer metastasis. *Carcinogenesis*, 26: 37-43, 2005.
87. Judson, H., Stewart, A., Leslie, A., Pratt, N. R., Baty, D. U., Steele, R. J., and Carey, F. A. Relationship between point gene mutation, chromosomal abnormality, and tumour suppressor gene methylation status in colorectal adenomas. *J Pathol*, 210: 344-350, 2006.
88. Arnold, C. N., Goel, A., Niedzwiecki, D., Dowell, J. M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R. J., Bertagnolli, M. M., and Boland, C. R. APC promoter hypermethylation contributes to the loss of APC expression in colorectal cancers with allelic loss on 5q. *Cancer Biol Ther*, 3: 960-964, 2004.
89. Wilson, A. S., Power, B. E., and Molloy, P. L. DNA hypomethylation and human diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1775: 138-162, 2007.

90. Robertson, K. D. and Jones, P. A. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*, *21*: 461-467, 2000.
91. Cooper, D. N. and Krawczak, M. Cytosine methylation and the fate of CpG dinucleotides in vertebrate genomes. *Hum Genet*, *83*: 181-188, 1989.
92. Szyf, M. DNA methylation and cancer therapy. *Drug Resist Updat*, *6*: 341-353, 2003.
93. Kisseljova, N. P. and Kissel'jov, F. L. DNA demethylation and carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)*, *70*: 743-752, 2005.
94. Baylin, S. B., Esteller, M., Rountree, M. R., Bachman, K. E., Schuebel, K., and Herman, J. G. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet*, *10*: 687-692, 2001.
95. Zheng, H. T., Peng, Z. H., Zhou, C. Z., Li, D. P., Wang, Z. W., Qiu, G. Q., and He, L. Detailed deletion mapping of loss of heterozygosity on 22q13 in sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, *11*: 1668-1672, 2005.
96. Vogelstein, B., Fearon, E. R., Kern, S. E., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Nakamura, Y., and White, R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science*, *244*: 207-211, 1989.
97. Segditsas, S. and Tomlinson, I. Colorectal cancer and genetic alterations in the Wnt pathway. *Oncogene*, *25*: 7531-7537, 2006.
98. Ilyas, M., Tomlinson, I. P., Rowan, A., Pignatelli, M., and Bodmer, W. F. Beta-catenin mutations in cell lines established from human colorectal cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*: 10330-10334, 1997.
99. Shimizu, Y., Ikeda, S., Fujimori, M., Kodama, S., Nakahara, M., Okajima, M., and Asahara, T. Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. *Genes Chromosomes Cancer*, *33*: 73-81, 2002.
100. Liu, W., Dong, X., Mai, M., Seelan, R. S., Taniguchi, K., Krishnadath, K. K., Halling, K. C., Cunningham, J. M., Boardman, L. A., Qian, C., Christensen, E., Schmidt, S. S., Roche, P. C., Smith, D. I., and Thibodeau, S. N. Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta-catenin/TCF signalling. *Nat Genet*, *26*: 146-147, 2000.
101. Janssen, K. P., Alberici, P., Fsihi, H., Gaspar, C., Breukel, C., Franken, P., Rosty, C., Abal, M., El Marjou, F., Smits, R., Louvard, D., Fodde, R., and Robine, S. APC and oncogenic KRAS are synergistic in enhancing Wnt signaling in intestinal tumor formation and progression. *Gastroenterology*, *131*: 1096-1109, 2006.
102. Kinch, M. S., Clark, G. J., Der, C. J., and Burridge, K. Tyrosine phosphorylation regulates the adhesions of ras-transformed breast epithelia. *J Cell Biol*, *130*: 461-471, 1995.
103. Oliveira, C., Velho, S., Moutinho, C., Ferreira, A., Preto, A., Domingo, E., Capelinha, A. F., Duval, A., Hamelin, R., Machado, J. C., Schwartz, S., Jr., Carneiro, F., and Seruca, R. KRAS and BRAF oncogenic mutations in MSS colorectal carcinoma progression. *Oncogene*, *26*: 158-163, 2007.
104. Rajagopalan, H., Bardelli, A., Lengauer, C., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., and Velculescu, V. E. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*, *418*: 934, 2002.
105. Yuen, S. T., Davies, H., Chan, T. L., Ho, J. W., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Tsui, W. W., Chan, A. S., Futreal, P. A., Stratton, M. R., Wooster, R., and Leung, S. Y. Similarity of the phenotypic patterns associated with BRAF and KRAS mutations in colorectal neoplasia. *Cancer Res*, *62*: 6451-6455, 2002.
106. Li, J., Mizukami, Y., Zhang, X., Jo, W. S., and Chung, D. C. Oncogenic K-ras stimulates Wnt signaling in colon cancer through inhibition of GSK-3beta. *Gastroenterology*, *128*: 1907-1918, 2005.
107. Sambrook, F., Maniats Molecular Cloning - A laboratory manual, 2nd edition: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989.
108. Chapter 4 - The Protein Truncation Test, Promega Notes.
109. Helms, C. Method: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE). 1990.
110. Wagner, J. Screening Methods for Detection of Unknown Point Mutations.
111. GeneScan Reference Guide ABI Prism 310 Genetic Analyser.
112. CpGenome™ DNA Modification Kit S7820.
113. Sunnucks, P., Wilson, A. C., Beheregaray, L. B., Zenger, K., French, J., and Taylor, A. C. SSCP is not so difficult: the application and utility of single-stranded conformation polymorphism in evolutionary biology and molecular ecology. *Mol Ecol*, *9*: 1699-1710, 2000.
114. Walker, K. W. a. J. Principles and Techniques of Practical Biochemistry, 5th edition, p. 105-106,125-130. Cambridge: Cambridge University Press, 2000.

