



LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE

ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE APC EM FAMILIAS COM
POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR

*APC GERMILE MUTATIONS IN FAMILIES WITH FAMILIAL
ADENOMATOUS POLYPOSIS*

CAMPINAS
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE

ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE *APC* EM FAMILIAS COM POLIPOSE
ADENOMATOSA FAMILIAR

*APC GERMILE MUTATIONS IN FAMILIES WITH FAMILIAL
ADENOMATOUS POLYPOSIS*

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Ciências, na área de concentração Clínica Médica.

ORIENTAÇÃO: PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

Doctoral Thesis presented to the Internal Medicine Posgraduate Program of
the Faculty of Medical Sciences, State University of Campinas, for obtainment
of the Ph.D. degree Medical Sciences, specialization in Internal Medicine.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE E
ORIENTADA PELA PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

Assinatura da Orientadora

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R733e Rossanese, Lillian Barbosa de Queiroz, 1980-
Estudo de mutações no gene APC em famílias com
polipose adenomatosa familiar / Lillian Barbosa de
Queiroz Rossanese. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.

Orientador : Carmen Silvia Bertuzzo.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Análise de sequência de DNA. 2. Síndromes
neoplásicas hereditárias. 3. Neoplasias colorretais. I.
Bertuzzo, Carmen Silvia, 1963-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: APC germ-line mutations in families with amilal adenomitous polyposis.

Palavras-chave em inglês:

Sequence Analysis, DNA

Neoplastic syndromes, Hereditary

Colorectal neoplasms

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Carmen Silvia Bertuzzo [Orientador]

Fábio Rossi Torres

Mônica Barbosa de Melo

Marilda de Souza Gonçalves

Ana Lucia Brunialti Godard

Data da defesa: 18-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE

Orientadora PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO



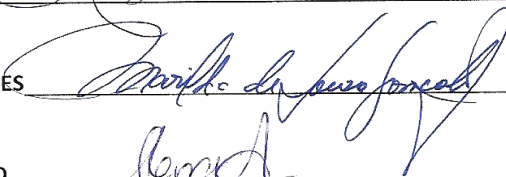
2. PROF. DR. FÁBIO ROSSI TORRES



3. PROFA. DRA. MÔNICA BARBOSA DE MELO



4. PROFA. DRA. MARILDA DE SOUZA GONÇALVES



5. PROFA. DRA. ANA LUCIA BRUNIALTI GODARD



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 18 de dezembro de 2012

Aos meus pais, Nelson e Ivanilde.

AGRADECIMENTOS

à Deus, pela graça de cada dia.

à Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo, pela amizade, pelas palavras de conforto e incentivo, e pela orientação científica ao longo desses onze anos.

aos meus pais, Nelson e Ivanilde, que por uma vida de dedicação, amor e trabalho sempre possibilitaram a seus filhos a oportunidade de realizar sonhos e conquistas.

ao meu marido, Renner Roberto Rossanese, pela cumplicidade, apoio e dedicação para a conclusão desse trabalho. Te amo!

à Marilza de Lima Santos, pela amizade, apoio, instruções desde os primeiros momentos de bancada. A sua amizade foi extremamente importante para eu conseguir superar todas as dificuldades que surgiram nesse período.

ao Ms. Fernando Augusto de Lima Marson, o “*Fer*” pelo auxílio na elaboração da tese, pelas sugestões e momentos de conversa.

à Maria Madalena Vasconcelos Rosa, a “*Madá*”, pelo auxílio na bancada e pelos momentos de conversas e incentivo.

as minhas irmãs, Fabiana e Viviane pelo apoio.

ao Prof. Dr. Rodrigo Secolin pelas sugestões e auxílio no desenvolvimento da tese.

aos alunos, funcionários e docentes do Departamento de Genética Molecular e Citogenética Humana, pela convivência.

ao Prof. Dr. Claudio Saddy Rodrigues Coy, Prof. Dr. José Dirceu Ribeiro.

aos pesquisadores Prof. Dr. Fábio Rossi Torres, Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo, Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves e Profa. Dra. Ana Lucia Brunialti Godard pelas sugestões nas correções dessa tese.

à CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

Mutações germinativas no gene *APC* (Polipose adenomatosa coli) são responsáveis pela ocorrência de polipose adenomatosa familiar (PAF). Mutações somáticas levam à transformação maligna de adenomas. O objetivo desse trabalho foi identificar mutações germinativas no gene *APC*. No presente estudo, 20 pacientes com PAF foram estudados.

A determinação das mutações germinativas no *APC* foi realizada por meio de sequenciamento, e as mutações foram comparadas com marcadores clínicos (sexo, idade no momento do diagnóstico, tabagismo, estágio TNM, classificação Coller-Astler e o grau de diferenciação do adenocarcinoma).

Os dados foram comparados por meio do programa SPSS , com o teste de Fisher e teste de χ^2 , considerando $\alpha = 0,05$. De acordo com os principais resultados da nossa amostra, 16 alelos com mutações deletérias (80 % dos pacientes) foram identificados, enquanto 7 (35%) pacientes não tinham mutações deletérias.

Houve um predomínio de mutações *nonsense* (45% dos pacientes) e de mutações *frameshift* (20% dos pacientes). Não houve significância estatística entre as mutações germinativas identificadas e as variáveis clínicas consideradas em nosso estudo. Apenas a fase TNM foi associada com a presença de mutações deletérias. Os portadores com mutações deletérias tinha uma OR , 0,086 (IC = 0,001-0,984); TNM I + II em comparação com III + IV , quando comparado com os pacientes sem mutações deletérias identificados. Neste estudo, demonstramos a heterogeneidade molecular de mutações germinativas no APC em portadores de PAF e a dificuldade para realizar diagnóstico molecular em uma população brasileira.

Palavras-chave: gene *APC*, polipose adenomatosa familiar (PAF) e detecção molecular.

ABSTRACT

Adenomatous polyposis coli (APC) germline mutations are responsible for the occurrence of familial adenomatous polyposis (FAP). Somatic mutations lead to malignant transformation of adenomas. In this context, considering the significance of APC germline mutations in FAP, we aimed to identify APC germline mutations. In the present study, 20 FAP patients were enrolled.

The determination of APC germline mutations was performed using sequencing, and the mutations were compared with clinical markers (gender, age at diagnosis, smoking habits, TNM stage, Astler-Coller stage, degree of differentiation of adenocarcinoma).

The data were compared using the SPSS program, with the Fisher's exact test and χ^2 test, considering $\alpha=0.05$. According to the main results in our sample, 16 alleles with deleterious mutations (80% of the patients) were identified while 7 (35%) patients had no deleterious mutations.

There was a predominance of nonsense (45% of the patients) and frameshift (20% of the patients) mutations. There was no statistical significance between the APC germline mutations identified and the clinical variables considered in our study. Only TNM stage was associated with the presence of deleterious mutations. Patients with deleterious mutations had an OR, 0.086 (IC=0.001-0.984); TNM stage I + II in comparison with III + IV, when compared with the patients with no deleterious mutations identified. In this context, as a conclusion, we demonstrated the molecular heterogeneity of APC germline mutations in FAP and the difficulty to perform molecular diagnostics in a Brazilian population, considering the admixed population analyzed.

Keywords: APC, Germ-line Mutations, familial adenomatous polyposis, FAP, molecular detection

LISTA DE ABREVIATURAS

APC: adenomatous polyposis coli

APC: proteína adenomatous polyposis coli

CCR: Câncer colorretal

CTNNB1: gene β -catenina

DNA: ácido desoxirribonucléico

EDA: Endoscopia Digestiva Alta

GSK-3 β : glicogênio sintetase kinase 3-beta

HCERP: Hipertrofia do epitélio pigmentado da retina

HNPCC: câncer colorretal hereditário não-poliposo

MEC: Manifestações extra-colônicas

PAF: Polipose adenomatosa familiar

PAFA: Polipose Adenomatosa familiar atenuada

TCF: proteína transcription factor

Wnt: via homóloga de Wingless

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Classificação de Spigelman para adenomas duodenais em PAF 40

Quadro 2: Recomendação da realização de EDA com base na classificação de Spigelman 41

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição proporcional dos 10 tipo de câncer mais incidentes no Brasil, estimados para 2012.....	19
Figura 2: Epitélio colônico normal	21
Figura 3: Atividade proliferativa normal da cripta	22
Figura 4: Distúrbio proliferativo no pólipó adenomatoso	23
Figura 5:Acúmulo de células epiteliais na formação do pólipó adenomatoso	24
Figura 6: Sequência de eventos para carcinogênese CCR.....	27
Figura 7: Comparação das mucosas colorretais	31
Figura 8: Localização das manifestações extra-colônicas	33
Figura 9: Osteomas da mandíbula em pacientes PAF	35
Figura 10: Alterações dentárias em pacientes PAF	36
Figura 11: Aspectos típicos da HEPR em pacientes PAF	37
Figura 12: Representação da localização do gene <i>APC</i>	43

Figura 13: Papel do gene *APC* na via Wnt/beta-catenina. (A) Na presença da ação do *APC* e ausência da via Wnt, a beta catenina está localizada nas junções aderentes..... 46

Figura 14: Imagem de enema opaco normal..... 51

SUMÁRIO

I-INTRODUÇÃO	16
1.1-Pólipos Adenomatosos.....	20
1.2-Carcinogênese	25
1.3-Polipose Adenomatosa Familiar.....	29
1.3.1-Histórico	29
1.3.2-Manifestações Clínicas	30
1.3.2.1-Osteomas	31
1.3.2.2-Anormalidades Dentárias.....	35
1.3.2.3-HCEPR	36
1.3.2.4-Tumores Desmóides.....	37
1.3.2.5-Pólipos do estômago, duodeno e do intestino delgado.....	39
1.3.3-Genética da PAF	42
1.3.4- Variante da PAF	47
1.3.5-Correlações Genótipo-Fenótipo	48
1.3.6-Diagnóstico e Tratamento da PAF	50
II-OBJETIVO	53
III- CAPÍTULO I	55
IV- CONCLUSÃO	64
V- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
VI- ANEXOS	76

I-INTRODUÇÃO



O câncer constitui um conjunto de doenças, cujo fator comum é o crescimento desordenado de células (Winawer&Cohen, 1995). O Câncer colorretal (CCR) é o resultado de um processo de múltiplas etapas, nas quais ocorrem alterações genéticas que levam ao surgimento de um clone de células com vantagens proliferativas sobre as demais. Com isso, a arquitetura normal dos tecidos é modificada, levando progressivamente a disfunções (Chammas & Novak, 2005)

Todas as células existem sob estrita regulação de sinais para o controle de crescimento, apoptose, diferenciação, interação célula-célula e interação célula-matriz extracelular. Os processos genéticos envolvidos na oncogênese resultam na ativação de oncogenes e na inativação de genes supressores de tumor (Gatallica&Torlakovic, 2008).

O CCR é uma das causas mais frequentes de morte por câncer nos países industrializados, tanto em homens como em mulheres. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento da população, à adoção de estilos de vida com tendências mais sedentárias e a um aumento na preferência de aceitação de dietas pouco saudáveis (Franco *et al.*,2005; INCA, 2011).

Diferenças geográficas na incidência do CCR foram descritas na literatura. De maneira geral os países do ocidente têm maior incidência que os do oriente. Por exemplo, dos indivíduos que migraram para Israel, aqueles nascidos na

Europa ou nos Estados Unidos tem um maior risco que aqueles nascidos na África ou na Ásia. Entre os japoneses, o risco daqueles que emigraram para os Estados Unidos aproxima-se do risco da população americana, que é de três a quatro vezes maiores que o daqueles que permaneceram no Japão (Giráldez *et al*, 2012).

Tais variações sugerem não somente a existência de um componente étnico e genético, mas também que os fatores ambientais exercem um importante papel na patogênese deste tipo de câncer. Como fatores ambientais considera-se uma vasta gama de práticas e atitudes difíceis de definir, como as culturais, sociais e alimentares, com destaque para dieta derivada de fontes animais, alimentos ricos em gordura e em calorias e pobres em fibras, sedentarismo, fumo, obesidade, consumo de álcool e ingestão de aminas heterocíclicas e de hidrocarbonetos aromáticos ou seja, o estilo de vida particular a cada população e indivíduo (Ghazi *et al* 2010; Pinho *et al*, 2010).

No mundo todo, quase um milhão de pessoas desenvolvem CCR a cada ano. Destes, cerca de 50% pode morrer de doença sistêmica no prazo de 5 anos de diagnóstico. Ao longo dos últimos 20 anos, os avanços em programas de técnicas cirúrgicas, quimioterapia adjuvante e programas de vigilância têm melhorado a taxa de sobrevida em 5 anos (Newton *et al*, 2012; Cancer World, 2007).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) projetam em torno de 518.510 casos de câncer para o ano de 2012. Na figura 1, estão descritos os dez tipos de câncer mais incidentes em nossa população. O CCR é o terceiro tipo mais incidente. Esperam-se 14.180 casos novos de câncer de cólon e reto em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 novos casos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2011).

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

Figura 1: Distribuição proporcional dos 10 tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo. Fonte: INCA.2011

O CCR resulta da interação entre fatores genéticos e fatores ambientais. As alterações genéticas que contribuem para o surgimento de CCR podem ser adquiridas ou hereditárias. A maioria dos pacientes é portadora do câncer colorretal esporádico e não apresenta evidências de doença herdada geneticamente (Nieuwenhuis & Vasen, 2007).

De acordo com a American Cancer Society (2013), o pólipo adenomatoso tem papel fundamental no desenvolvimento do câncer, sendo reconhecida como uma lesão precursora.

Um pólipo representa uma massa tumoral profusa em direção à luz intestinal. Os pólipos que continuam acumulando novas células e crescendo são denominados neoplásicos. Quando de origem epitelial, são denominados adenomas (Tygat & Silvertein, 1997).

1.1- PÓLIPOS ADENOMATOSOS

Os pólipos Adenomatosos representam lesões neoplásicas pré-malignas do intestino grosso. A prevalência dos adenomas na população geral é de 20 a 30% abaixo dos 40 anos e entre 40 a 50% após os 60 anos (INCA, 2012).

A frequência é a mesma para ambos os sexos, havendo uma bem definida predisposição familiar para o surgimento de adenomas esporádicos. O risco de malignidade em um pólipo adenomatoso correlaciona-se ao tamanho do pólipo, arquitetura histológica e grau de displasia epitelial (Cotti *et al*, 2000)

O epitélio gastrointestinal é um tecido dotado de dinâmica ativa, que tem a necessidade de reposição constante de novas células, para substituir aquelas perdidas na apoptose. A mucosa colônica é composta por criptas dispostas de

forma vertical, paralelas entre si e entremeadas por um tecido denominado lâmina própria (Figura 2). Abaixo da linha correspondente ao posicionamento das bases das criptas vê-se a camada muscular da mucosa e depois dela encontra-se a submucosa, tecido rico em vasos sanguíneos e linfáticos (Dias *et al*, 2007).

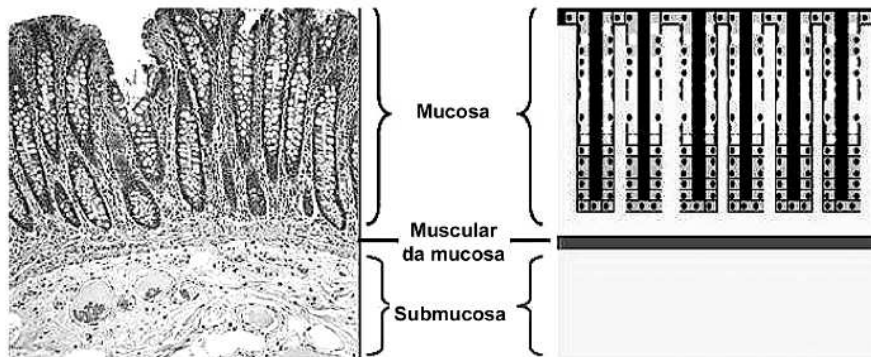


Figura 2: Epitélio colônico normal (Fonte: Pinho M.S.L, 2005.)

Pinho, 2005, descreveu que as criptas podem ser divididas em três áreas distintas: Zona proliferativa 1, Zona proliferativa 2 e Superfície Epitelial (Figura 3).

- a) *Zona proliferativa 1*, está situada na parte mais inferior das criptas, as células dessa região ainda são indiferenciadas e apresentam elevada frequência de mitoses e ausências de apoptoses. A elevada frequência de mitose demonstra a função na produção de novas células, que progressivamente ascenderão ao longo da cripta em direção à superfície da mucosa.
- b) *Zona proliferativa 2*, ocupa a região média da cripta, nessa zona observam-se células com padrão histológico típico dos colonócitos, com produção de

mucosidade representada pela presença de múltiplas células caliciformes e polaridade dos núcleos dispostos de forma uniforme na base das células, próximo à sua fixação a membrana basal. Observa-se atividade mitótica ativa e ausência de apoptose.

c) *Superfície Epitelial*: região mais superficial da cripta junto a luz intestinal, observam-se colonócitos típicos (células diferenciadas), sem atividade mitótica e ocorrência de apoptose em grande número de células, seguida de descamação para a luz intestinal.

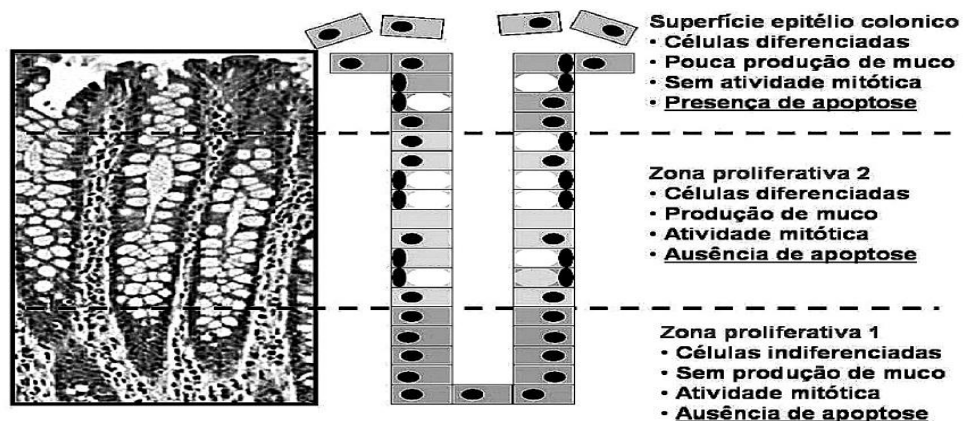


Figura 3: Atividade proliferativa normal da cripta (Fonte: Pinho M.S.L, 2005.)

O surgimento dos pólipos adenomatosos, são consequências de alterações na dinâmica proliferativa em relação à mucosa normal. Observa-se o crescimento da zona proliferativa 1, com perda progressiva do padrão característico da zona proliferativa 2 com conseqüente substituição dos colonócitos normais por células pouco diferenciadas e redução acentuada da produção de mucina (figura 4).

