

# DIAGNÓSTICO GENÉTICO DA POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR: Detecção de mutações no gene APC com base na análise da proteína sintetizada *in vitro*

CRISTINA ALBUQUERQUE, PAULO FIDALGO, CRISTINA CHAGAS, ALEXANDRA SUSPIRO,  
MARÍLIA CRAVO, EUNICE RAMALHO, C. NOBRE LEITÃO, F. COSTA MIRA

Centro de Investigação de Patobiologia Molecular, Serviço de Gastrenterologia.

Instituto Português de Oncologia. Lisboa.

## RESUMO

A polipose adenomatosa familiar do cólon (PAFC) é uma doença autossómica dominante, em que virtualmente 100% dos indivíduos afectados desenvolvem cancro do cólon ou do recto antes dos 40 anos de idade. O gene envolvido na PAFC (gene APC) encontra-se mutado na linha germinal destes doentes. O diagnóstico genético da PAFC foi inicialmente abordado por análise de "linkage". No entanto, em consequência de 95% das mutações no gene APC originarem a terminação precoce da tradução, dando origem a uma proteína truncada, foi proposta uma análise mutacional baseada na síntese *in vitro* da proteína (IVSP- "In Vitro Synthesized Protein"). Este trabalho teve como objectivo avaliar a sensibilidade de diagnóstico da análise mutacional no gene APC (exão 15) por IVSP, num conjunto de famílias portuguesas com PAFC, assim como analisar a distribuição das mutações inferida pelos resultados da IVSP, face ao que está descrito noutras populações, e estabelecer eventuais correlações com o fenótipo. Foram estudados 88 indivíduos pertencentes a 23 famílias com PAFC. Como primeira abordagem foi efectuada a análise do exão 15, que compreende 75% da região codificante do gene. O exão foi dividido em quatro fragmentos, os quais foram amplificados por PCR, transcritos e traduzidos *in vitro*. Foram detectadas mutações que provocam a truncagem da proteína em nove das 23 (39%) famílias, o que correspondeu a 20 dos 42 (48%) indivíduos analisados nestas nove famílias. Todas as mutações estavam localizadas na região 5' do exão 15, sendo sete delas no primeiro fragmento e a mesma mutação em duas famílias, no segundo fragmento. Com excepção de dois descendentes saudáveis mas em risco, todos os indivíduos em que foi detectada mutação tinham já manifestações clínicas. Um destes dois descendentes, veio depois a desenvolver polipos adenomatosos, o que confirma a precisão de diagnóstico da IVSP. Houve ainda 10 descendentes saudáveis, com idade inferior a 30 anos que, apesar de pertencerem a famílias com mutação no exão 15, não apresentavam a proteína truncada correspondente e, consequentemente, deixaram de estar incluídos em programas de vigilância. Em conclusão, estes resultados demonstram que a análise por IVSP apresenta uma elevada sensibilidade e que deve ser a primeira abordagem no diagnóstico genético pré-sintomático de descendentes em risco. Por outro lado, a identificação de portadores, em fase pré-sintomática, permitirá testar fármacos com potencial para retardar o aparecimento do fenótipo ou mesmo para obter a sua supressão.

## SUMMARY

**Genetic Diagnosis of Familial Adenomatous Polyposis: Detection of APC gene mutations in an *in vitro* synthesised protein**

Familial adenomatous polyposis of the colon (FAP) is a dominant autosomic disease in which virtually 100% of the affected individuals develop colorectal cancer before the age of

forty. The gene responsible for this disease (APC gene) is mutated in the germ line of these patients. The genetic diagnosis of FAP was initially done using linkage analysis. Because 95% of the mutations in APC gene result in a stop codon which will originate a truncated protein, previous authors have proposed that the mutation analysis should be performed using an *in vitro* synthesized protein (IVSP) assay. In this study we searched for germinal mutations in exon 15 of the APC gene in subjects belonging to families with FAP, using the IVSP assay. Eighty individuals belonging to 23 families were included in this series. We started by studying exon 15 which encompasses 6500/8535 bp and which corresponds to 75% of the coding region. This exon was divided into four fragments, which were amplified by PCR and the product was used in a transcription/translation assay. Mutations resulting in a truncated protein were detected in 9/23 (39%) of the families. This corresponds to 20/42 (48%) of individuals analysed in these nine families. All the mutations were located in the 5' region of exon 15, with seven of them being in the first fragment and the remaining two in the same place of the second fragment. With the exception of two healthy individuals at risk, all the others with a detected mutation, already exhibited clinical manifestations. One of these two individuals was later confirmed to harbor colonic polyps, strengthening the diagnostic accuracy of this IVSP analysis. We also identified 10 other healthy subjects at risk with a negative genetic diagnosis, who were therefore removed from surveillance programs. In conclusion, our results show that IVSP analysis has a high sensitivity as a diagnostic tool and should be used as the first screening method to identify those individuals who have inherited the genetic defect, even before they have developed any symptoms. This will enable us to try new drugs which may potentially delay or prevent the development of colonic polyps.