115. Cooper The Cell: A Molecular Approach, 2nd edition. Sunderland, Washington: Sinauer Associates, 2000.
116. Conlin, A., Smith, G., Carey, F. A., Wolf, C. R., and Steele, R. J. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut*, 54: 1283-1286, 2005.
117. Chiang, J. M., Wu Chou, Y. H., Ma, S. C., and Chen, J. R. Influence of age on adenomatous polyposis coli and p53 mutation frequency in sporadic colorectal cancer-rarity of co-occurrence of mutations in APC, K-ras, and p53 genes. *Virchows Arch*, 445: 465-471, 2004.
118. Goel, A., Nagasaka, T., Arnold, C. N., Inoue, T., Hamilton, C., Niedzwiecki, D., Compton, C., Mayer, R. J., Goldberg, R., Bertagnolli, M. M., and Boland, C. R. The CpG island methylator phenotype and chromosomal instability are inversely correlated in sporadic colorectal cancer. *Gastroenterology*, 132: 127-138, 2007.
119. Chung, D. C. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology*, 119: 854-865, 2000.
120. Hemminki, A., Mecklin, J. P., Jarvinen, H., Aaltonen, L. A., and Joensuu, H. Microsatellite instability is a favorable prognostic indicator in patients with colorectal cancer receiving chemotherapy. *Gastroenterology*, 119: 921-928, 2000.
121. Chang, S. C., Lin, J. K., Lin, T. C., and Liang, W. Y. Loss of heterozygosity: an independent prognostic factor of colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 11: 778-784, 2005.
122. Luchtenborg, M., Weijenberg, M. P., Wark, P. A., Saritas, A. M., Roemen, G. M., van Muijen, G. N., de Bruine, A. P., van den Brandt, P. A., and de Goeij, A. F. Mutations in APC, CTNNB1 and K-ras genes and expression of hMLH1 in sporadic colorectal carcinomas from the Netherlands Cohort Study. *BMC Cancer*, 5: 160, 2005.
123. Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, E. T., Aronson, M. D., Holowaty, E. J., Bull, S. B., Redston, M., and Gallinger, S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med*, 342: 69-77, 2000.
124. Ficari, F., Cama, A., Valanzano, R., Curia, M. C., Palmirotta, R., Aceto, G., Esposito, D. L., Crognale, S., Lombardi, A., Messerini, L., Mariani-Costantini, R., Tonelli, F., and Battista, P. APC gene mutations and colorectal adenomatosis in familial adenomatous polyposis. *Br J Cancer*, 82: 348-353, 2000.
125. Kraus, C., Gunther, K., Vogler, A., Hohenberger, W., Pfeiffer, R. A., and Ballhausen, W. G. Rapid RT-PCR-based protein truncation test in the screening for 5' located mutations of the APC gene. *Mol Cell Probes*, 12: 143-147, 1998.
126. Toyooka, M., Konishi, M., Kikuchi-Yanoshita, R., Iwama, T., and Miyaki, M. Somatic mutations of the adenomatous polyposis coli gene in gastroduodenal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res*, 55: 3165-3170, 1995.
127. Sekine, S., Shimoda, T., Nimura, S., Nakanishi, Y., Akasu, T., Katai, H., Gotoda, T., Shibata, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. High-grade dysplasia associated with fundic gland polyposis in a familial adenomatous polyposis patient, with special reference to APC mutation profiles. *Mod Pathol*, 17: 1421-1426, 2004.
128. Martin-Denavit, T., Duthel, S., Giraud, S., Olschwang, S., Saurin, J. C., and Plauchu, H. Phenotype variability of two FAP families with an identical APC germline mutation at codon 1465: a potential modifier effect? *Clin Genet*, 60: 125-131, 2001.
129. Ohgaki, H., Kros, J. M., Okamoto, Y., Gaspert, A., Huang, H., and Kurrer, M. O. APC mutations are infrequent but present in human lung cancer. *Cancer Lett*, 207: 197-203, 2004.
130. Matsumoto, T., Iida, M., Kobori, Y., Mizuno, M., Nakamura, S., and Hizawa, K. Progressive duodenal adenomatosis in a familial adenomatous polyposis pedigree with APC mutation at codon 1556. *Dis Colon Rectum*, 45: 229-233, 2002.
131. Groves, C., Lamlum, H., Crabtree, M., Williamson, J., Taylor, C., Bass, S., Cuthbert-Heavens, D., Hodgson, S., Phillips, R., and Tomlinson, I. Mutation cluster region, association between germline and somatic mutations and genotype-phenotype correlation in upper gastrointestinal familial adenomatous polyposis. *Am J Pathol*, 160: 2055-2061, 2002.
132. De Rosa, M., Scarano, M. I., Panariello, L., Morelli, G., Riegler, G., Rossi, G. B., Tempesta, A., Romano, G., Renda, A., Pettinato, G., and Izzo, P. The mutation spectrum of the APC gene in FAP patients from southern Italy: detection of known and four novel mutations. *Hum Mutat*, 21: 655-656, 2003.