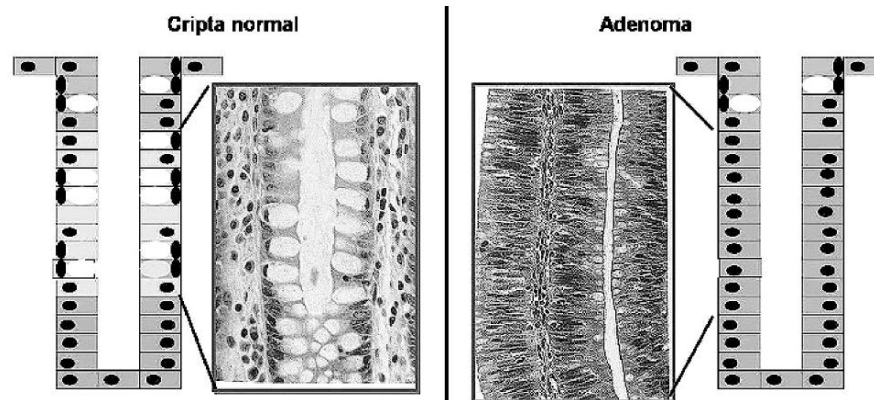


Figura 4: Distúrbio proliferativo no pólipio adenomatoso.

(Fonte: Pinho M.S.L, 2005.)

Os núcleos perdem seu posicionamento basal na célula e assumem padrão conhecido como pseudoestratificação, característico da grande atividade proliferativa. Além desse crescimento da zona proliferativa, com o aumento do número de mitoses e surgimento de novas células, outra alteração ocorre na extremidade superior da cripta, com redução de apoptose. Como consequência dessas duas alterações proliferativas, simultaneamente caracterizadas por produção maior de novas células nas criptas e redução da morte celular epitelial, ocorre o acúmulo progressivo dessas células no nível da superfície mucosa (figura 5). A progressão desse acúmulo celular gerado pelo desequilíbrio proliferativo finalmente dará origem a um pólipio macroscopicamente identificável por exames endoscópicos (Pinho, 2005; Manzione *et al*, 2004)

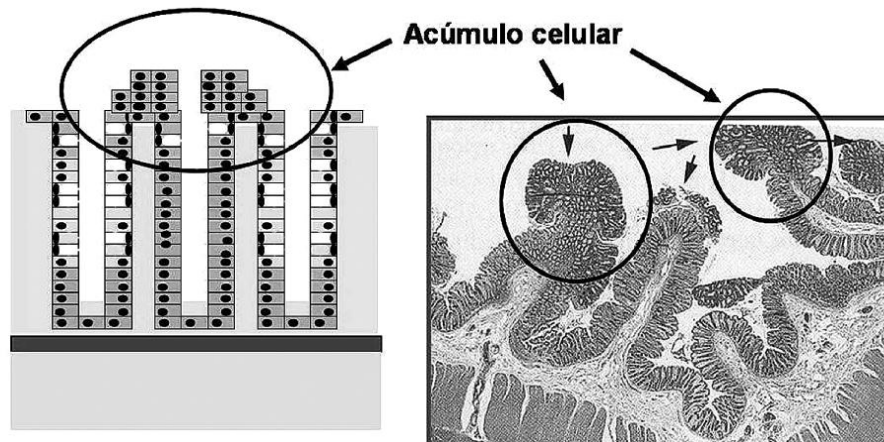


Figura 5: Acúmulo de células epiteliais na formação do pólip adenomatoso

(Fonte: Pinho M.S.L, 2005.)

A ação de proteínas determina as atividades celulares e pode ocorrer a partir de sua presença no interior da célula ou por contato externo a ela com receptores existentes em sua membrana que, por, seu turno, podem desencadear efeitos intracelulares por meio de uma sequência de reações em cascata (Dias *et al*, 2007; Manzione *et al*, 2004).

Estudos identificaram diversas proteínas que exercem controle importante sobre a atividade proliferativa das células da mucosa colônica. A proteína APC exerce em condições normais a função supressora através da inibição da divisão celular, a β -catenina representa um estímulo à divisão celular e a survivina desempenha ação inibidora da apoptose prolongando a sobrevivência da célula. (Chang *et al*, 2009).

1.2- CARCINOGENESE

O caminho final dos cânceres é alguma alteração genética que converte uma célula bem constituída, participante do corpo como um todo, em outra que não responde mais aos comandos de uma comunidade de células (Dumitrescu & Cotarla, 2005; Russo *et al.*, 2000).

Há duas classes principais de genes que podem sofrer mutações e contribuir para a gênese do câncer, os oncogenes e os genes supressores de tumor. Os oncogenes (proto-oncogenes) e genes supressores de tumores têm papel decisivo em muitos casos. Substâncias químicas (como benzeno e nitrosaminas), agentes físicos (radiação ultravioleta e gama) e agentes biológicos (vírus) contribuem para a carcinogênese em algumas circunstâncias (Dumitrescu & Cotarla, 2005).

Os oncogenes são proto-oncogenes que sofreram mutações ativadoras, ou seja, que passaram a ter um ganho de função ou hiperexpressão. Uma característica importante dos oncogenes é que eles têm efeito dominante na célula, ou seja, um único alelo mutado é suficiente para alterar o fenótipo de uma célula normal para maligna. Esses genes são responsáveis por aumentar a proliferação celular, ao mesmo tempo em que inibem a apoptose, eventos que podem dar início a uma neoplasia. São exemplos de proto-oncogenes os genes *NRAS*, *H-RAS*, *K-RAS* e *c-MYC*. (Alberts, 1997; Martinez *et al*, 2006).

Além dos proto-oncogenes outro tipo de gene que está envolvido no aparecimento e desenvolvimento de certos tipos de cânceres. Esses genes são denominados supressores tumorais, ou antioncogenes, atuam de maneira diferente dos oncogenes. As proteínas codificadas pelos genes supressores estão envolvidas na repressão do crescimento e divisão das células. Portanto, perda ou mutação nos dois alelos de antioncogenes pode levar ao crescimento descontrolado devido à remoção dos mecanismos que regularizam a divisão celular. São exemplo de genes supressores de tumores o gene *APC*, *BRCA1* e *PT53* (Martinez et al, 2006).

É fato bem estabelecido que o acúmulo de alterações gênicas pode levar ao desenvolvimento do câncer. A maioria dos cânceres surge da inativação mutacional dos genes supressores ou da ativação de oncogenes (Lawes *et al*, 2008).

A carcinogênese do CCR foi descrita por Fearon & Vogelstein em 1995, onde demonstraram a relação entre as alterações genotípicas e fenotípicas no CCR. Eles descobriram que as neoplasias são de natureza clonal, ou seja, todas as células malignas de um tumor derivam de um único progenitor. Esta célula progenitora experimenta uma ou mais mutações que lhe conferem vantagens proliferativas. Uma vez que uma célula filha adquire uma nova mutação que se traduz em vantagem biológica adicional, uma nova expansão clonal ocorre. Este processo se sucede até que uma célula adquira uma série mutações suficiente

para torná-la independente do controle do meio, com crescimento desordenado, evasão de mecanismos normais de apoptose, indução de angiogênese, instabilidade genômica importante, capacidade de invasão local e dos tecidos adjacentes e finalmente, a capacidade de se transformar em metástase (Martinez *et al*, 2006).

Fearon & Vogelstein (1995), descreveu que após a mutação do gene *APC*, ocorram outras mutações em genes diferentes, entre os quais *k-ras*, *DCC* e o *p53*. Cada uma dessas mutações produzem uma vantagem clonal seletiva, levando a progressão desde o adenoma simples até o CCR.

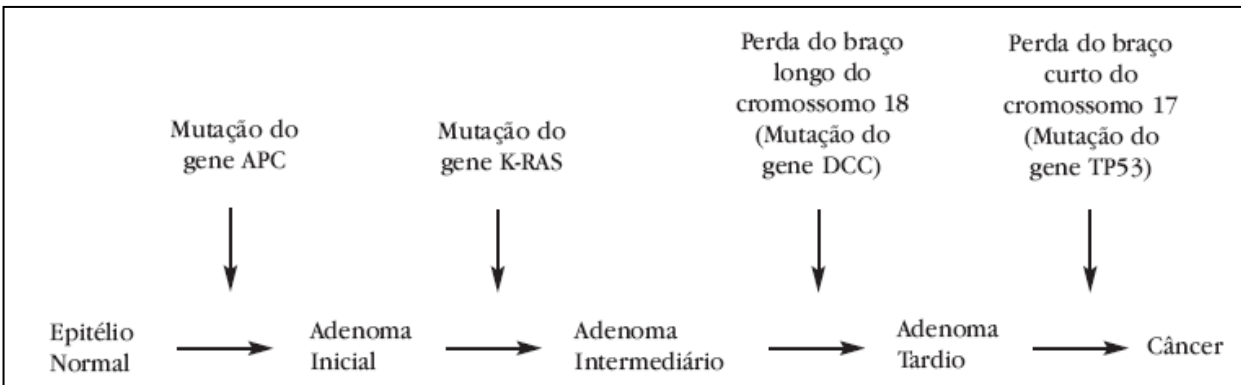


Figura 6: Sequência de eventos para a carcinogênese CCR. (Modificada de Martinez *et al*, 2006)

Assim surgiu a sequência de mutações dos genes codificadores das proteínas *APC/k-ras/DCC/p53* (Figura 7). Após a ocorrência do distúrbio proliferativo na mucosa intestinal é necessária a ativação de processo local de angiogênese para o desenvolvimento tumoral, seguida da penetração na

membrana basal para que ocorra metástase pela invasão e migração dos vasos linfáticos.

Fatores de riscos aumentam a chance de uma pessoa desenvolver câncer. Os principais fatores de risco para CCR são idade acima de 50 anos, história pessoal ou familiar de pólipos, de cânceres colorretal, de ovário, de útero ou de mama, doenças inflamatórias intestinais (colite ulcerativa e doença de Crohn) e hereditárias. As síndromes familiares típicas são responsáveis por cerca de 6% de casos de CCR. As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são: o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC - *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), responsável por cerca de 5% dos casos e a Polipose Adenomatosa Familiar, responsável por menos de 1% dos casos (Heinen,2009).

A Polipose Adenomatosa Familiar (PAF, do inglês *familial adenomatous polyposis*) é uma das mais claramente definidas e bem compreendidas síndromes herdadas de câncer colorretal. É uma desordem autossômica dominante que tipicamente se apresenta sob a forma de câncer de cólon e reto em adultos jovens, secundária à extensa polipose adenomatosa presente no cólon dos pacientes, sendo uma condição clínica em que há tendência herdada para que se desenvolvam grande número de pólipos adenomatosos (Leblanch, 2001).

Estudos associaram carcinomas e pólipos colorretais baseado em observações clínicas, epidemiológicas e anátomo-patológicas (Myoshi *et al*,1992; Nieuwenhuis & Vasen,2007; Half *et al*, 2009).

1.3- POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR

1.3.1 - HISTÓRICO

A PAF foi descrita pela primeira vez observada em meados do século XVIII e sua natureza genética já era conhecida em 1900. Entretanto, sua patogênese molecular foi elucidada apenas na década de 1980.

Segundo Imperiale & Campos (2010), o primeiro caso de PAF pode ter sido descrito por Chargelaigue em 1859 em uma menina de 16 anos e um homem de 21 anos de idade. Segundo outro levantamento por Bulow em 1987, a história da polipose começa em 1861, num relato de Luschka e a primeira publicação definitiva de um paciente com pólipos colônicos múltiplos ocorreu em 1881 por Sklifosovski.

Em 1882, coube a Cripps chamar a atenção para sua natureza familiar, descrevendo irmão e irmã com a doença (OMIM, 2012; Imperiale&Campos 2010). Em 1987 Shimith, reconheceu seu potencial maligno. Somente algumas décadas depois, Lockhart-Mummery relatou que a ideia de que a predisposição hereditária

dessa condição não era para o desenvolvimento do câncer, mas sim para múltiplos adenomas com enormes chances para transformação maligna. A investigação de três famílias com múltiplos adenomas culminou com a fundação do primeiro registro de polipose do mundo, em 1924 (OMIM, 2012).

Denominações como polipose múltipla, polipose disseminada, adenomatose familiar, polipose familiar do cólon, polipose intestinal adenomatosa e outras foram utilizadas para descrever essa doença. O termo Polipose Adenomatosa familiar foi sugerido pelo Less Castle Polyposus Group, para destacar a origem dos pólipos e o caráter hereditário da doença (OMIM, 2012; Imperiale & Campos, 2010).

1.3.2- MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

A PAF é caracterizada por polipose adenomatosa do cólon e reto . Esta é uma doença pré-maligna, onde um ou mais pólipos progridem de displasia para câncer nos portadores não tratados. A carcinogênese pode se apresentar em qualquer idade, desde a infância até a sétima década de vida. Muitos pacientes desenvolvem os pólipos de forma assintomática (Heinen C.; 2009).

PAF é uma doença que geralmente se manifesta na puberdade, com aparecimento de pólipos em diferentes estágios de evolução e grau de degeneração celular (Campos *et al*, 2003).

Aproximadamente 15% dos pacientes desenvolvem pólipos apenas aos 10 anos de idade e 90% deles aparecem até os 30 anos. Aos 10 anos de idade, apenas 15% dos portadores manifestam os adenomas, entretanto, aos 20, esse valor sobe para 75% e aos 30, para 90%. Aos 35 anos, 95% dos indivíduos têm pólipos. A figura 8, apresenta a comparação de mucosas colorretais na fase inicial da polipose e após o desenvolvimento de centenas de pólipos (Half C., 2009).

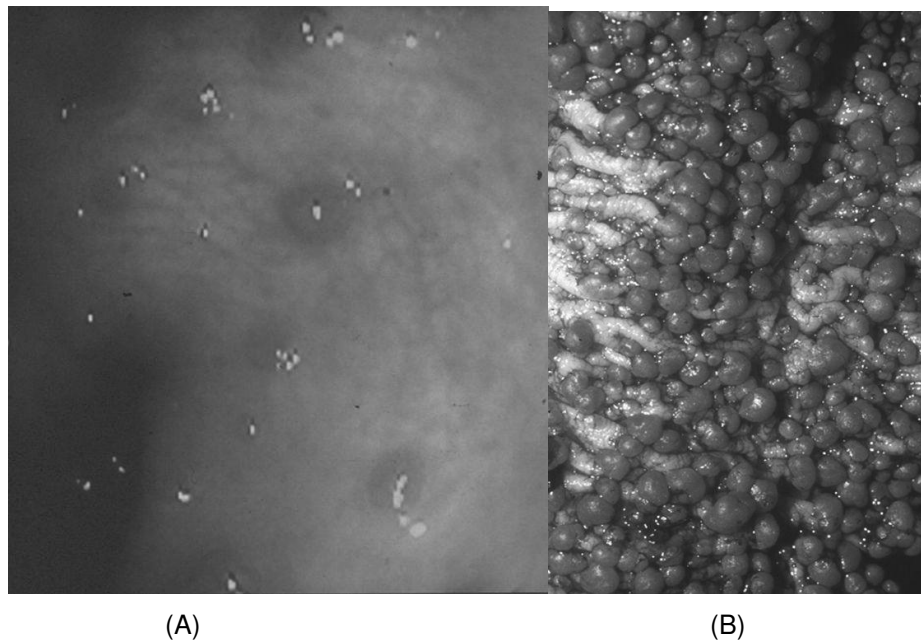


Figura 7: Comparação de mucosas colorretais - (A) Aparência inicial da PAF através de endoscopia. (B) Aparência dos pólipos desenvolvidos através de endoscopia. (Fonte: Half C., 2009).

Uma vez presentes, os pólipos rapidamente crescem em número, sendo que, quando há completa expressão colônica, podem ser observadas de centenas a milhares de lesões. Se não for feita colectomia, o câncer é inevitável. Nesses casos, onde o indivíduo não é tratado, aos 39 anos a maioria começa a apresentar neoplasia (média de 34 a 43 anos). Aos 21 anos, 7% dos pacientes desenvolvem câncer, 87% aos 45 anos e 93% aos 50 anos. Embora muito raros, existem indivíduos assintomáticos ainda aos 50 anos (Chang *et al*, 2009).

Shinmura *et al* (2008), descreveu que nos primeiros anos da doença, os sintomas são vagos ou ausentes, entretanto, alguns sintomas podem ocorrer:

- presença de sangue nas fezes;
- períodos de diarreia e/ou constipação não explicados pela dieta ou por viroses;
- dor em cólica na região gástrica;
- sensação frequente de distensão abdominal;
- perda de peso persistente e não explicada;

Os múltiplos pólipos adenomatosos da PAF são iguais aos encontrados em pacientes com pólipos não relacionados à polipose, diferenciando apenas no

numero e na época de aparecimento. Sua apresentação macroscópica varia de pequenas áreas de hiperplasia da mucosa até as estruturas com vários centímetros. A gravidade da polipose colônica é atestada pelo número de pólipos observados a colonoscopia e na peça cirúrgica (Campos *et al*, 2010)

Além do cólon e reto, podem ocorrer manifestações extra-colônicas (MEC) nos portadores de PAF. As localizações das MEC estão representadas na figura 8. Os pólipos podem aparecer no trato digestivo superior (estômago e duodeno), no intestino delgado, na tireoide, nas adrenais, no pâncreas e na hipófise de pacientes com PAF. Campos *et al*. (2010), observaram a incidência de MEC em 40% dos pacientes tratados.

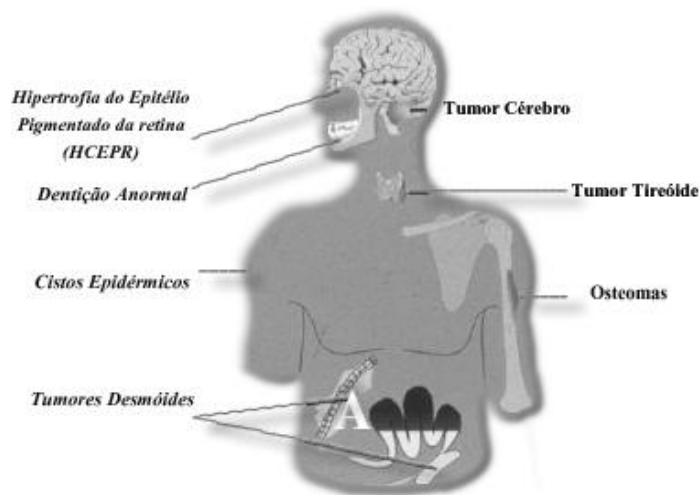


Figura 8: Localização das manifestações Extra-colônicas (Fonte: Half *et al*, 2009).

Outras MEC benignas incluem cistos sebáceos, lipomas, osteomas, dedos hipocráticos, anormalidades dentárias, lesões na retina. Dentre as manifestações malignas, estudos relataram tumores da região periambilar, em ductos biliares e gástricos, no íleo, na tireoide, na adrenal e no sistema nervoso central.

1.3.2.1 - OSTEOMAS

Osteomas são crescimentos ósseos principalmente no crânio e na mandíbula, podendo, ocorrer em qualquer osso do corpo. Foram primeiramente descritos por Gardner e Richards em 1953. São comuns na face (figura 9) e menos frequente em ossos frontais e occipitais (Patel&Ahnen,2012).

Essas lesões aparecem antes do diagnóstico da polipose, podendo sugerir herança genética em descendentes de indivíduos afetados. Na maioria dos casos, os osteomas surgem na puberdade (Cotti *et al*, 2010).

A incidência relatada é bastante variável (14 a 93%), refletindo a frequência na assiduidade com que procuram tais lesões, na interpretação das radiografias e na idade em que são pesquisadas. Campos (2006) descreveu a incidência no Brasil de 17,4%. Em estudo realizado na Escandinávia com 180 pacientes, sua incidência foi de 21% em pacientes com PAF, diferenciando de um estudo japonês, realizado por Katou *et al* (1989) que durante dez anos analisou 26

portadores de FAP e comparou-os com 264 pessoas de um grupo controle, concluiu que as lesões osteomatosas estavam presentes em 64% dos pacientes e em apenas 14% dos controles.

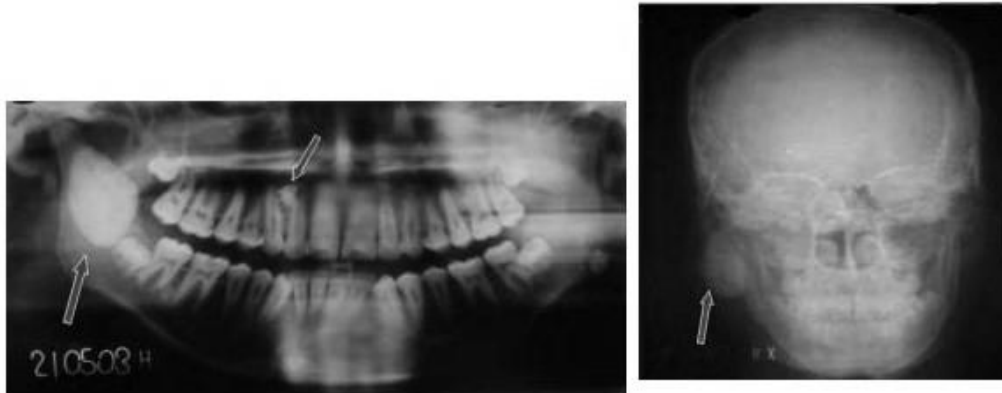


Figura 9: Osteomas de mandíbula em pacientes com PAF (Fonte: Sarmiento,2006)

Alguns osteomas podem ter o formato de gotas que parecem estar penduradas na borda inferior da mandíbula. Aproximadamente 50% dos casos de PAF com osteomas apresentam 3 ou mais lesões na maxila e em outras localidades (Cotti *et al*, 2010).

1.3.2.2 –ANORMALIDADES DENTÁRIAS

Atraso na dentição, ausência de um ou mais dentes, dentes supranuméricos, cistos dentários são reportados em aproximadamente 17% dos

indivíduos com FAP em contrates a 1 ou 2% que ocorrem na população geral. A figura 10 descreve um paciente com alteração dentária. Essas alterações frequentemente provocam dor e desconforto (Ramaglia *et al*,2006).



Figura 10: Alteração dentária em pacientes com PAF (Fonte: Ramaglia *et al*, 2006).

1.3.2.3- HIPERTROFIA DO EPITÉLIO PIGMENTADO DA RETINA (HCEPR)

HCEPR são lesões discretas, planas e pigmentadas que ocorrem na retina. As manchas podem ter 1 ou 2 discos de diâmetro com uma área circunjascente de despigmentação. São muitas vezes denominadas de escaras pigmentadas (Solomon&Randal, 2007).

A HCPER não é uma manifestação relacionada exclusivamente da PAF. Sua prevalência na população geral varia de 0,3% a 40%. Nesse grupo de pacientes as lesões são geralmente únicas. Lesões bilaterais são raras e podem

estar associadas a polipose adenomatosa familiar PAF. Pacientes portadores de PAF podem apresentar lesões múltiplas e bilaterais, com incidência descrita de 66% a 92% (Cotti *et al*, 2010).

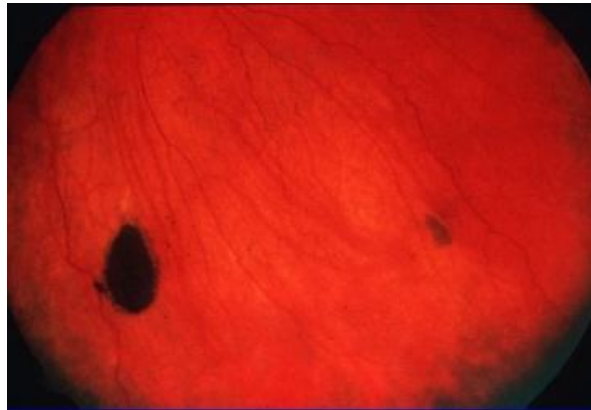


Figura 11: Aspecto típico de hipertrofia do EPR em pacientes com PAF (Half *et al*, 2009).

Essas lesões pigmentares da retina constituem um importante marcador para identificar pacientes com risco de pertencer a uma família de PAF. O tratamento oftalmológico restringe-se a observação, pois a visão não é afetada e a transformação maligna das lesões é rara (Holmes *et al*, 2005).

1.3.2.4 -TUMORES DESMÓIDES

Tumores desmóides (TD) são proliferações fibromatosas em uma matriz de colágeno, representam uma das manifestações extraintestinais mais importantes

na PAF. Podem aparecer associadas a síndrome de Gardner e a outras síndromes colorretais (Azzopardi *et al*, 2011).

Os TD são neoplasias raramente descritas, representando 0,03 a 0,13% dos tumores de partes moles e a incidência é estimada em 2,4 a 4,3 casos novos por 100.000 habitantes por ano. Podem surgir em ambos os sexos e qualquer faixa etária, sendo, contudo, mais frequentemente descritos nas mulheres em idade reprodutiva e, principalmente, durante a gravidez ou período puerperal (Priolli *et al*, 2005).

O risco de aparecimento desses tumores aumenta após procedimentos cirúrgicos, com média de tempo entre cirurgia e TD de 2 anos. TD pequenos são geralmente assintomáticos. À medida que crescem, podem determinar sintomas relacionados a complicações, como compressão uteral, obstrução intestinal, infiltração de outros órgãos, fistulas e oclusão vascular. Risco de morte associado aos TD foi estimado em aproximadamente 21% no registro italiano de poliposes (Nieuwenhuis & Vasen, 2006).

TD são importante causa de morte em pacientes com PAF e a chance de desenvolvê-lo é de 1000 vezes maior em comparação a população geral (Imperiale & Campos, 2010).

Em pacientes portadores de PAF a maioria dos TD são abdominais. Geralmente se localizam no mesentério, no intestino delgado e nas áreas

cicatriciais da parede abdominal. Menos que 10% se localizam fora do abdômen (Plasilova *et al*, 2011).

Aproximadamente 5 a 10% dos TD tem resolução espontânea, 30% tem ciclos de progressão e resolução e 50% permanecem estáveis após o diagnóstico. No entanto 10% tem crescimento acelerado, formando massas de grande volume que se infiltram em estruturas adjacentes (Maandag *et al*, 2011).

O tratamento é indicado quando TD causam sintomas, invasão de estruturas adjacentes ou por razões estéticas. Estudos relatam uma discussão entre o procedimento cirúrgico para tratamento de PAF (Groen *et al*, 2008).

1.3.2.5- PÓLIPOS DO ESTÔMAGO, DO DUODENO E DO INTESTINO DELGADO

Com exceção da mucosa do esôfago, aparentemente toda a mucosa do trato digestivo alto parece apresentar risco de desenvolvimento de pólipos em portadores de PAF (Fearon e Guido, 2012).

Portadores de PAF podem desenvolver dois tipos de pólipos gástricos: pólipos de glândulas fúndicas e adenomas gástricos. Pólipos de glândulas fúndicas são provavelmente as lesões mais comuns na população geral e são frequentes na PAF (White *et al*, 2012).

Após cólon e reto, o duodeno parece ser o local mais comum para desenvolvimento de pólipos intestinais. Diferentemente dos pólipos colorretais, cujo potencial de malignação é de praticamente 100%, os duodenais nem sempre apresentam degeneração maligna (White *et al*, 2012).

Embora a ocorrência de câncer duodenal seja um evento raro na população geral, com incidência estimada em 0.01% a 0,04%, o risco de adenocarcinoma duodenal em pacientes com PAF é de 100 a 330 vezes mais alto quando comparado com a população geral (Cotti *et al*, 2010).

Embora os pólipos duodenais possam ocorrer em qualquer região, são mais encontrados na região periampular e a segunda e terceira porções duodenais. Lamlum *et al* 2000, descreveram a relação direta entre a localização dos pólipos duodenais com efeito de carcinogênese dos sais biliares sobre a mucosa duodenal.

Quadro 1: Classificação de Spigelman para adenomas duodenais em pacientes com PAF			
Critério	Pontos = 1	Pontos = 2	Pontos = 3
Números de Pólipos	1-4	5-20	>20
Tamanho dos Pólipos	1-4	5-10	>10
Histologia	Tubular	Túbulo-viloso	Viloso
Displasia	Leve	Moderado	Grave

A principal classificação dos pólipos duodenais foi descrita por Spigelman *et al*, 1989. Nela existem 4 critérios (número e tamanho dos pólipos, histologia e grau de displasia) que são pontuados, conforme descrição no quadro 1. De acordo com a pontuação serão classificados em estágio 0, I, II, III ou IV. A classificação de Spigelman é utilizada para definir o intervalo entre a realização de endoscopias digestivas alta.

Quadro 2: Recomendação da realização de endoscopia digestiva alta (EDA) com base na classificação de Spigelman		
Classificação de Spigelman	Pontuação	Recomendações
Estádios 0 e I	1-4	EDA a cada 5 anos
Estádios II	1-4	EDA a cada 3 anos
Estádios III	Tubular	EDA anual
Estádios IV	Leve	Considerara cirurgia

O estágio 0 significa ausência das lesões duodenais; o I ocorrência de polipose duodenal leve; os III e IV, ocorrência de doença avançada. Essa classificação permite que a polipose duodenal seja comparada ao longo do tempo para um mesmo pacientes. A classificação de Spigelman também tem relação direta com riscos de degeneração maligna duodenal; o risco de câncer de duodeno é de 2,3%, 2,4% e 36% para estágio II, III e IV, respectivamente (Valanzano *et al*, 2007) .

Podem ocorrer o desenvolvimento de pólipos no jejuno e íleo. Um trabalho publicado com realização de cápsula endoscópica em 15 pacientes com PAF pós-protocolectomias e com idade média superior a 40 anos, revelou pólipos de jejuno e de íleo em 60% deles (Azzopardi *et al*, 2008) .

A incidência de pólipos jejunais e ileais em portadores de PAF é de 40 a 50%. Um trabalho publicado com realização de cápsula endoscópica em 15 pacientes com PAF, revelou pólipos de jejuno e íleo em 60% deles. Os pólipos jejunoileais na PAF em geral são pequenos, os com maior significância clínica são os que ocorrem em bolsas ileiais (Cotti *et al*, 2010; Monzile *et al* 2004).

1.3.3- GENÉTICA DA PAF

A PAF é uma doença hereditária autossômica dominante, que se caracteriza pela presença de mais de 100 pólipos adenomatosos no intestino grosso, podendo esse número chegar a milhares (Rossi *et al*,2009).

O gene APC está localizado no cromossomo 5q21 (figura 12) e expressa múltiplas isoformas decorrentes de *splicing* alternativos. O gene *APC* possui 15 exons. O exon 15 é o mais extenso, perfazendo mais de $\frac{3}{4}$ da região codificadora do gene (Dundar *et al*, 2007).

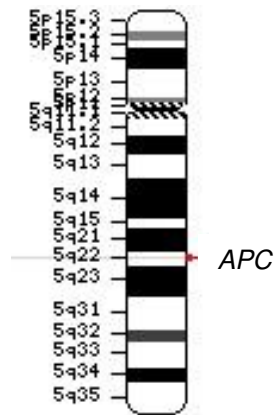


Figura 12: Representação da localização do gene *APC* (NCBI, 2012).

A estrutura peptídica codificada pelo *APC* tem locais de sequencia similares à miosina e queratina (White *et al* 2012).

Há múltiplas isoformas proteicas da APC, entre 90 a 300 Kda. Essa variação origina-se de junções (*splicing*) alternativas no RNAm, embora modificações pós-transducionais e degradação possam ter algum papel (Cheah *et al*, 2013).

Na APC mais abundantemente transcrita, o exon 10 não se encontra presente, resultando na codificação de uma proteína de 2844 aminoácidos. Essa proteína é expressa em epitélios específicos (freqüentemente pós-replicativos) e células mesenquimais de vários tecidos fetais e adultos (Bassorgun *et al*, 2012).

Várias funções já foram atribuídas à proteína APC. Ela exerce papel importante na regulação da proliferação celular, dada sua habilidade de inibir a progressão das células, da fase G1 para a fase S (Fearon ER, 2011).

Estudos demonstram que a proteína APC interage com uma série de outras proteínas, dentre elas a β -catenina. As cateninas (α , β e γ) são uma família de proteínas citoplasmáticas com função de adesão intracelular. Normalmente a proteína APC se liga a β -catenina por um sítio codificado no exon 15 e permite a ligação da enzima *glicogênio sintase quinase 3* (GSK3 β) promovendo assim a degradação da β -catenina (Fearon & Guido, 2012).

A β -catenina é uma proteína situada no citoplasma e codificada pelo gene *CTNNB1*, localizado no cromossomo 3p21. Seu produto é uma proteína multifuncional que consiste em uma porção N-terminal, uma central e uma C-terminal. A região central contém sequências repetidas necessárias para a interação com várias proteínas, incluindo a APC e TCF. Os fatores de transcrição TCF é responsável pela ativação de genes, cujos produtos produzem a proliferação celular (Stamos & Weis, 2012)

As moléculas de adesão celular são glicoproteínas transmembrânicas, que unem as células por meio de interações homofilícas proteína-proteína através de uma grande cadeia polipeptídica extracelular (Melo *et al*, 2010). A β -catenina é uma proteína que faz parte de um complexo de adesão intracelular e em altas concentrações, ativa o programa de proliferação celular, pois se liga a fatores de crescimento tumoral (White *et al*, 2012).

A proteína APC modula a cascata da via oncogênica *Wnt* e seus efeitos nos níveis celulares de β -catenina. A via *Wnt*/ β -catenina é associada com a regulação de diversos eventos do desenvolvimento e também com a homeostasia de células que podem levar ao câncer, uma vez que regula os níveis intracelulares de β -catenina (Fearon ER, 2011).

Na ativação do *APC* e inativação da via *Wnt*, a β -catenina é degradada, pois sofre fosforilação pela GSK3 β num complexo que contém APC, membros da família Axina e β -catenina (figura 13). Quando o *APC* está mutado, a ativação da via *Wnt* promove a inativação da GSK3 β , com isso, a degradação da β -catenina é interrompida e sua concentração no citoplasma e no núcleo se eleva (Fearhead *et al* 2001; White *et al* 2012).

Assim, a β -catenina se associa a membros da família TCF resultando na expressão de genes alvo para proliferação celular e formação do adenoma intestinal (Stamos JL & Weis WI, 2012)

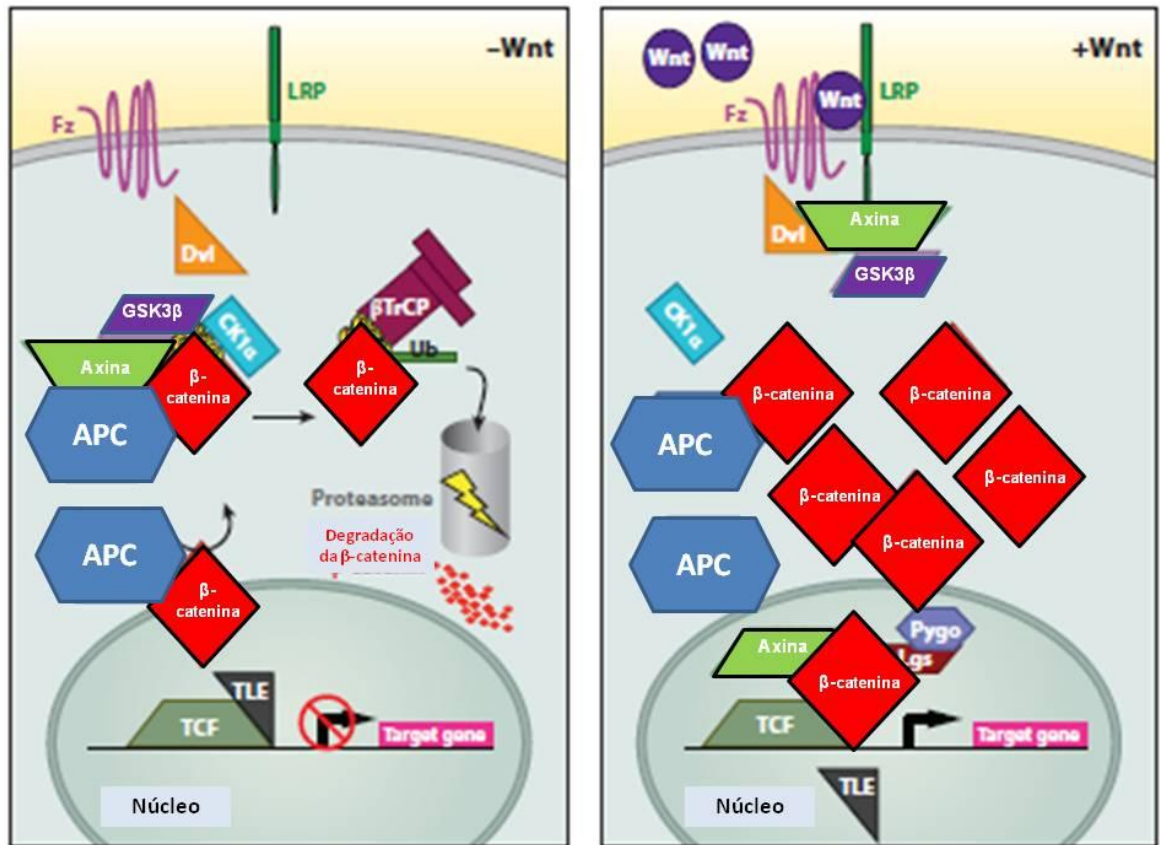


Figura 13: Papel do gene *APC* na via *Wnt*/beta-catenina. (A) Na ativação da ação do *APC* e inativação da via *Wnt*, a β -catenina está localizada nas junções aderentes. A *GSK3 β* fosforila a β -catenina num complexo formado pelo *APC*, betacatenina e membros da família Axin. (B) Quando o *APC* está mutado, a β -catenina se acumula no citoplasma e no núcleo devido a inativação da *GSK3 β* pela ativação da via *Wnt* (modificada Fearon, 2010).