133. Benoit, L., Faivre, L., Cheynel, N., Ortega-Deballon, P., Facy, O., Marty, M., Olschwang, S., Fraisse, J., and Cuisenier, J. 3' Mutation of the APC gene and family history of FAP in a patient with apparently sporadic desmoid tumors. *J Clin Gastroenterol*, *41*: 297-300, 2007.
134. Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*, *58*: 1130-1134, 1998.
135. Miyoshi, Y., Iwao, K., Nagasawa, Y., Aihara, T., Sasaki, Y., Imaoka, S., Murata, M., Shimano, T., and Nakamura, Y. Activation of the beta-catenin gene in primary hepatocellular carcinomas by somatic alterations involving exon 3. *Cancer Res*, *58*: 2524-2527, 1998.
136. Rubinfeld, B., Robbins, P., El-Gamil, M., Albert, I., Porfiri, E., and Polakis, P. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. *Science*, *275*: 1790-1792, 1997.
137. Morin, P. J., Sparks, A. B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K. W. Activation of beta-catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science*, *275*: 1787-1790, 1997.
138. Mirabelli-Primdahl, L., Gryfe, R., Kim, H., Millar, A., Luceri, C., Dale, D., Holowaty, E., Bapat, B., Gallinger, S., and Redston, M. Beta-catenin mutations are specific for colorectal carcinomas with microsatellite instability but occur in endometrial carcinomas irrespective of mutator pathway. *Cancer Res*, *59*: 3346-3351, 1999.
139. Kimura, K., Nagasaka, T., Hoshizima, N., Sasamoto, H., Notohara, K., Takeda, M., Kominami, K., Iishii, T., Tanaka, N., and Matsubara, N. No duplicate KRAS mutation is identified on the same allele in gastric or colorectal cancer cells with multiple KRAS mutations. *J Int Med Res*, *35*: 450-457, 2007.
140. Alsop, K., Mead, L., Smith, L. D., Royce, S. G., Tesoriero, A. A., Young, J. P., Haydon, A., Grubb, G., Giles, G. G., Jenkins, M. A., Hopper, J. L., and Southey, M. C. Low somatic K-ras mutation frequency in colorectal cancer diagnosed under the age of 45 years. *Eur J Cancer*, *42*: 1357-1361, 2006.
141. Kressner, U., BJORHEIM, J., Westring, S., Wahlberg, S. S., Pahlman, L., Glimelius, B., Lindmark, G., Lindblom, A., and Borresen-Dale, A. L. Ki-ras mutations and prognosis in colorectal cancer. *Eur J Cancer*, *34*: 518-521, 1998.
142. Bos, J. L. ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res*, *49*: 4682-4689, 1989.
143. Smith, G., Carey, F. A., Beattie, J., Wilkie, M. J., Lightfoot, T. J., Coxhead, J., Garner, R. C., Steele, R. J., and Wolf, C. R. Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *99*: 9433-9438, 2002.



## **Anexos**

---



## **Anexos**

### **Anexo 1**

• **Gel de agarose 2% (p/v):**

5 g Agarose  
250 ml TBE 1x  
12,5 µL Brometo de etídio

• **Gel de agarose 1,2% (p/v):**

3 g Agarose  
250 ml TBE 1x  
12,5 µL Brometo de etídio

TBE 10x:

216 g Tris Base  
110 g ácido acético  
18,6 g EDTA  
Perfez-se com H<sub>2</sub>O destilada até 2 L, à temperatura ambiente  
Mediu-se o pH.

TBE 1x:

100 ml TBE 10x  
Perfez-se até 1 L com H<sub>2</sub>O destilada.

### **Anexo 2 – PTT**

#### **Gel de poliacrilamida SDS-PAGE:**

• **Gel selante:**

1500 µL Acrilamida: Bisacrilamida 30%  
400 µL Tampão A  
68,2 µL SDS 20%  
1360 µL H<sub>2</sub>O destilada  
50 µL APS (persulfato de amónia) 10%  
5 µL Temed

• **Gel resolvente:**

9100 µL Acrilamida: Bisacrilamida 30%  
2500 µL Tampão A  
204,6 µL SDS 20%  
8150 µL H<sub>2</sub>O destilada  
138,6 µL APS 10%  
13,8 µL Temed

• **Gel de compactação:**

1120 µL Acrilamida: Bisacrilamida 30%  
900 µL Tampão B  
75 µL SDS 20%

5400  $\mu$ L H<sub>2</sub>O destilada  
118  $\mu$ L APS 10%  
11,8  $\mu$ L Temed

Acrilamida: Bisacrilamida 30% (v/v):

300 g acrilamida  
8 g bis-acrilamida  
Perfez-se até 1 L H<sub>2</sub>O destilada e armazenou-se ao abrigo da luz, a 4°C.

Tampão A:

72,6 g Tris-base  
100 mL H<sub>2</sub>O destilada  
Ajustou-se o pH a 8,9 com HCl e perfez-se o volume para 200mL.

Tampão B:

11,4 g Tris-base  
100 mL H<sub>2</sub>O destilada  
Ajustou-se o pH a 6,7 com H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> e perfez-se o volume para 200mL.

SDS 20%:

100 mg de SDS  
Dissolveu-se em 400mL de H<sub>2</sub>O destilada, sob aquecimento.  
Perfez-se até 500 mL de H<sub>2</sub>O destilada.

APS 10% (v/v)

10g de APS  
100mL de H<sub>2</sub>O destilada.  
Armazenou-se a -20°C.

Tampão de amostra:

8 mL glicerol  
2,4 g SDS  
0,004 g azul de bromofenol  
Dissolveu-se em H<sub>2</sub>O destilada e perfez-se o volume até 1000mL.