1.3.4 - VARIANTES FENOTÍPICAS DA PAF

Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA) é uma síndrome autossômica dominante, relacionada a mutações no gene *APC*, porém com características distintas da PAF (Knudsen *et al*, 2002).

A PAFA é caracterizada pela presença de menos de 100 pólipos no cólon, em indivíduos com idade tardia quando comparados com portadores de PAF (Contessini-Avesane *et al*, 2004).

Pacientes com PAFA são frequentemente encontrados em famílias que possuem indivíduos com PAF clássica e a forma atenuada associa-se com uma mutação variante no gene *APC* (Patel *et al*, 2012).

São descritas lesões neoplásicas sincrônicas nesses pacientes e sabe-se que o reto é poupado da presença de pólipos em grande parte dos pacientes. Por ser incomum, a incidência e frequência da PAFA não são conhecidas, embora estime que cerca de 10% dos pacientes apresentem o fenótipo atenuado da síndrome (Azzopardi *et al*, 2008).

1.3.5- CORRELAÇÕES GENÓTIPO- FENÓTIPO

A determinação e a caracterização da mutação no gene *APC* responsável pela PAF é fundamental por causa do estabelecimento da correlação genótipo-fenótico. Diversos trabalhos mostram essa correlação entre a localização das mutações no *APC* e as manifestações clínicas colônicas e extracolônicas da PAF (Fernandes et al, 2006; Xiao *et al* 2012; White *et al* 2012; Filipe *et al* 2009) .

Foram identificadas aproximadamente 832 mutações no gene *APC*, entre mutações germinativas e somáticas. As mutações germinativas do gene *APC* são as responsáveis pela ocorrência de PAF, e as mutações somáticas são as que levam à transformação maligna dos adenomas. Quase todas levam à formação de uma proteína APC truncada, ou seja, com perda de função, e ocorrem tanto por mutação *nonsense* (30%) como por mutação *frameshift* (68%). A maioria ocorre na primeira metade da região codificadora do gene (Heinen C, 2009).

Mesmo com os atuais conhecimentos sobre o gene *APC*, entre os 30% e 50% dos pacientes com PAF não ocorrem a identificação da mutação no gene *APC*. Diferentes tipos de mutações podem ocasionar diferentes manifestações fenotípicas, incluindo agressividade da doença ou frequência de lesões extracolônicas (Leite *et al*, 2009).

Estudos relatam a correlação genótipo-fenótipo na PAF. Do ponto de vista clínico, ela pode ser classificada, de acordo com o número de pólipos no cólon, como profusa, esparsa ou atenuada (Fearnhead *et al*, 2001).

A PAF **profusa** é caracterizada pelo aparecimento de mais de 5.000 pólipos adenomatosos no intestino grosso, que se manifestam em idade precoce, geralmente na adolescência. Esse quadro clínico indica maior agressividade da doença. A maior frequência de mutações em pacientes com PAF profusa ocorre no exon 15, entre os códons 1250 e 1464 (Half *et al*, 2009).

Na PAF **esparsa**, ou clássica, observa-se centenas até milhares de pólipos no intestino grosso, que se manifestam entre 20 a 30 anos de idade. Sem tratamento, esses pacientes apresentaram CCR em torno dos 40 anos de idade. Manifestações extracolônicas são comuns. A maioria das mutações germinativas localiza-se entre os códons 157 (exon 4) e o códon 1595 (White *et al* 2001; Filipe *et al* 2009,).

Na forma **Atenuada**, a maioria das mutações ocorre em regiões proximais ao códon 168, mas também são descritas mutações nos exons 4, 5 e 9, e no exon 15. A mutação no exon 9 tem fenótipo menos severo, acometendo preferencialmente o cólon direito (Knudsen *et al* 2002).

Outros estudos associam a presença de HCEPR com a mutação entre os códons 163-1387 e a ausência de HCEPR com mutações entre os códons 1444-1578. Mutações entre os códons 463-1580 são associadas com maior incidência de tumores desmóides (Zeichner *et al*, 2012).

1.3.6- DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO DA PAF

O diagnóstico da PAF é baseado nos achados clínicos e endoscópicos. Os pólipos podem ser encontrados durante exames de rastreio ou associados a algum sintoma específico(Dias *et al*, 2007).

Pacientes com pólipos gastro-duodenais ou histórico familiar de polipose, e/ou neoplasia colorretal devem ser investigados a presença de pólipos (Fernandes *et al*, 2006). Os pólipos podem ser diagnosticados após a detecção de perda de sangue oculto em indivíduos assintomáticos submetidos à triagem para o câncer de cólon. Vários exames estão disponíveis para detectar a presença de pólipos:

- A. **Retossigmoidoscopia:** A retossingmoscopia é um exame que pode ser realizado ambulatorialmente, costuma ser indolor, não necessita de sedação e exige apenas a limpeza do canal retal. Permite estudo das características da mucosa do reto e sigmóide, como coloração, presença de edema e de lesões, assim como a colheita de secreções (sangue ou muco), além de biópsias de lesões suspeitas(Segnan *et al*, 2005).

- B. **Colonoscopia:** A colonoscopia permite a visualização de todo o intestino grosso e do íleo terminal inclusive. O exame colonoscópico requer a preparação mecânica do intestino e sedação do paciente, possibilita o diagnóstico e o tratamento das lesões. A colonoscopia é considerada o

método padrão para o diagnóstico precoce e prevenção do CCR (Dias *et al*, 2007).

C. **Enema Opaco:** É um teste no qual uma solução de bário é inserida como enema no cólon. Permite que o mesmo seja delineado á radiografia. Se os pólipos estiverem presentes, eles poderão ser vistos no raio-X (Fernandes *et al*, 2006)



Figura14::Enema opaco evidenciando adenocarcinoma do reto (Fonte: Silva *et al*, 2007)

Devido à associação dos pólipos adenomatosos com o desenvolvimento de adenocarcinoma, a Associação Americana de Gastroenterologia recomenda a sigmoidoscopia anual, iniciando aos 10-12 anos para pacientes com diagnóstico

genético de polipose e para membros de família de de portadores de PAF (Silva *et al*, 2007).

A colectomia é o tratamento recomendado para reduzir o risco de câncer colorretal em pacientes com PAF. As opções cirúrgicas incluem colectomia total com ileorretoanastomose, proctocolectomia total com ileostomia terminal ou com bolsa ileal em J. Nos pacientes não operados, o seguimento é preferível através de colonoscopia, o controle deve ocorrer em períodos anuais (Valenzano *et al*, 2007).

II-OBJETIVO



Detectar as mutações que acometem as famílias com Polipose Adenomatosa Familiar.

III-CAPÍTULO 1



APC germline mutations in families with familial adenomatous polyposis

LILLIAN BARBOSA DE QUEIROZ ROSSANESE^{1*},
 FERNANDO AUGUSTO DE LIMA MARSON^{1,2*}, JOSÉ DIRCEU RIBEIRO²,
 CLAUDIO SADDY RODRIGUES COY³ and CARMEN SILVIA BERTUZZO¹

Departments of ¹Medical Genetics, ²Pediatrics and ³Surgery, Medical Science Faculty,
 University of Campinas, Cidade Universitária, Campinas, SP 13081-970, Brazil

DOI: 10.3892/or_XXXXXXX

Abstract. Adenomatous polyposis coli (*APC*) germline mutations are responsible for the occurrence of familial adenomatous polyposis (FAP). Somatic mutations lead to malignant transformation of adenomas. In this context, considering the significance of *APC* germline mutations in FAP, we aimed to identify *APC* germline mutations. In the present study, 20 FAP patients were enrolled. The determination of *APC* germline mutations was performed using sequencing, and the mutations were compared with clinical markers (gender, age at diagnosis, smoking habits, TNM stage, Astler-Coller stage, degree of differentiation of adenocarcinoma). The data were compared using the SPSS program, with the Fisher's exact test and χ^2 test, considering $\alpha=0.05$. According to the main results in our sample, 16 alleles with deleterious mutations (80% of the patients) were identified while 7 (35%) patients had no deleterious mutations. There was a predominance of nonsense (45% of the patients) and frameshift (20% of the patients) mutations. There was no statistical significance between the *APC* germline mutations identified and the clinical variables considered in our study. Only TNM stage was associated with the presence of deleterious mutations. Patients with deleterious mutations had an OR, 0.086 (IC=0.001-0.984); TNM stage I + II in comparison with III + IV, when compared with the patients with no deleterious mutations identified. In this context, as a conclusion, we demonstrated the molecular heterogeneity of *APC* germline mutations in FAP and the difficulty to perform

molecular diagnostics in a Brazilian population, considering the admixed population analyzed.

Introduction

Colorectal cancer is common in Brazil. In the year 2012, 14,180 new cases of colon and rectum cancer were expected to occur in men and 15,960 in women. These values correspond to an estimated risk of 15 new cases per 100,000 men and 16 cases per 100,000 women (1).

Excluding non-melanoma skin tumors, colon and rectum cancer is the second most common cancer among men in Southeast Brazil (22/100,000) and third in South (18/100,000) and Midwest (14/100,000) Brazil (1). In North Brazil (4/100,000) this cancer ranks fourth; in Northeast Brazil (5/100,000), fifth. Among women, it is the second most common cancer in Southeast (23/100,000) and South Brazil (20/100,000), the third in Midwest (15/100,000) and Northeast Brazil (7/100,000), and sixth in the North (5/100,000) (1).

Familial adenomatous polyposis (FAP) is one of the most clearly defined and well understood inherited colorectal cancer syndrome. It is an autosomal dominant disorder that typically presents in the form of colorectal cancer in young adults secondary to extensive adenomatous polyposis present in the colon (2).

The adenomatous polyposis coli (*APC*) gene is on chromosome 5q21 and displays alternative splicing in multiple coding and noncoding regions of the DNA sequence, and the primary transcript has 15 exons. The *APC* gene has 8,532 base pairs corresponding to 2,844 amino acids, resulting in a 311.8-kDa protein. Exon 15 has the largest extension, making up more than three quarters of the coding region (3).

Approximately 737 *APC* gene mutations, including 332 germline and 402 somatic have been identified. *APC* germline mutations are responsible for the occurrence of FAP, and somatic mutations have been associated with malignant transformation of adenomas (4). Almost all mutations lead to truncation of the APC protein either by nonsense (30%) or by frameshift mutations (68%). The majority of mutations occur within the first half of the coding sequence. In an American study, in which 1,591 patients were studied, of the 431 pathogenic or likely pathogenic mutations, frameshift, nonsense,

Correspondence to: Dr Fernando Augusto de Lima Marson, Department of Medical Genetics, Medical Science Faculty, University of Campinas, Cidade Universitária, Tessália Vieira de Carmargo 126, Campinas, SP 13081-970, Brazil
 E-mail: fernandolimamarson@hotmail.com

*Contributed equally

Key words: germline mutations, familial adenomatous polyposis, tumor lymph node metastasis, Astler-Coller, cancer

1 splice sites and large deletion or duplication mutations represented 43, 42, 9 and 6% of cases, respectively (5).

3 *APC* germline mutations are predominate at the 5' end of the gene, while somatic mutations mainly occur in the region called the mutation cluster region (MCR) between codons 6 1,284 and 1,580 of the *APC* gene. In germline mutations, two hot spot codons have been identified; one at position 1,061 and the second at position 1,309. In somatic mutations, two hot spots seem to occur at position 1,309 and 1,450 (3).

10 Several studies have attempted to correlate specific *APC* mutations with clinical phenotypes. Mutations between codons 169 to 1,578 have been generally associated with the classic form of FAP. Mutations between codons 1,445 and 14 1,578 have been associated with desmoid tumors, whereas mutations between codons 279 to 1,309 have been correlated with the development of duodenal polyposis (6).

17 Based on the findings in the literature, the objective of the present study was to detect *APC* germline mutations that affect families followed up at the Oncology Clinic of the University of Campinas (Unicamp) and to compare the identified mutations with clinical variables.

23 Materials and methods

25 We recruited 20 nonrelative patients at the Oncology Service in the 'Gastrocentro' of the Faculty of Medical Sciences of Unicamp. The present study included families that had two or more successive generations affected by FAP (>100 polyps); no polyposis colorectal cancer was present. The project was approved by the university ethics committee (#874/2008). All patients and/or their guardians signed an informed consent form.

34 *Clinical variables.* The clinical variables analyzed in our samples included gender (male/female), age at diagnosis (≤41 or >41 years), smoking habits (passive smoking, smoker, non-smoker), TNM stage (I + II vs. III + IV), Astler-Coller stage (B1 + B2 vs. C1 + C2), degree of differentiation of adenocarcinoma (moderately differentiated, poorly differentiated, well-differentiated).

41 All of the variables were evaluated by medical specialists including special considerations to TNM stage (tumor, lymph node, metastasis), Astler-Coller stage and degree of differentiation of the adenocarcinoma and were evaluated taking into account previously literature (6-10).

47 *DNA extraction.* Genomic DNA was obtained by direct extraction from lymphocytes of peripheral blood according to standard procedures (11). DNA samples were quantified using the NanoVue® v1.7.2 spectrophotometer (GE Healthcare, Chicago, IL, USA). For all analyses performed, 50 ng/μl was used to improve the polymerase chain reaction (PCR) technique.

54 *DNA sequencing and analysis.* To identify *APC* mutations, DNA fragments containing the entire coding region and intron-exon boundaries of the *APC* gene were amplified, using PCR conditions as published by Miyoshi *et al* (12), Nagase *et al* (13) and Gómez-Fernández *et al* (14), with primers as listed in Table I. The precise gradients for tempera-

Table I. Description of the oligonucleotides used for the analysis of the *APC* gene.

Nucleotide nomenclature	Sequences
APC_EX1_F	5'-AACCTTATAggTCCAAgggTAg-3'
APC_EX1_R	5'-ACCTCAAgtTTTACAAGgggAA-3'
APC_EX2_F	5'-AAATACAgtAATCATgtTCTTgAAgT-3'
APC_EX2_R	5'-ACACCTAAAgATgACAATTTgAg-3'
APC_EX3_F	5'-gACCCAAGTggACTTTTCAgg-3'
APC_EX3_R	5'-ACAATAAACTggAgTACACAAGg-3'
APC_EX4_F	5'-gAgAAgTTTgCAATAACAAGTg-3'
APC_EX4_R	5'-TTATCCTgAATTTTAATggATTACCT-3'
APC_EX5_F	5'-AACCTCACTCTAACTggACCAA-3'
APC_EX5_R	5'-AACAgAgCTgTAATTCATTTTATTC-3'
APC_EX6_F	5'-ggTAGCCATAgTATgATTATTTCT-3'
APC_EX6_R	5'-CTACCTATTTTTTATACCCACAAAAC-3'
APC_EX7_F	5'-AAgAAAgCCTACACCATTTTTgC-3'
APC_EX7_R	5'-gATCATTCTTAgAACCATCTTgC-3'
APC_EX8_F	5'-gACACTTCATTTggAgTACCTTAACA-3'
APC_EX8_R	5'-ggCATTAgTgACCAgggTTT-3'
APC_EX9_F	5'-AgTCgTAATTTTgTTTCTAAACTC-3'
APC_EX9_R	5'-TTTgAAACATgCACTACgAT-3'
APC_EX10_F	5'-TTgCTCTTCAAATAACAAAAGCAT-3'
APC_EX10_R	5'-TCCACCAgTAATgTCTATgTCA-3'
APC_EX11_F	5'-gATgATTgTCTTTTTCTCTTgC-3'
APC_EX11_R	5'-CTgAgCTATCTTAAgAAATACATg-3'
APC_EX12_F	5'-TgACAAAaggAAgAACAgATAgCA-3'
APC_EX12_R	5'-gCAgTgAgCTgAgATTgCAC-3'
APC_EX13_F	5'-TTTCTATTTCTTACTgCTAgCAIT-3'
APC_EX13_R	5'-ATACACAggTAAGAAATTAaggA-3'
APC_EX14_F	5'-AggggACgggCAATAggATAg-3'
APC_EX14_R	5'-ggTCTTTTTgAgAgTATgAATTCTg-3'
APC_EX15A_F	5'-TTgTTACTgCATACACATTg-3'
APC_EX15A_R	5'-CAAATATggTgAAAaggACA-3'
APC_EX15B_F	5'-CCCTAgAAgCAGAAATTA-3'
APC_EX15B_R	5'-TTCTTCTAAgTgCATTTTC-3'
APC_EX15C_F	5'-CATggAAgAAgTgTCAgC-3'
APC_EX15C_R	5'-TTCTATTATgTgTTTgggTC-3'
APC_EX15D_F	5'-CACAgAATgAAAATgTggg-3'
APC_EX15D_R	5'-gAAggTgTggACgTATTC-3'
APC_EX15E_F	5'-gAAACgTCATgTggATCAgC-3'
APC_EX15E_R	5'-TggCAATCgAACgACTCTC-3'
APC_EX15F_F	5'-CCTAgAACCAAATCCAgCAgAC-3'
APC_EX15F_R	5'-gTTggCATggCAGAAATAATAC-3'
APC_EX15G_F	5'-AgATgCTTgCTggACCTg-3'
APC_EX15G_R	5'-TTgCCACggAAAATgTACTC-3'
APC_EX15H_F	5'-TCTTgCAGAAATgCATTAAAT-3'

APC, adenomatous polyposis coli.

ture and buffers providing the optimal temperature for each fragment were determined experimentally. The PCR products

Table II. The familial adenomatous polyposis patients relating to gender, race, age at diagnosis, staging (TNM and Astler-Coller), smoking habit, degree of differentiation of adenocarcinoma and APC gene genotype.

Patient	Gender	Race	Age at diagnosis (years)	Staging		Smoking habit	Degree of differentiation in adenocarcinoma	Genotype	Mutation deleterious/not deleterious	Extra-colonic manifestations
				TNM	Astler-Coller					
1	F	C	37	IV	C1	NS	MD	Glu1309X	D	Delgado intestine and duodenal polyps
2	F	C	47	III	B2	S	MD	Ser 932 X	D	Duodenal polyps
3	F	NC	31	IV	C2	NS	MD	Tyr935X	D	Gastric polyps
4	F	C	40	II	C2	S	MD	Arg657Arg ^a /c.3927_3931 delAAAAGA	ND/D	Delgado intestine polyps
5	F	C	45	IV	B2	S	MD	-	-	-
6	M	C	41	II	B1	S	MD	Ile606Ile ^a	ND	-
7	M	C	36	I	C2	NS	PD	Gln1291X	D	Delgado intestine and duodenal polyps
8	F	C	29	III	C2	NS	MD	Gly2502Ser	D	Gastric polyps
9	M	C	47	II	C2	S	MD	Glu1317Gln	D	Osteoma jaw
10	F	C	41	III	B2	NS	MD	Leu629X	D	Duodenal polyps
11	F	C	52	II	B2	NS	PD	Asn1037Asn ^a /Tyr935X	ND/D	-
12	F	NC	40	I	C2	NS	WD	Thr934Thr ^a	ND	-
13	F	C	44	III	C1	NS	MD	c.3183_3186delACAA	D	Delgado intestine polyps
14	M	C	36	IV	B2	NS	MD	c.3183_3187delACAAA	D	Delgado intestine polyps
15	F	C	55	IV	C2	S	MD	Arg 876X	D	-
16	M	C	49	II	B1	PS	MD	Lys939Lys ^a /Tyr951Tyr ^a	ND/ND	Gastric polyps
17	F	C	50	II	NR	NS	WD	Glu892X	D	-
18	F	C	41	III	C2	NS	PD	Gly974Gly ^a / c.3927_3931delAAAAGA	ND/D	-
19	F	C	47	III	C2	NS	MD	Lys1454Glu	D	-
20	M	C	49	IV	C2	PS	MD	Leu1564X	D	Duodenal polyps

^aNeutral mutation. APC, adenomatous polyposis coli; F, female; M, male; C, Caucasian, NC, not Caucasian; NS, non-smoker; PS, possible smoker; S, smoker; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated; WD, well-differentiated; D, deleterious mutations; ND, no deleterious mutations.

61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120

Table III. Association of clinical variables of colorectal cancer according to TNM stage.

Variable	TNM stage		Total	P-value	OR	CI (5-95%)
	I and II n (%)	III and IV n (%)				
Gender						
Female	4 (28.6)	10 (71.4)	14	0.274	0.219	0.014-2.242
Male	4 (66.7)	2 (33.3)	6		1	-
Race						
Caucasian	7 (38.9)	11 (61.1)	18	1	0.615	0.007-57.02
Not Caucasian	1 (50)	1 (50)	2		1	-
Presence of deleterious allele						
Presence	5 (31.3)	11 (68.8)	16	0.048	0.086	0.001-0.984
Absence	6 (85.7)	1 (14.3)	7		1	-
Degree of differentiation of adenocarcinoma						
WD	2 (100)	-	2	-	-	-
MD	4 (26.7)	11 (73.3)	15	0.116	0.205	0.001-1.457
PD	2 (66.7)	1 (33.3)	3	0.688	3.424	0.149-235.6
Age at diagnosis (years)						
≤41	4 (40)	6 (60)	10	1	1	0.119-8.417
>41	4 (40)	6 (60)	10		1	-
Astler-Coller stage						
B1 and B2	3 (42.9)	4 (57.1)	7	1	1.468	0.142-14.66
C1 and C2	4 (33.3)	8 (66.7)	12		1	-
Smoking habit						
NS	4 (33.3)	8 (66.7)	12	0.777	0.518	0.056-4.451
S and PS	4 (50)	4 (50)	8		1	-

TNM system: T, describes how far the main (primary) tumor has grown into the wall of the intestine and whether it has grown into nearby areas; N, describes the extent of spread to nearby (regional) lymph nodes; M, indicates whether the cancer has spread (metastasized) to other organs of the body. Astler-Coller classification: A, tumor limited to the mucosa, carcinoma *in situ*; B1, tumor grows through muscularis mucosa but not through muscularis propria; B2, tumor grows beyond muscularis propria; C1, stage B1 with regional lymph node metastases; C2, stage B2 with regional lymph node metastases; D, distant metastases. Statistical analysis conducted by Fisher's exact test and χ^2 test. In bold print, P-values <0.05. OR, odds ratio; CI, confidence interval; NS, non-smoker; PS, possible smoker; S, smoker; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated; WD, well-differentiated.

indicating heterozygosity were sequenced using the Applied Biosystems (ABI) Prism BigDye Terminator v3.1 cycle sequencing kit and ABI 3500XL DNA sequencer (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), using identical conditions as previously published (12-14). The DNA sequence was analyzed using GeneMapper software (Applied Biosystems) or Fragment Profiler (GE Healthcare Biosciences, Piscataway, NJ, USA).

Statistical analysis. Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) v.17.0 from SPSS, Inc., Chicago, IL, USA (<http://www.spss.com>) by Fisher's exact test and χ^2 test, considering $\alpha=0.05$. To improve the data presentation, the odds ratio was calculated to variables to demonstrate the association between the clinical variables, TNM and APC germline mutation identified.

Results

In the descriptive analysis, the average age at diagnosis of the patients was 42.85 years (± 6.892), and the age range was from 29 to 55 years. Of the 20 patients, 18 (90%) were Caucasian and 2 (10%) were not Caucasian; 14 (70%) were females and 6 (30%) were males. The clinical data are summarized in Table II. The frequency of cases for each stage according to the TNM system was 2 (10%), 6 (30%), 6 (30%) and 6 (30%), respectively, for stage I, II, III and IV. The frequency of cases for each stage according to the Astler-Coller system was 2 (10.5%), 5 (26.4%), 2 (10.5%) and 10 (52.6%), respectively, for stages B1, B2, C1 and C2. A smoking habit was observed in 8 patients, 2 (10%) were occasional smokers and 6 (30%) were smokers; the remaining patients (60%) were non-smokers. Two patients (10%) had well-differentiated adenocarcinoma,

Table IV. Association of colorectal cancer clinical variables according to Astler-Coller stage.

Variable	Astler-Coller		Total	P-value	OR	CI (5-95%)
	B1 and B2 (no.)	C1 and C2 (no.)				
Gender						
Female	4	9	13	0.617	0.465	0.04-5.09
Male	3	3	6		1	-
Race						
Caucasian	7	10	17	0.509	-	-
Not Caucasian	0	2	2		-	-
Presence of deleterious allele						
Presence	5	10	15	0.376	0.393	0.04-3.36
Absence	4	3	7		1	-
Degree of differentiation of adenocarcinoma						
WD	0	1	1	-	-	-
MD	6	9	15	0.607	1.933	0.12-122.2
PD	1	2	3	0.841	0.841	0.01-19.64
Age at diagnosis (years)						
≤41	3	7	10	0.650	0.554	0.05-5.03
>41	4	5	9		1	-
TNM stage						
I and II	3	4	7	1	0.554	0.05-5.03
III and IV	4	8	12		1	-
Smoking habit						
NS	3	8	11	0.377	0.396	0.04-3.67
S and PS	4	4	8		1	-

Astler-Coller classification: A, tumor limited to mucosa, carcinoma *in situ*; B1, tumor grows through muscularis mucosa but not through muscularis propria; B2, tumor grows beyond muscularis propria; C1, stage B1 with regional lymph node metastases; C2, stage B2 with regional lymph node metastases; D, distant metastases. TNM system: T, describes how far the main (primary) tumor has grown into the wall of the intestine and whether it has grown into nearby areas; N, describes the extent of spread to nearby (regional) lymph nodes; M, indicates whether the cancer has spread (metastasized) to other organs of the body. Statistical analysis conducted by Fisher's exact test and χ^2 test. In bold print, P-values <0.05. OR, odds ratio; CI, confidential interval; WD, well-differentiated; MD, moderately differentiated; PD, poorly differentiated; NS, non-smoker; S, smoker; PS, possible smoker.

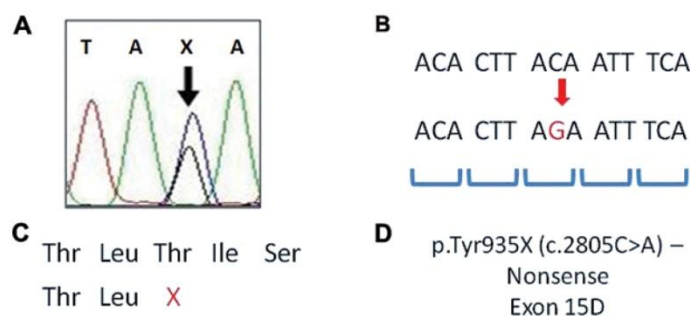


Figure 1. Representation of adenomatous polyposis coli (*APC*) mutation analysis. (A) DNA sequencing electropherogram of p.Tyr935X of *APC* gene. (B) DNA sequence with an alteration (red sequence). (C) Amino acid sequence of protein and the stop codon in the *APC* partial amino acid sequence. (D) Mutation description. Thr, threonine; Tyr, tyrosine; A, adenine, T, thymine; C, cytosine; G, guanine. Fig. 1 was adapted from previous studies (15-17).

15 (75%) had moderately differentiated and 3 (15%) had poorly differentiated adenocarcinoma.

For the determined mutant alleles, 16 (40%) were deleterious and 7 (17.5%) were not deleterious. Associations were

For the deleterious mutations detected, we found a prevalence of nonsense mutations, with 9 (45%) mutant alleles. In 4 (20%) patients small deletions were noted, while 3 (15%) patients had missense mutations, and 3 (15%) patients had only neutral polymorphisms and 1 (5%) patient had no mutations found in the exons. In 60% of patients, extra-colonic manifestations were present; the most common being gastric polyps, duodenal and in the small bowel (Table II).

In Figs. 1 and 2, the *APC* gene and all mutations identified were described in details. In the same figures, the protein structure is described, considering the principal mutation sites and their association with FAP.

Associations between the clinical variables and the identified *APC* germline mutations could not be calculated as the sample size was small and some of the mutations were not deleterious.

Discussion

The high molecular heterogeneity in the *APC* gene was consistent with other studies in FAP patients (12,18). Mutations c.3927_3931delAAAGA and pTyr935X were found in 2 patients. The c.3927_3931delAAAGA mutation occurs in exon 15 and leads to formation of a stop codon at position 1,312. It is the most frequent mutation in the *APC* gene. Its frequency varies from 0% in southwest Spain to 2.4% in the Australian population, 5% in the Dutch population, 7% in the Israeli population, and up to 16% in Italian FAP patients (19-22). The pTyr935X mutation is a nonsense alteration of exon 15 that exchanges cytosine for adenine.

In our sample, we found a predominance of nonsense mutations (45% of the patients), followed by frameshift mutations (20% of patients). Among the 6 (30%) patients with neutral mutations, missense mutations occurred in more than 1 patient. We found the missense mutation, Gly2502Ser. According to Azzopardi *et al* (18), who studied 691 patients with colorectal adenomas and 969 healthy individuals (individuals investigated for cystic fibrosis), this mutation can be found in individuals with or without adenoma, leaving a doubt as to whether this mutation is deleterious.

The mutation Glu1317Gln is described in the literature as being deleterious (23-27), although other studies considered it to be not deleterious. Azzopardi *et al* (18) found this mutation in both healthy subjects and in adenoma patients. However, we need further monitoring and analysis of these individuals with the family to gain a better understanding of this result.

For the variety of mutations, we were unable to determine a correlation between the clinical variables and the mutations detected. It is necessary to expand the sample to support such analysis. Yet, following analysis of the correlation of the presence of deleterious mutations and TNM and Astler-Coller stage, we found a positive correlation with the presence of deleterious mutations, demonstrating a more severe disease. Patients with deleterious mutations had an OR, 0.086 (IC =0.001-0.984); TNM stage I + II in comparison with III + IV, when compared with the patients with no deleterious mutations identified.

In conclusion, our study demonstrated the molecular heterogeneity of *APC* germline mutations in FAP and the difficulty

in performing molecular diagnostics in a Brazilian population, since there were no mutations noted with a higher prevalence. Thus, molecular diagnostics requires further detailed evaluation, which, however is hampered by the presence of neutral mutations, and these mutations are still debatable in many populations of the world.

Acknowledgements

We thank FAPESP for the financial support and the Laboratório de Genética Molecular (<http://www.laboratoriomultiusuario.com.br>) for the possibility of the present study.

References

- National Cancer Institute (INCA): Estimate 2012: Cancer Incidence in Brazil (2011). <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>. Accessed February 25, 2013.
- Leblanc R: Familial adenomatous polyposis and benign intracranial tumors: a new variant of Gardner's syndrome. *Can J Neuro Sci* 27: 341-346, 2000.
- Dundar M, Caglayan AO, Saatci C, *et al*: How the 11307K adenomatous polyposis coli gene variant contributes in the assessment of risk of colorectal cancer, but not stomach cancer, in a Turkish population. *Cancer Genet Cytogenet* 177: 95-97, 2007.
- The APC mutations database Mutations. http://www.umd.be/APC/4DACTION/WS_SEARCH. Accessed February 25, 2013.
- Kerr SE, Thomas CB, Thibodeau SN, *et al*: APC germline mutations in individuals being evaluated for familial adenomatous polyposis: a review of the Mayo Clinic experience with 1591 consecutive tests. *J Mol Diagn* 15: 31-43, 2013.
- Zeichner SB, Raj N, Cusnir M, *et al*: A de novo germline APC mutation (3927del5) in a patient with familial adenomatous polyposis: case report and literature review. *Clin Med Insights Oncol* 6: 315-323, 2012.
- Astler VB and Collier FA: The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 139: 846-852, 1954.
- Way LW and Doherty GM: *Cirurgia: Diagnóstico e Tratamento*. 11th edition. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004 (In Portuguese).
- Towsend CM, Beauchamp RD, Evers BM and Mattox KL (eds): *Sabiston, Tratado de Cirurgia: A Base Biológica da Prática Cirúrgica Moderna*. Elsevier, Rio de Janeiro, 2005 (In Portuguese).
- World Health Organisation: *Histological Typing of Intestinal Tumours*. In: *International Histological Classification of Tumours*, No 15, WHO, Geneva, 1976.
- Sambrook J, Fritsch EF and Maniatis T: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, *et al*: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 4452-4456, 1992.
- Nagase H and Nakamura Y: Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. *Hum Mutat* 2: 425-434, 1993.
- Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C, *et al*: Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* 10: 57, 2009.
- Goss KH and Groden J: Biology of the adenomatous polyposis coli tumor suppressor. *J Clin Oncol* 18: 1967-1979, 2000.
- Amos-Landgraf JM, Kwong LN, Kendziorski CM, *et al*: A target-selected Apc-mutant rat kindred enhances the modeling of familial human colon cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 104: 4036-4041, 2007.
- Half E, Bercovich D and Rozen P: Familial adenomatous polyposis. *Orphanet J Rare Dis* 4: 22, 2009.
- Azzopardi D, Dallosso AR, Eliason K, *et al*: Multiple rare nonsynonymous variants in the adenomatous polyposis coli gene predispose to colorectal adenomas. *Cancer Res* 68: 358-363, 2008.
- Gavert N, Yaron Y, Naiman T, *et al*: Molecular analysis of the APC gene in 71 Israeli families: 17 novel mutations. *Hum Mutat* 19: 664, 2002.

20. Ruiz-Ponte C, Vega A, Carracedo A and Barros F: Mutation analysis of the adenomatous polyposis coli (APC) gene in northwest Spanish patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and sporadic colorectal cancer. *Hum Mutat* 18: 355, 2001.
21. Schnitzler M, Koorey D, Dwight T, *et al.*: Frequency of codon 1061 and codon 1309 APC mutations in Australian familial adenomatous polyposis patients. *Hum Mutat (Suppl 1)*: S56-S57, 1998.
22. Varesco L, Gismondi V, James R, *et al.*: APC gene mutations in Italian familial polyposis coli patients. *Cancer Detect Prev* 17: 279-281, 1993.
23. Laken SJ, Petersen GM, Gruber SB, *et al.*: Familial colorectal cancer in Ashkenazim due to a hypermutable tract in APC. *Nat Genet* 17: 79-83, 1997.
24. Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, *et al.*: Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. *Hum Mol Genet* 9: 2215-2221, 2000.
25. Frayling IM, Beck Ne, Ilyas M, *et al.*: The APC variants I1307K and E1317Q are associated with colorectal tumors, but not always with a family history. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 10722-10727, 1998.
26. Gryfe R, Di Nicola N, Lal G, *et al.*: Inherited colorectal polyposis and cancer risk of the APC I1307K polymorphism. *Am J Hum Genet* 64: 378-384, 1999.
27. Hahnloser D, Petersen GM, Rabe K, *et al.*: The APC E1317Q variant in adenomatous polyps and colorectal cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12: 1023-1028, 2003.

IV-CONCLUSÃO



Neste estudo, houve um predomínio de mutações *nonsense* (45% dos pacientes) e de mutações *frameshift* (20% dos pacientes).

Não houve significância estatística entre as mutações germinativas identificadas e as variáveis clínicas consideradas em nosso estudo. Apenas a fase TNM foi associada com a presença de mutações deletérias. Os portadores com mutações deletérias tinha uma OR , 0,086 (IC = 0,001-0,984); TNM I + II em comparação com III + IV , quando comparado com os pacientes sem mutações deletérias identificados.

Neste estudo, demonstramos a heterogeneidade molecular de mutações germinativas no APC em portadores de PAF e a dificuldade para realizar diagnóstico molecular em uma população brasileira.

V-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



Alberts BD, Lewis J, Raff M, Roberts Watson JD. Câncer In: Biologia Molecular da Célula. 3ªed., Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p1255-91.

Azzopardi D, Dallosso AR, Eliason K, Hendrickson BC, Jones N, Rawstorne E et al. Multiple rare nonsynonymous variants in the adenomatous polyposis coli gene predispose to colorectal adenomas. Cancer Res 2008;(68):358-63.

Bassorgun CI, Ozbudak IH, Erdogan G, Elpekgo E and Gelen T. Familial adenomatous polyposis associated with gastrointestinal stromal tumor: Report of a case. Turk J Gastroenterol 2012; 23(3):262-266.

Blasco PG, Levites MR, Monaco C. Sigmoidoscopia aos 60 anos de idade está associada a menor incidência de câncer colorretal, mas não a menor mortalidade. Diagn Tratamento 2012; 17(1) 21-22.

Bowles CJ, Leicester R, Romaya C, Swarbrick E, Williams CB, Epstein O. A prospective study of colonoscopy practice in the UK today: are we adequately prepared for national colorectal cancer screening tomorrow? Gut 2004;(53):277-83

Cancer Incidence in Five Continents, volume IX. Edited by MP Curado. 961p. 2007.

Campos FG, Habr-Gama A, Parks DR, Sousa JR. Manifestações Extra-colônicas da polipose adenomatosa familiar: incidência e impacto na evolução da doença. Arq. Bras Gastroenterol 2003;(40):92-98.

Chammas R, Nowak EM. Mecanismo de invasão e metástases em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguar Junior S, Lopes A,

editores. Cancer de cólon, reto e ânus. São Paulo Lemar tecmedd; 2005. P55-62.

Cheah PY, Wong YH, Lou C, Chew MH and Tang CL. A novel indel in exon 9 of APC upregulates a skip , isoform and causes very severe familial adenomatous polyposis. European Journal of Human Genetics. 2013; (10):245-248.

Chiang JM, Chen HW, Tang P, Chen JS, Changehen CR, Hsieh PS et al. Mutations analyses of the APC gene in Taiwanese FAP families: low incidence of APC germline mutation in a distinct subgrupo of FAP families. Familial Cancer 2009; (9):117-124.

Contessini-Avesani E, Botti F, Negri C et al. Familial adenomatous polyposis. Surgical treatment: when and how. Tech Coloproctol 2004; (8):309-314.

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genética do câncer colorretal. Rev. Med. 2000 (79):45-64.