Tampão de electroforese Tris-glicina/SDS 5 $\times$ :

30 g Tris-base  
144 g glicina  
5 g SDS  
Perfez-se até 1 L com H<sub>2</sub>O destilada

Tampão de electroforese Tris-glicina/SDS 1 $\times$ :

100mL de tampão de electroforese Tris-glicina/SDS 5 $\times$   
400mL de H<sub>2</sub>O destilada.

### Anexo 3 - DGGE

- Condições de electroforese correspondentes a cada exão do gene APC analisado por DGGE:

Exão	Tempo de electroforese	Gradiente de acrilamida (%)
4	4h	25 – 45
5	4h	25 – 35
6	4h	30 – 60/70
8	4h	30 – 50
10	4h	30 – 50
11	4h	30 – 60/70
12	4h	35 – 50
13	4h	35 – 50
14	4h	30 – 60

#### Gel de acrilamida:

- **Gel selante:**

Acrilamida 80%: 2000 µL

APS: 50 µL

TEMED: 5 µL

- **Gel resolvente**

% desnaturante	Acrilamida 0%	Acrilamida 80%
15	8.12	1.88
25	6.85	3.15
30	6.25	3.75
35	5.6	4.4
40	5	5
45	4.35	5.65
50	3.75	6.25
60	2.5	7.5
70	1.25	8.75
80	0	10

#### Polimerizantes:

APS: 152 µL

TEMED: 9.9 µL

#### Acrilamida 40% (v/v):

380 g acrilamida

20 g bisacrilamida

Dissolveu-se em 1000 ml de H<sub>2</sub>O destilada.

Desionizou-se durante 1h com 50 g de resina, filtrou-se e armazenou-se a 4°C ao abrigo da luz.

Acrilamida 0% (v/v) desnaturante:

162,5 ml acrilamida 40% (v/v)

20 ml TAE 50x

Perfez-se para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada e armazenou-se ao abrigo da luz a 4°C.

Acrilamida 80% (v/v) desnaturante:

162,5 ml 40%

20 ml TAE 50x

320 ml formamida desionizada

336 g ureia

Perfez-se para 1000 ml com H<sub>2</sub>O destilada e armazenou-se ao abrigo da luz a 4°C.

Solução de deposição:

25 ml glicerol

1 ml TAE 50x

0,1 g azul de bromofenol

Perfez-se com H<sub>2</sub>O destilada e armazenou-se a 4°C, ao abrigo da luz.

Tampão de electroforese: TAE (1x)

TAE (50x):

Tris 242.2 g

Acetato de sódio 82.03 g

EDTA 18.61 g

Acertou-se pH 7.5 com ácido acético

Perfez-se para 1 L com H<sub>2</sub>O destilada.

TAE 1x:

20 ml TAE 50x

Perfez-se 1 L com H<sub>2</sub>O destilada.

## **Anexo 4 – SSCP**

**Gel de acrilamida 8% com glicerol:**

21,30 ml acrilamida (59:1)

8,26 ml TBE 10x

46 ml H<sub>2</sub>O destilada

4 ml glicerol

**Gel de acrilamida 8% sem glicerol:**

21,30 ml acrilamida (59:1)

8,26 ml TBE 10x

50 ml H<sub>2</sub>O destilada

**Gel de acrilamida 10% sem glicerol:**

28,88 ml acrilamida (59:1)

8,26 ml TBE 10x

42,87 ml H<sub>2</sub>O destilada

Solução de deposição desnaturante:

47,5 ml formamida desionizada

0,04 g NaOH

0,05 g azul de bromofenol

0,05 g xileno de cianol

Perfez-se para 50 ml com H<sub>2</sub>O destilada e armazenou-se a 4°C ao abrigo da luz.