Dias APTP, Gollner AM e Teixeira MTB. Cncer colorretal, ratreamento, prevenção e controle. HU revista.2007; (4):125-131.

Dumitrescu RG, Cotarla I. Undestanding breast cancer risk - where do we stand in 2005?. J Cell Mol Med 2005; (9):208-221.

Dundar M, Caglayan AO, Ozkul Y: How the 11307K adenomatous polyposis coli gene variant contributes in the assessment of risk of colorectal cancer, but not stomach cancer, in a Turkish population. Cancer Genetics Cytogenetics 2007; (177):95-97.

Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. Humn Mol Genect 2001; (10):721-733.

Fearon ER and Guido TB. Developmental Signaling Networks: WNT/ β -Catenin signaling in the Gastrointestinal Tract. Psys Gastr Tract. 2012; 280-302.

Fearon ER. Molecular Genetics of Colorectal Cancer. Annu. Rev. Patho. Mech. Dis. 2011; (6):479-507.

Fernandes GO; Pereira Junior JJ; França MAV; Costa JHG. Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada. Rev Bras Coloproct, 2007;27(2): 179-184.

Filipe B, Baltazar C, Albuquerque C, Fragoso S, Lage P, Vitoriano I, Ferro SM, Claro I, Rodrigues P, Fidalgo P, Charles P, Cravo M and Leitão CN. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients whit than adenomas. Clin Gen. 2009; (76):242-255.

Franco ED, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em cancer colorretal. In:Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editors. Cancer Colon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo:2005.p3-22

Gatallica Z, Tornakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. Familial Cancer. 2008;(7):15-26.

Ghazi, S.The low-risk colorectal cancer study colorectal cancer susceptibilidade loci in a population-basead study:associations with morphological. Am J. Pathol. 2010; 177:2688-2693.

Giráldez MD, López-Dòriga A, bujanda L, Abulí A, Bessa X, Fernández-Rozadilla C, et al. Susceptibility genetic variants associated with early-onset colorectal câncer. *Carcinogenesis* 2012; (33):613–619.

Gómez-Fernández N, Castellví-Bel S, Fernández-Rozadilla C, Balaguer F, Muñoz J, Madrigal I, Milà M, Graña B, Vega A, Castells A, Carracedo A, Ruiz-Ponte C: Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* 2009; (10):57-61.

Groen EJ, Roos A, Mutingle FL, Enting RH, Vries J, Kleibeuber JH. Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Annals of Surgical Oncology* 15(9):2439-2450, 2008.

Half E, Bercovich D and Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet Jounarrl Rare Diseases* 2009 4:1750-1772

Heinen,C. Genotype to phenotype: analyzing the effects of inherited mutations in colorectal cancer families. *Mutat Res.* 2010;(2):32-45.

INCA-Instituto Nacional do Câncer- Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. – Rio de Janeiro : INCA, 2011

Imperiale AR & Campos FGCM. História, epidemiologia e importância da polipose adenomatosa familiar. In:Campos,FGCM(org.).Polipose Adenomatosa Familiar:Bases do diagnóstico, tratamento e vigilância .São Paulo:Yendis. 2010

Katou F, Motegi K, Baba S. Mandibular lesions in patients with adenomatosis coli. J Craniomaxillofac Surg 1989; 17:354-8.

Knudsen AL, Bisgaard ML and Bulow S. Attenuated familial adenomatous polyposis (APAF) A review of the literature. Fam Cancer 2002;(2) 43-55.

Lamlum H, Al Tassan N, Jaeger E, Frayling I, Sieber O, Reza FB, Eckert M, Rowan A, Barclay E, Atkin W, Williams C, Gilbert J, Cheadle J, Bell J, Houlston R, Bodmer W, Sampson J, Tomlinson I: Germline APC variants in patients with multiple colorectal adenomas, with evidence for the particular importance of E1317Q. Hum Mol Genet 2000; (9):2215-2221.

Lawes DA, SenGupta S, Boulos PB. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. Eur J Surg Oncol. 2008;(29):201-212.

Leblanc R: Familial adenomatous polyposis and benign intracranial tumors: a new variant of Gardner's syndrome. Can J Neurol Sci 2000; (27):341-346.

Leite J, Regateiro F, Sousa FC, Laranjeira F, Pires A, Giria J, Brito MJ, Medeira A, Teixeira R, Morna H, Gaspar I, Marinho C, Jorge R, Brehn A, Ramos JS and

Boavida MG. Germiline MUTHY mutations in portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. Hum Mut 2009, 753.

Maadang-Robanus E, Bosch C, Amini-Nics A, Knijnenburg J, Szuhai K, Cervera P, et al. Familial Adenomatous Polyposis – Associated Desmoids display significantly more genetic changes than sporadic desmoids. Plos one 6(9):24354-24357.

Manzione CR, Nadal SR, Nadal MA e Melo SVM. Análise morfológica e histológica de pólipos colorretais submetidos á ressecção endoscópica. Rev. bras. Coloproct 2004, 24(2):119-125

Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. Proc Natl Acad Sci U S A. 1992; 89:4452-4456.

Nagase H, Nakamura Y: Mutations of the APC (adenomatous polyposis coli) gene. Hum Mutat 1993, 2:425–434.

Newton KF, Newman W and Hill, J. Review of biomarkers in colorectal cancer. Colorectal Diase, 2012 14(1):3-17

Nieuwenhuis, MH and Vasen, HFA. Correlations between mutation site in APC and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. Cri Rev On. 2007, (61) 153-161.

Patel SG & Ahnen DJ. Familial colon cancer syndromes: an updates a rapidly evolving field. Curr Gastro Rep. 2012: 14(5) 428-438.

Pinho MSL. A estória biomolecular do pólipo adeomatosos. Rev bras. Coloproct 2005;(26):197-203.

Priolli DG, Martinez CAR, Mazzini DLS, Souza CAF, Piovesan H and Nonose R. Tumor desmóide da parede abdominal durante a gravidez: relato de caso. Ver Bras. Ginecol. Obstre. 2005; (27):283-288.

Ramagliani L, Morgese F, DiLauro AE, Saviano R. Dental and periodontal alterations in Gardner's syndrome. Dent Cosmos. 2006; (74):79-85.

Russo J, Hu YF, Yang X et al. Developmental, cellular and molecular basis of human breast cancer. J Natl Cancer Inst 2000;(5):17:37.

Sarmiento ME, Lescalle GR, Borbolla BT, Espinosa LV. Osteoma gigante com el síndrome de Gardner. Acta Odontológica Venezolana. Volume 44 nº2, 2006

Silva ARBM; Parra RS; Rolo JG; Bueno Filho R; Feres O; Rocha JJR. Polipose Múltipla Familiar. Análise de 44 Casos Tratados no Hospital das Clínicas da FMRP-USP. Rev bras Coloproct, 2007;(3): 310-316.

Shinmura K, Suzuki M, Yamada H, Tao H, Goto M, Kamo T, Nagura K, Kageyama S, Kato M, Ogawa S, Maekawa M, Takamochi K, Suzuki K, Nakamura T, Sugimura H. Characterization of adenocarcinoma of the lung in a familial adenomatous polyposis patient. Pat Int. 2008; (58): 706-712.

Spigelman AD, Willians CB, Talbot IC, Domizio P, Phillips RK. Upper gastrointestinal cancer in patients with familial adenomatous polypsis. Lancet 1989;(2):783-785.

SPSS 17.0 for Windows (computer program). Statistical Package for Social Science (SPSS). Release Version 17.0.1. Chicago (IL): SPSS. Incorporation; 2011. Available from: [http:// www.spss.com](http://www.spss.com).

Stamos JL & Weis WI. The β -catenin Destruction Complex. Col Spr Harb Perperctives in Biology. 2012; (28):201-206.

TYTGAT, G.N.; SILVERSTEIN, F.E. - Pólipos gástricos. In: Endoscopia Gastrointestinal, 3^a ed. W.B. Saunders Company, 1997, p. 172-80.

Valanzano R, Ficari F, Cura MC, Aceto G, Veschi, Cama A, Battista P and Tonelli F. Balance Between Endoscopic and Genetic Information in the Choice of Ileorectal Anastomosis for familial Adenomatous Polyposis. J Surg Onc. 2007;(95):28-33

White BD, Chien J and Dawson DW. Reviews in basic and clinical gastroenterology and hepatology. Gastroenterology. 2012; (42):219-232.

Winawer, S. J.; Cohen, A. M.: Overview of adenocarcinoma of the colon and rectum. McGraw-Hill. 1995, p 7-10.

Winawer, S. J.; Fletcher, R. H.; Miller, L.; Godlee, F.; Stolar, M.H.; Mulrow, C.D.; et al.: Colorectal cancer screening: clinical guidelines and rationale. Gastroenterology. 1997;(2):594-642.

Xiao GQ, Granato RC and Unger PD. **Bilateral Sertoli cell tumors of the testis – a likely new extracolonic manifestation of familial adenomatous polyposis.** Virchows Arch. 2012(461):713-715.

Zeichner SB, Raj N, Cusnir M, Francavilla M and Hirzel A. A de novo germline APC mutation in a patient with familial adenomatous polyposis: Case Report and Literature Review. Clin Medicine Onco.2012(6):315-323.

VI-ANEXOS



1- PARECER COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 15/07/10
(Grupo III)

2ª VIA

PARECER CEP: Nº 874/2007 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0627.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DE MUTAÇÕES NO GENE APC EM FAMÍLIAS COM POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Lillian Barbosa de Queiroz Rossanese

INSTITUIÇÃO: Depto de Genética Médica / UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/11/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/11/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Identificar mutações no gene APC em famílias com polipose adenomatosa familiar.

III - SUMÁRIO

Serão analisadas 40 famílias com casos de polipose adenomatosa familiar. O DNA será extraído e realizada detecção de mutações pelas técnicas de dHPLC associada ao seqüenciamento.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Estudo redigido adequadamente. Não oferece riscos para os pacientes e trará o benefício, pois a detecção das mutações propiciará aconselhamento genético adequado. TCLE adequado.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

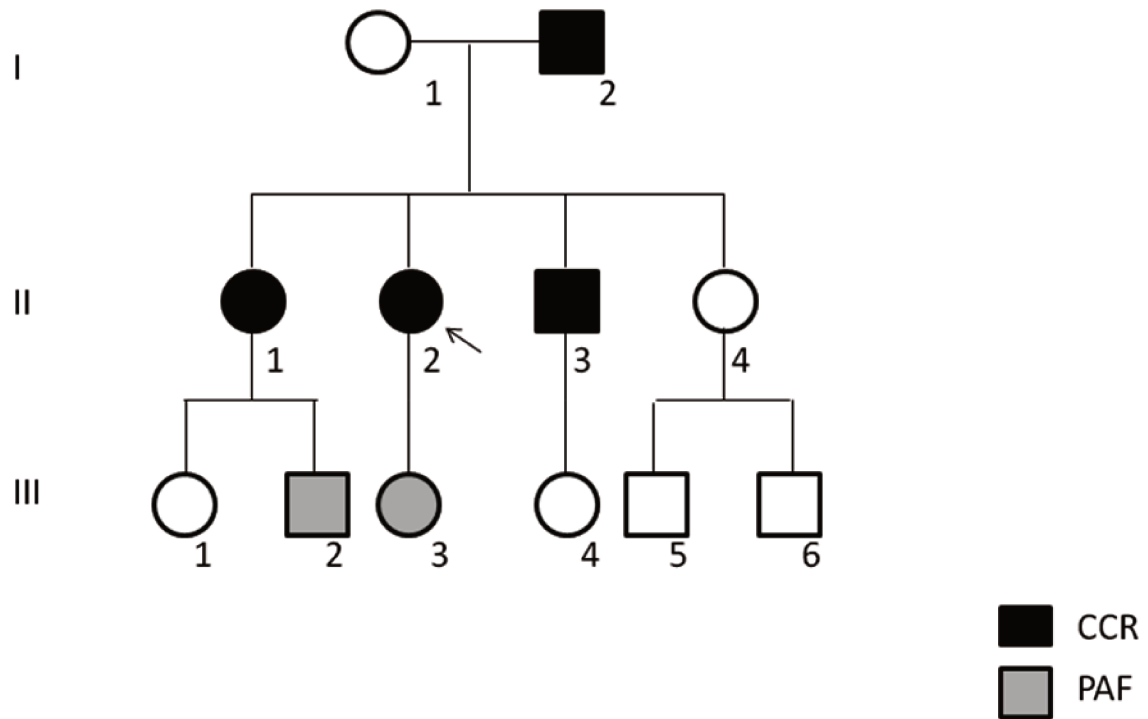
VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2.007.

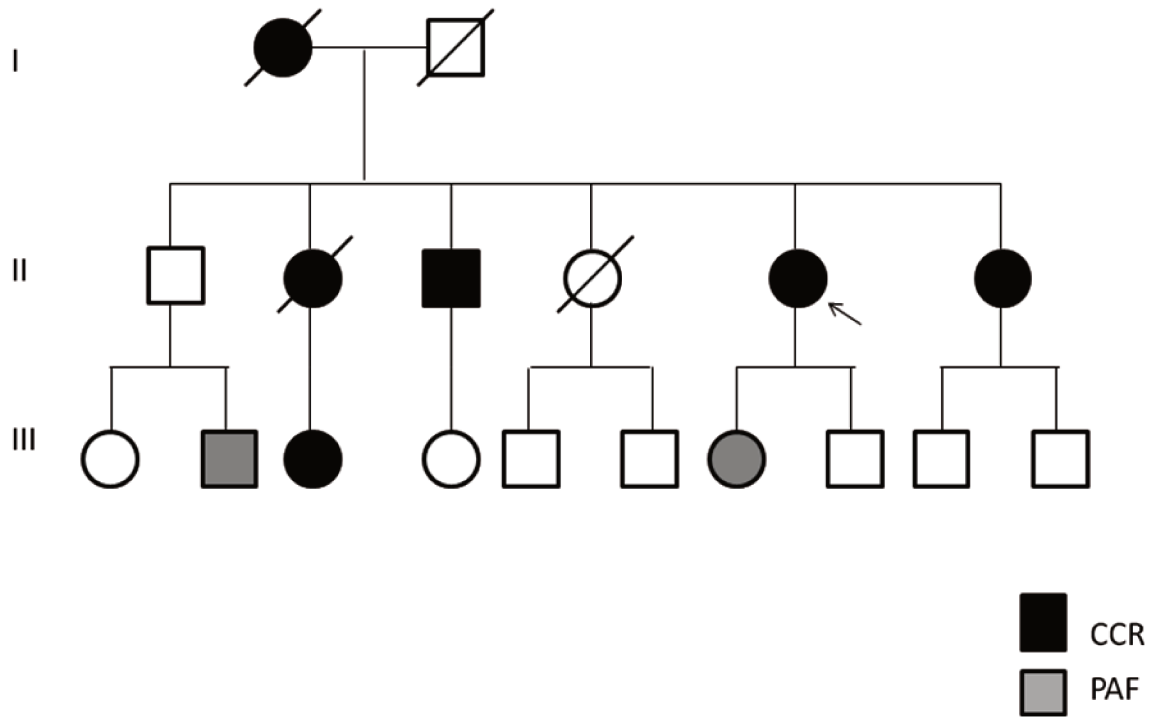
Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

2- HEREDOGRAMAS DOS PACIENTES PORTADORES DE PAF

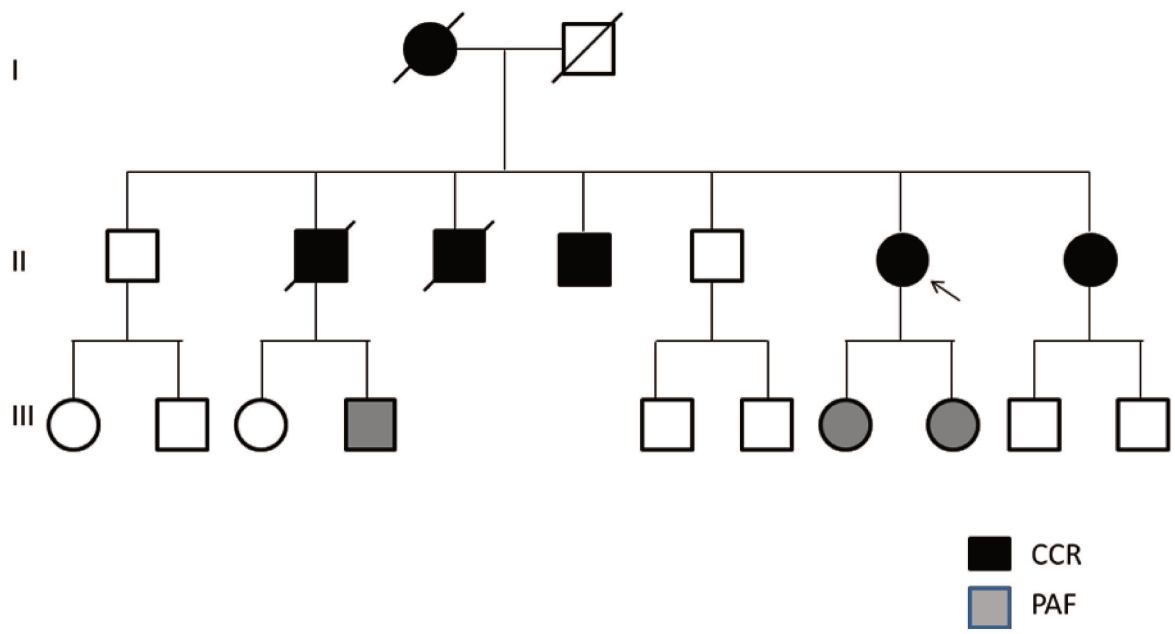
Paciente 1



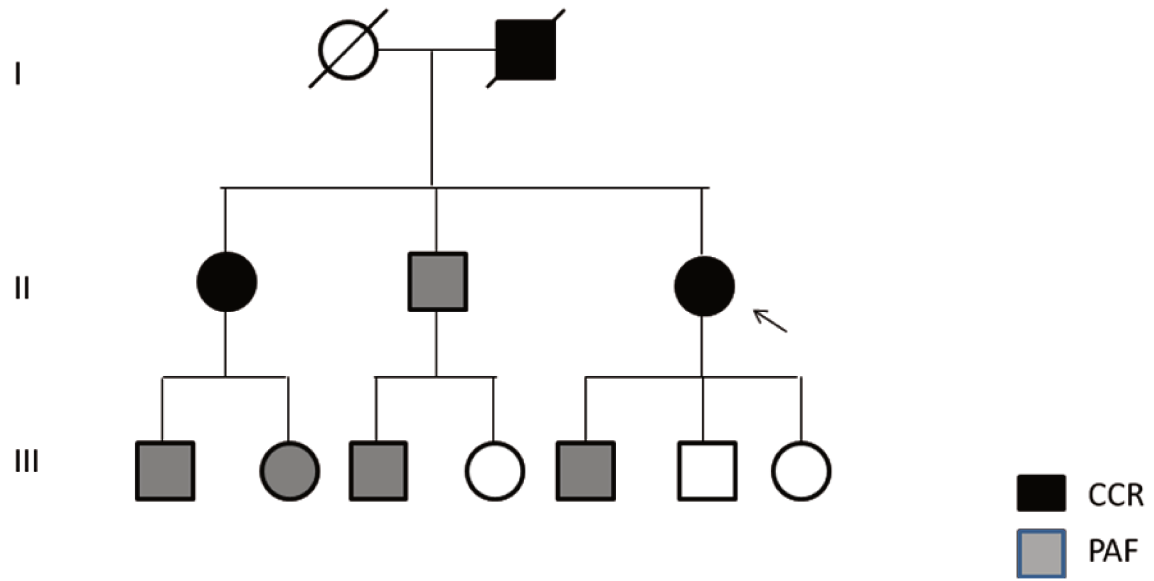
Paciente 2



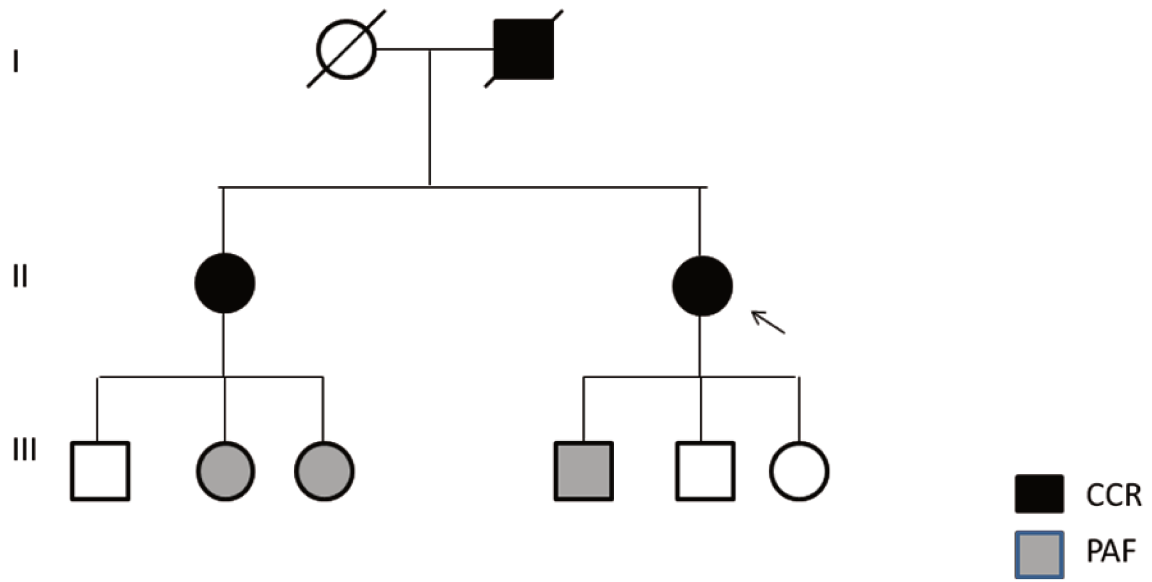
Paciente 3



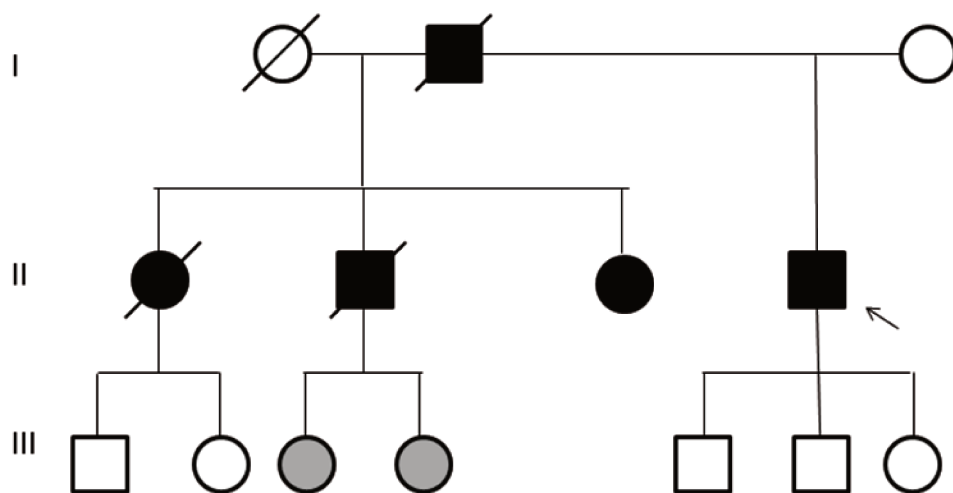
Paciente 4



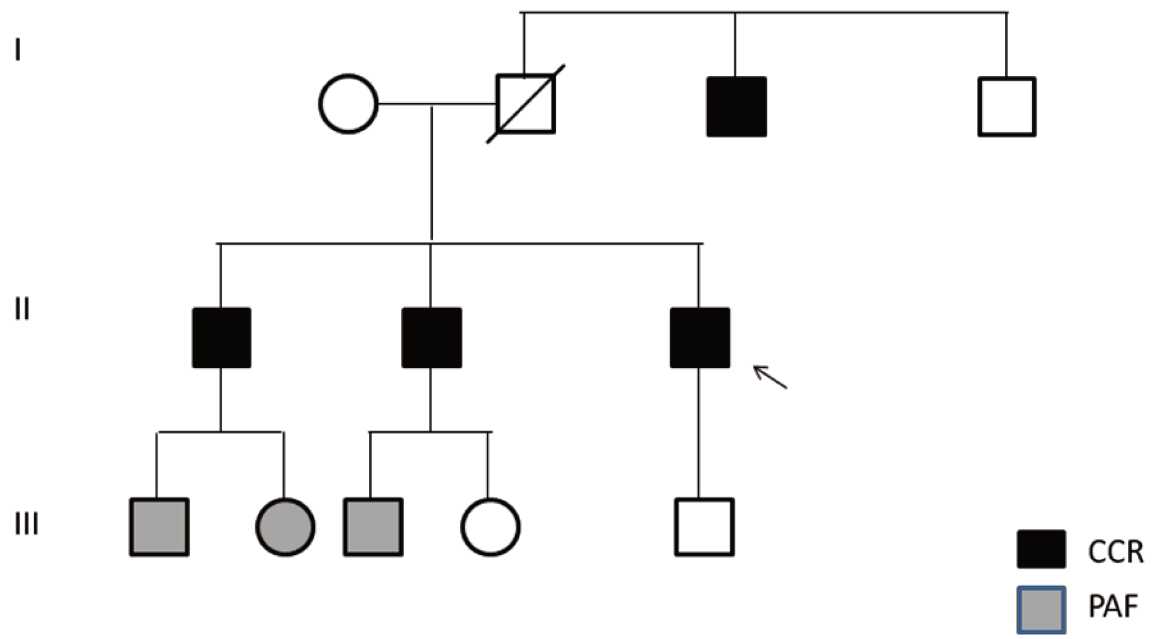
Paciente 5



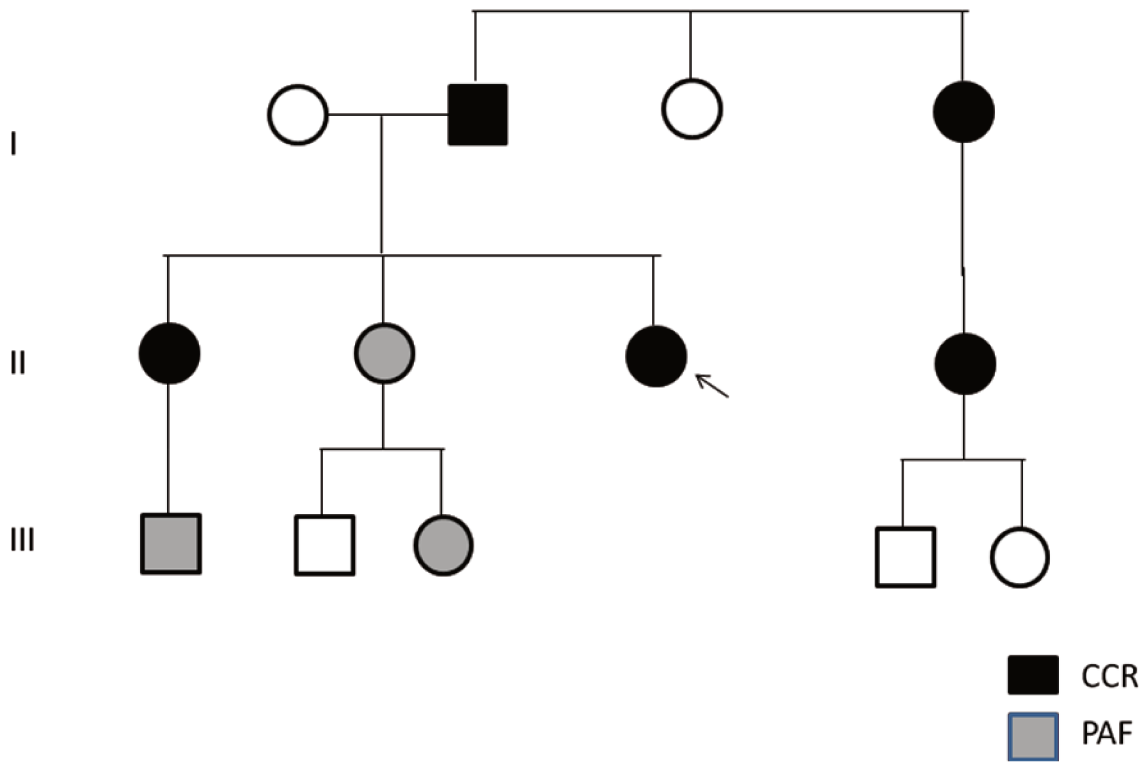
Paciente 6



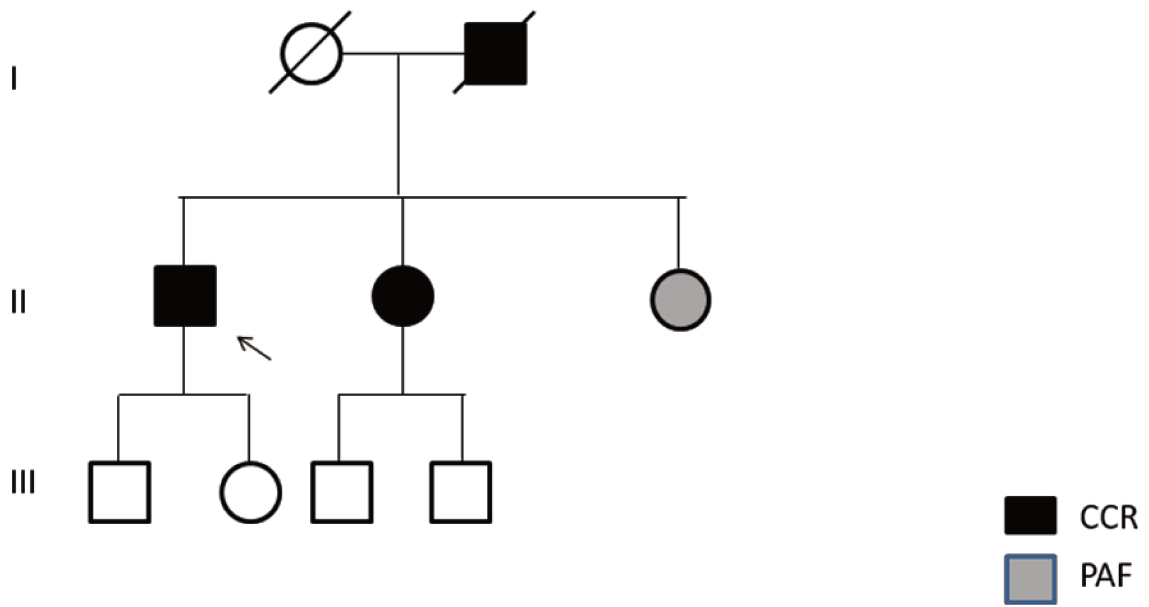
Paciente 7



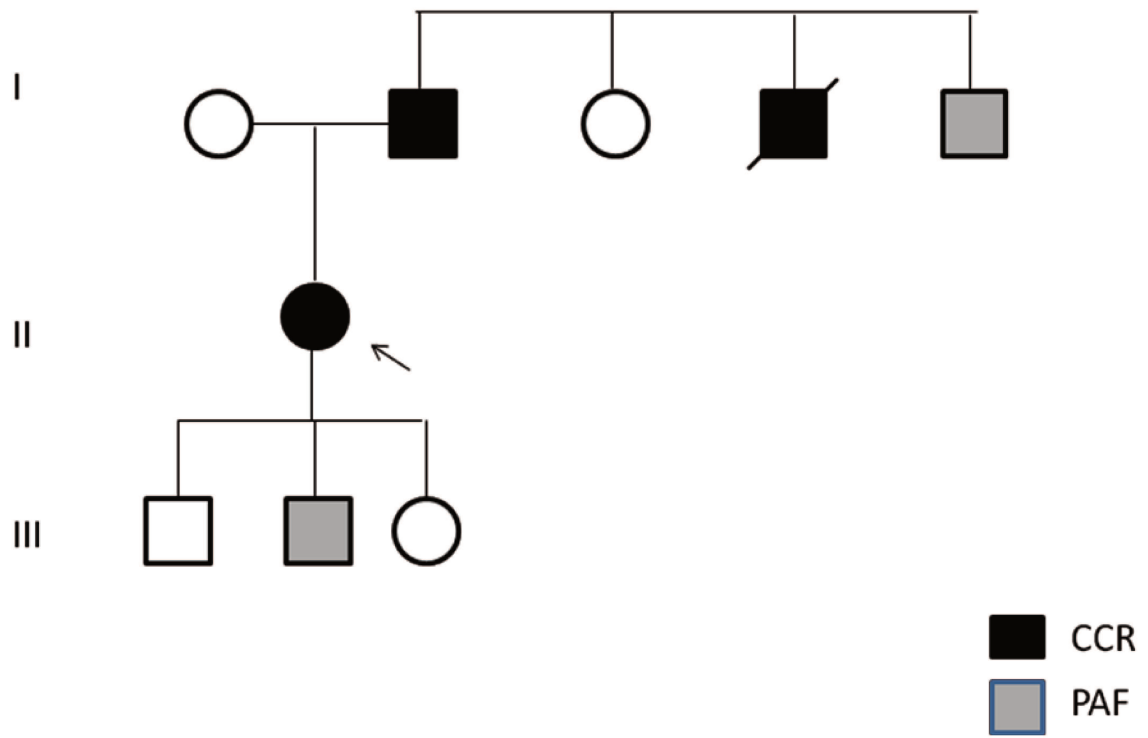
Paciente 8



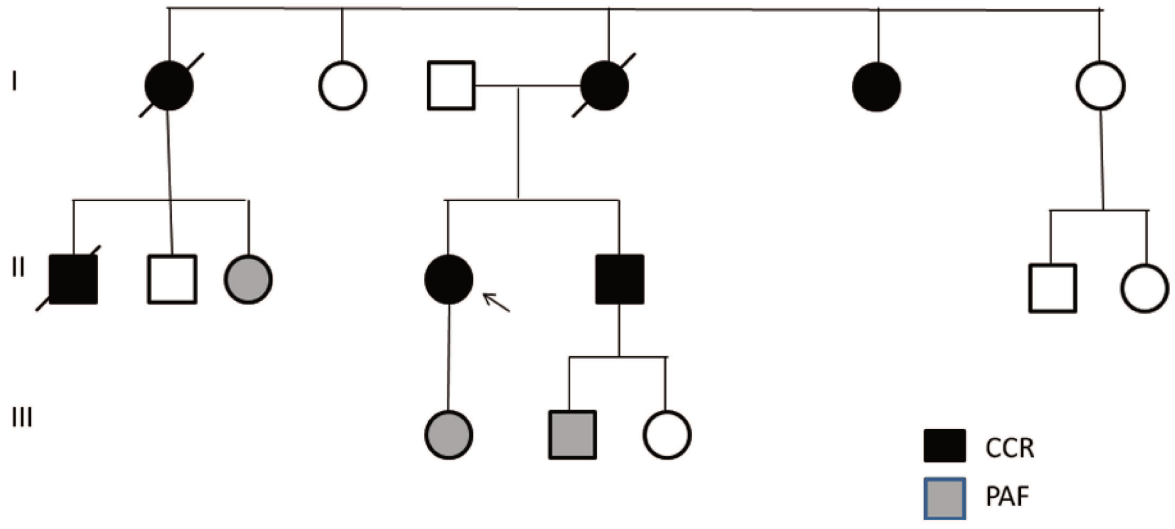
Paciente 9



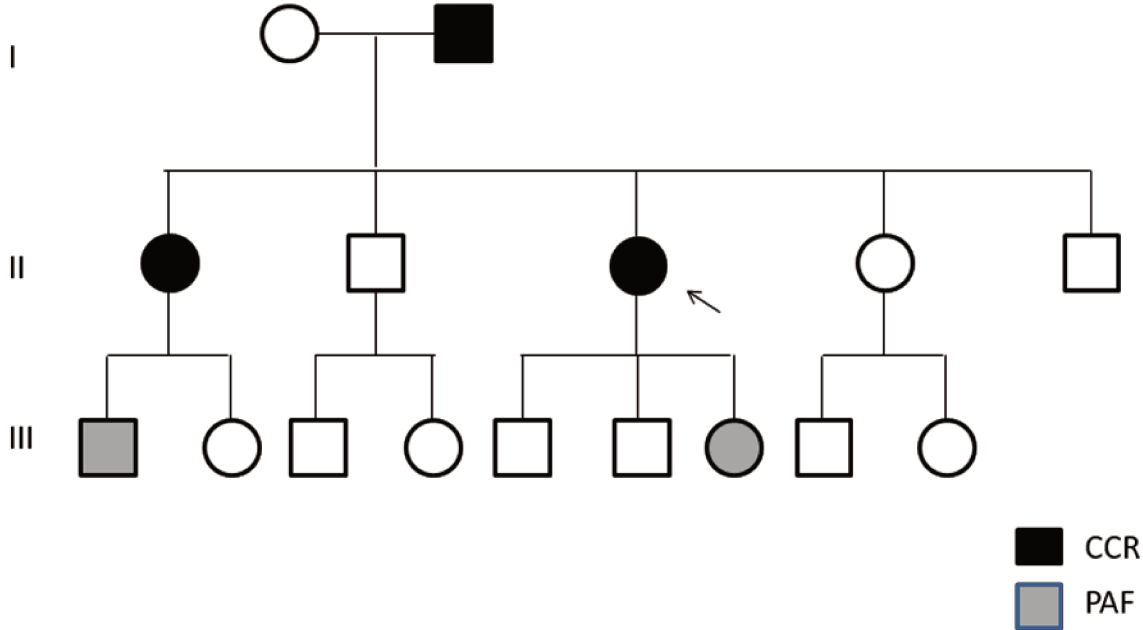
Paciente 10



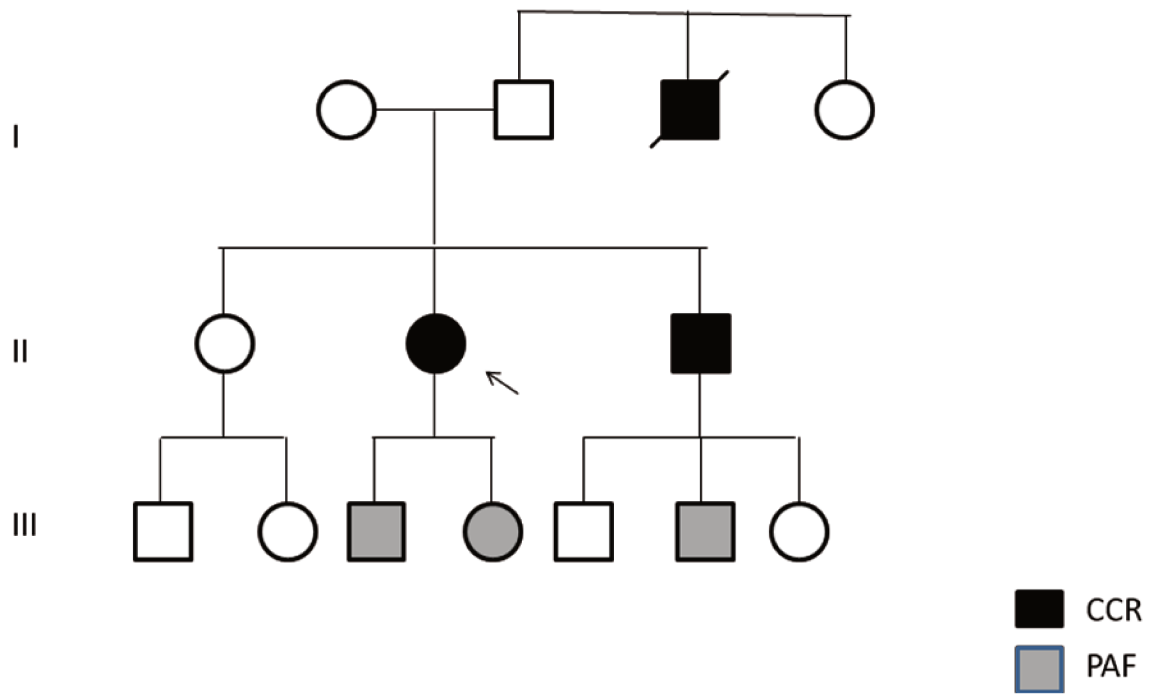
Paciente 11



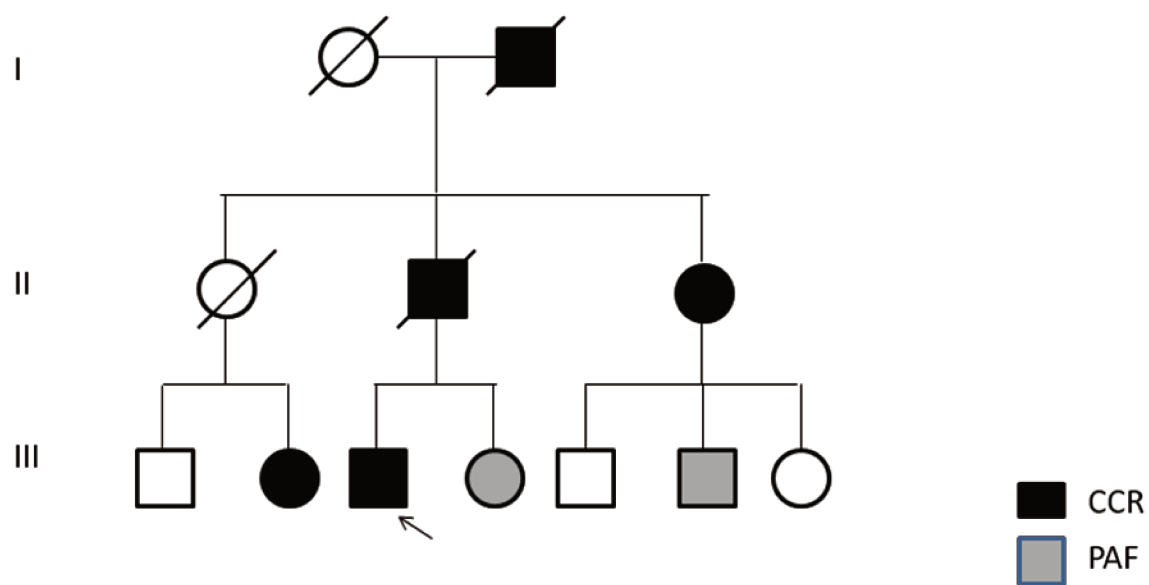
Paciente 12



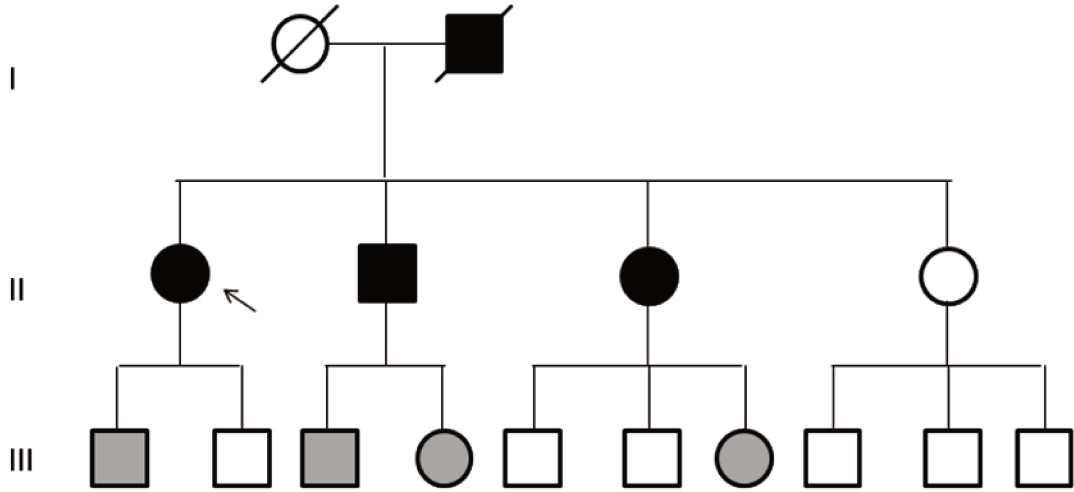
Paciente 13



Paciente 14

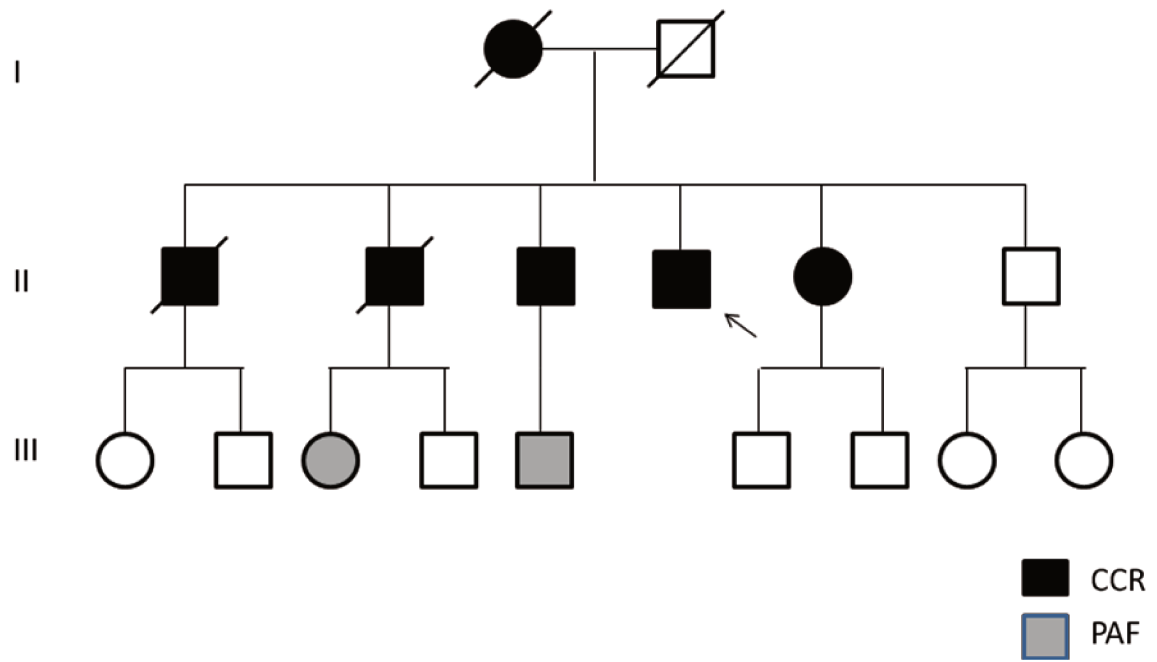


Paciente 15

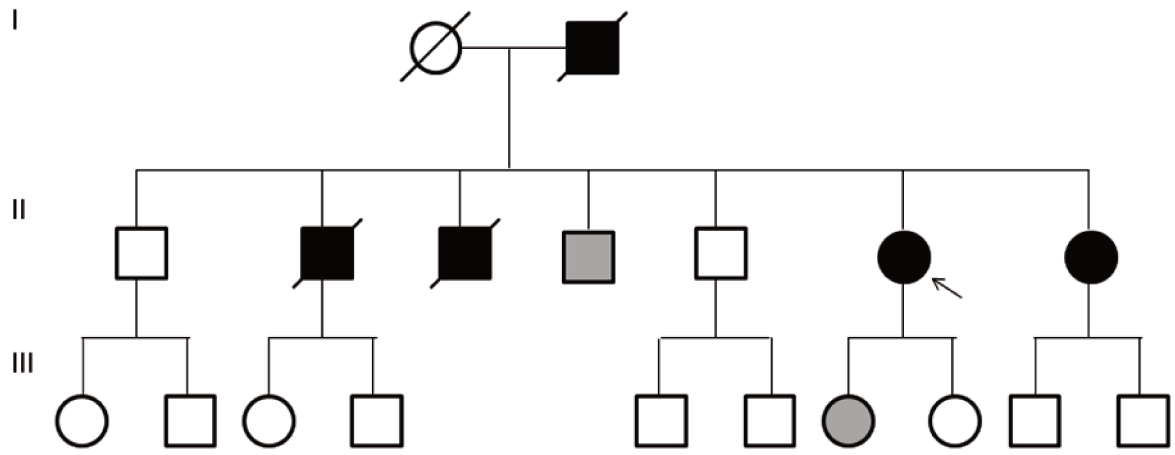


■ CCR