**Coloração do gel:**

• Etanol 10%:

143 ml etanol 70%

perfazer para 1 L com H<sub>2</sub>O destilada

• Ácido nítrico:

23 ml de ácido nítrico 37%

perfazer para 1 L com H<sub>2</sub>O destilada

• Nitrato de prata:

2.02 g de nitrato de prata

1 L de H<sub>2</sub>O destilada

• Carbonato de sódio:

30 g de carbonato de sódio

1 L de H<sub>2</sub>O destilada

• Ácido acético 10%:

100 mL de ácido acético 100%

900 mL de H<sub>2</sub>O destilada

**Anexo 5** – Indivíduos analisados para os genes *APC*, *BRAF*, *K-ras* e *β-catenina*, com identificação das respectivas mutações.

idade	indivíduo	APC		BRAF	KRAS	β-catenina
		mutações pontuais	LOH			
≤ 45 anos	T6040	R499X (C1495T); 2140*	I	N	N	45 del TCT
	T7031	1080*;1143*;1259*	I	N	N	N
	T7143	1442 ins T	I	N	N	S45F (C134T)
	T7145	2172*	I	N	N	N
	T7162	N	NI	N	N	N
	T13034	806*	N	N	N	N
	T18006	1318 duplc 1274-1318	+	N	G12V (G35T)	N
	T20036	G1905X (C5713T)	NI	N	N	N
	T20055	1458*	NI	N	N	N
	T20097	N	+	N	N	N
	T21046	N	+	N	N	N
	T25040	R876X (C2626T); 1477*	N	N	N	N
	T27008	N	NI	N	N	N
	PL10T	2059*	N	N	G13D (G38A)	N
	PL12T	N	N	N	N	N
	PL13T	N	N	N	N	N
	PL15T	N	N	N	N	N
	PL18T	2820*	N	N	N	N
	PL19T	N	I	N	N	N
	PL24T	N	NI	N	13 ins TGG	N
	149/98T	1061*	N	N	N	N
	47	R1114X (C3340T)	+	N	N	N
	87	N	I	N	N	N
	CA1339T	1403*	N	N	N	N
> 50 anos	7	903 del 2bp	N	N	N	N
	15	G1303X (C3907T)	N	N	N	N
	27	1309 del AAAGA	+	N	N	N
	29	N	N	N	N	N
	31	R232X (C694T); N	N	N	N	N
	35	R232X (C694T); 1317 del G	N	N	N	N
	37	785 ins TCTCTCAT; G1367X (C4099T)	N	N	N	N
	39	N	N	N	N	N
	45	G1477X (C4429T)	NI	N	N	N
	49	N	NI	N	N	N
	57	N	+	N	N	N
	63	1187*; R1450X (C4348T)	N	N	N	N
	65	E1451X (G4351T)	N	N	N	N
	69	E1397X (G4189T)	N	N	N	N
	325T	849 ins A; R1450X (C4348T)	NI	N	N	N
	3	N	N	N	G13D (G38A)	N
	9	1180*; R1450X (C4348T)	+	a	a	a
	25	E868X (G2604T)	N	N	N	N
	33	R1114X (C3340T)	+	N	N	N
	51	E1309X (G3925T)	NI	N	N	N
	53	IVS833-6 A→G	NI	N	N	N
	55	N	N	N	N	N
	59	N	N	N	N	N
	61	1300 ins A	N	N	N	N
	67	N	N	N	N	N
	71	1218*;1557*	a	a	a	a
	97	N	NI	N	N	N
	115	1363 ins A	a	a	a	a
	121	N	a	N	N	N
	123	910 del CTGAATTA; 1556 ins A	+	N	N	N
	125	1309 del AAAGA	+	N	N	N
	127	R1450X (C4348T)	a	N	N	N
	129	1465 del AG	NI	N	N	N
	139	N	NI	N	N	N
CA885T	673*	N	N	N	N	
E430T	N	I	N	N	N	
E443T	R876X (C2626T); R1450X (C4348T)	NI	N	N	N	

\* casos cuja mutação do gene APC detectada por PTT não foi confirmada por sequenciação

+ LOH para pelo menos 3 marcadores ou para 2 marcadores, caso os restantes sejam NI

N - indivíduos normais, sem mutações ou sem LOH para pelo menos 3 marcadores ou para 2 marcadores, caso os restantes sejam NI

NI - não informativo, ou seja homocigótico para 3 marcadores ou para 2 marcadores quando os restantes são heterocigotos (instáveis/com LOH/sem LOH)

I - instável para pelo menos 1 marcador

a - indivíduos cujo X não foi amplificado por falta de X