■ PAF

Paciente 16

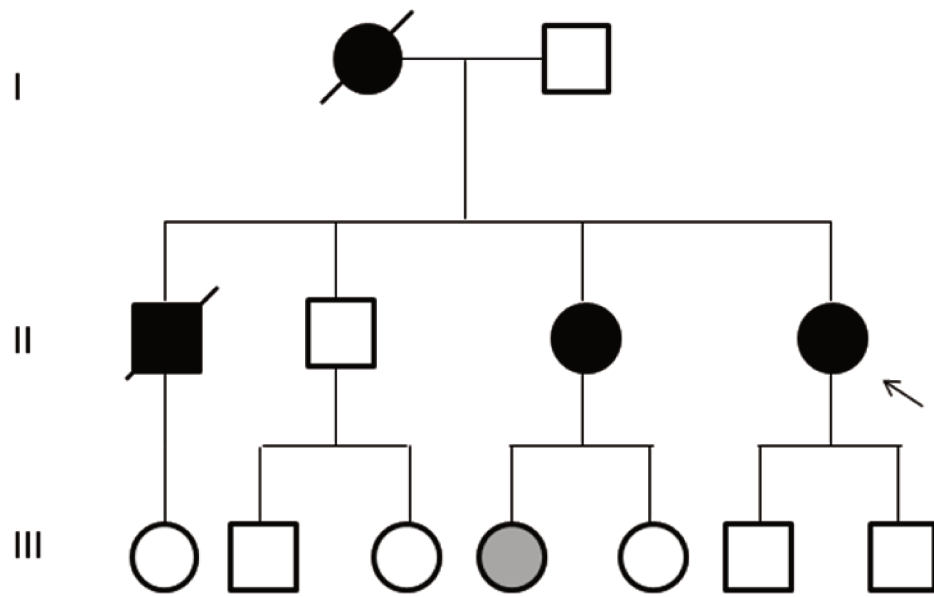


Paciente 17

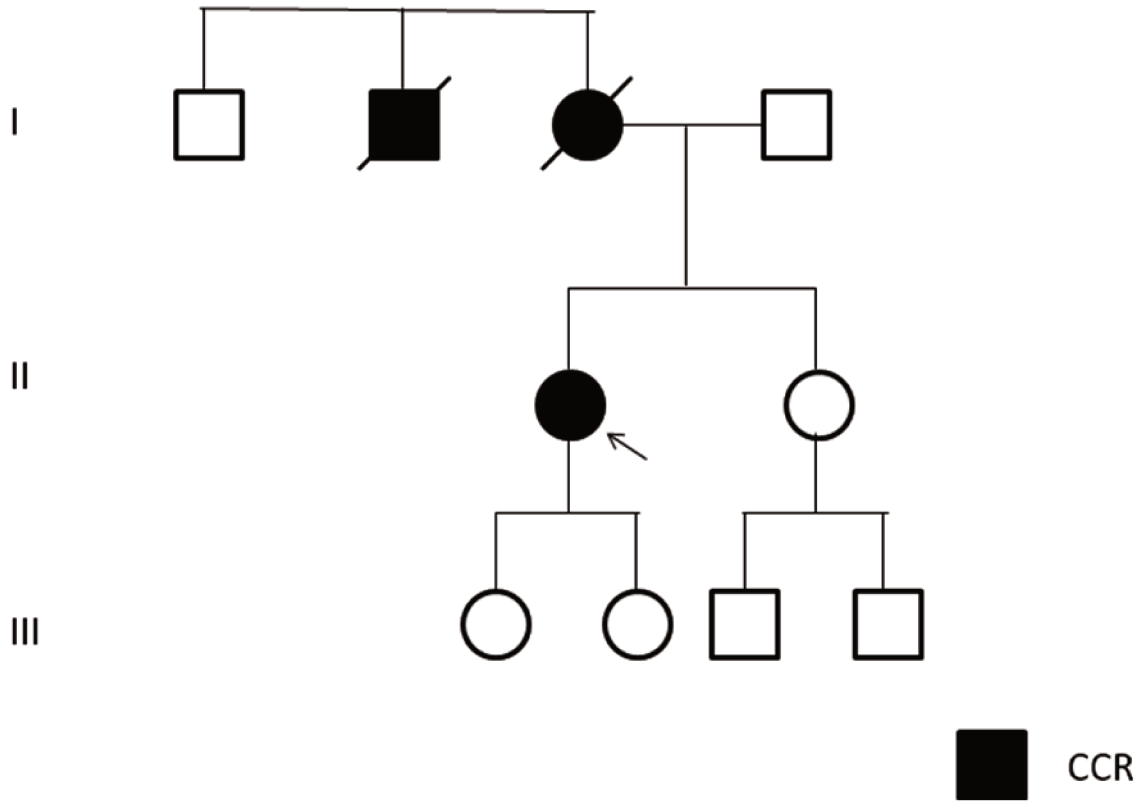


■ CCR
■ PAF

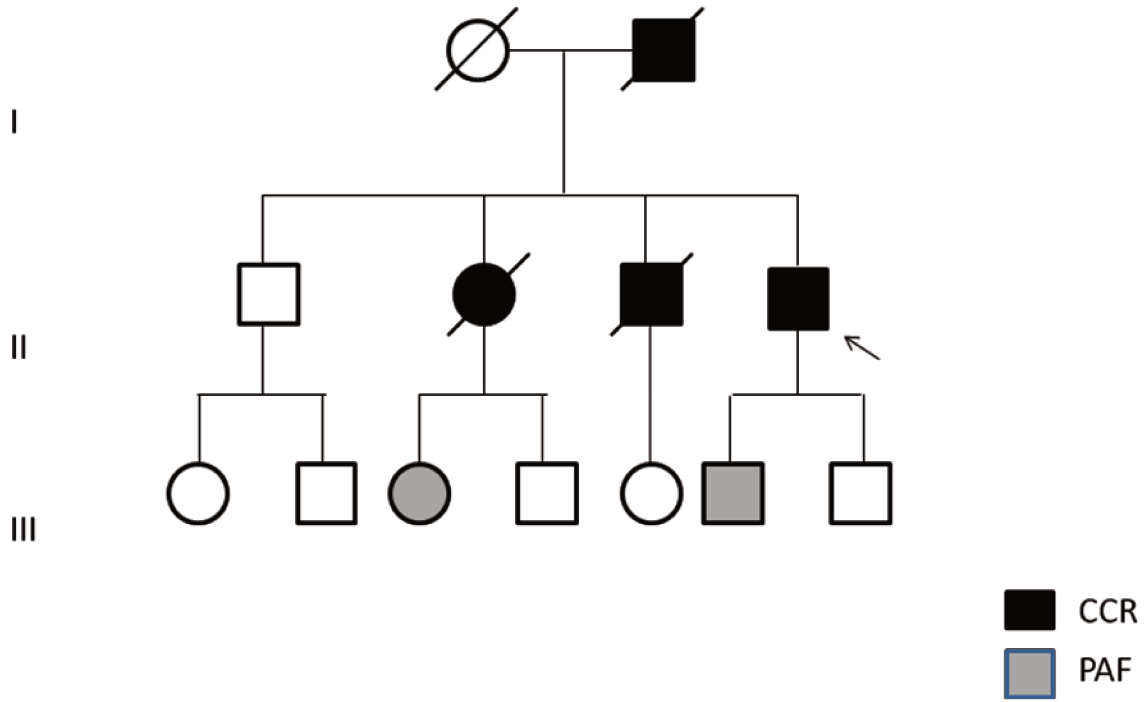
Paciente 18



Paciente 19



Paciente 20



3- AUTORIZAÇÃO REPRODUÇÃO DO ARTIGO

contact@spandidos-publications.com www.spandidos-
publications.com

Oncology Reports

10, Vriaxidos Street, Athens 116 35, Greece

October 29, 2013

Dr L. Barbosa de Queiroz Rossanese

Oncology Reports 30: 2081-2088, 2013

Thank you for your message received October 28, 2013. Permission is hereby granted for reproduction of the above for the purpose of Thesis presentation, as outlined in your message.

Yours sincerely,

Demetrios A. Spandidos

Professor D.A. Spandidos
10 Vriaxidos Street
116 35 Greece
Fax: +30 (210) 725-2922
Tel: +30 (210) 7517117
E-mail: or@spandidos-publications.com
Website: www.spandidos-publications.com