## INTRODUÇÃO

A polipose adenomatosa familiar do cólon (PAFC) é uma doença autossômica dominante e com elevada penetração, que clinicamente se caracteriza pelo desenvolvimento de 100 ou mais polipos adenomatosos no cólon e recto. Estes polipos constituem lesões pré-malignas com potencial de progressão para carcinoma se não for efectuada uma colectomia profiláctica. Também se registam manifestações extracólicas como adenomas gástricos e duodenais, osteomas, quistos epidermóides, tumores desmóides, anomalias nos dentes e hipertrofia congénita do epitélio pigmentar da retina (HCEPR).

Esta doença é causada por mutações no gene APC ("Adenomatous Polyposis Coli") que é um gene supressor tumoral. Para além da relação causal estabelecida entre o gene APC e a PAFC, foram também detectadas mutações neste gene, na maioria dos adenomas e carcinomas colorectais esporádicos<sup>1,2</sup>, admitindo-se que estas constituem um evento fulcral e precoce no modelo esporádico de carcinogénese<sup>3</sup>.

O gene APC foi identificado e localizado no braço longo do cromossoma 5, na região 5q21-q22<sup>4,5,6</sup>, tendo sido posteriormente clonado e sequenciado<sup>7,8,9,10</sup>. Este gene possui uma região codificante de 8535 pb, é constituído por 15 exões, e codifica uma proteína de 2843 resíduos de aminoácido com um peso molecular de aproximadamente 300 Kd<sup>7,9</sup>. O exão 15 compreende 6500 das 8535 pb, representando assim 75% da região codificante<sup>7</sup>.

Estudos sobre a função da proteína APC mostram que

esta poderá estar envolvida na transmissão de sinais reguladores do crescimento celular através da interacção com o complexo catenina-E-caderina<sup>11,12</sup>. A E-caderina pertence ao grupo das caderinas<sup>13</sup>, as quais são proteínas de adesão celular, que regulam a interacção entre as células e se encontram envolvidas na organização estrutural e funcional das células em vários tecidos<sup>14</sup>. Recentemente, foi também proposta a intervenção da proteína APC no ciclo celular, através do bloqueio da passagem da fase G0/G1 para a fase S, devido a modular negativamente a actividade dos complexos ciclinas-cinases dependentes das ciclinas<sup>15</sup>. Apesar de não haver um conhecimento exacto acerca da sua função, tudo indica que as proteínas APC sejam activas como dímeros e que as proteínas truncadas possam com elas formar heterodímeros, os quais terão uma actividade de supressão tumoral reduzida ou nula<sup>16</sup>.

A idade de aparecimento das manifestações clínicas na PAFC pode variar consideravelmente de indivíduo para indivíduo e na maior parte dos casos, o diagnóstico é feito entre a segunda e a terceira décadas de vida<sup>17</sup>. Nas formas atenuadas da doença, com manifestações menos exuberantes e de aparecimento mais tardio, o diagnóstico, pode ser só possível perto da quinta ou sexta década de vida. Uma vez que cada descendente tem 50% de risco de herdar a mutação e que, na ausência de diagnóstico genético, não é possível identificar quais os afectados, isto significa que todos os indivíduos em risco devem ser incluídos em programas de vigilância com

colonoscopias regulares. Daí as vantagens de um diagnóstico genético, permitindo tornar selectivos os programas de vigilância.

O diagnóstico genético da PAFC foi inicialmente abordado por análise de "linkage"<sup>5</sup>, a qual tem vários inconvenientes como seja o facto de depender de colheitas em vários familiares e não ser informativa no caso de primeiras mutações<sup>18</sup>. Posteriormente, estudos envolvendo a pesquisa de mutações no gene APC, através de métodos como a análise de polimorfismos de conformação em cadeia simples (SSCP- "Single-Strand Conformation Polymorphism")<sup>7</sup> e a electroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE- "Denaturing Gradient Gel Electrophoresis")<sup>19</sup>, permitiram demonstrar que, apesar das mutações se poderem distribuir ao longo de toda a região codificante do gene, uma grande parte delas (aproximadamente 70%) parece localizar-se na região 5' do exão 15 entre os codões 713 e 1597<sup>19,20,21</sup>. Adicionalmente, verificou-se também que 95% das mutações no gene APC originavam um codão stop que resultava na terminação precoce da tradução, dando origem a uma proteína APC com um tamanho inferior ao normal (proteína truncada)<sup>19,20,21</sup>. Por este motivo foi proposta uma análise mutacional baseada no estudo da proteína sintetizada *in vitro* (IVSP- "In Vitro Synthesized Protein")<sup>18</sup>.

Realizámos o presente estudo, com o objectivo de avaliar a sensibilidade de diagnóstico da análise mutacional por IVSP para o exão 15, num conjunto de famílias portuguesas com PAFC, assim como analisar a distribuição das mutações inferida pelos resultados da IVSP, face ao que está descrito noutras populações, e estabelecer eventuais correlações com o fenótipo.

## MATERIAL

### *Famílias com PAFC*

Foram analisados 88 indivíduos pertencentes a 23 famílias com PAFC. Estas famílias pertencem a um registo de base hospitalar que tem por objectivo primordial assegurar uma adequada mobilização de parentes em risco para os programas de vigilância. O seu fenótipo foi rigorosamente classificado com avaliação directa pelos autores. Nos casos não directamente avaliados por nós, a classificação do seu fenótipo foi feita com base em informação obtida a partir dos médicos assistentes. A definição do perfil fenotípico ao longo das gerações, bem como a verificação dos diagnósticos em doentes já falecidos, resultou da obtenção de informações médicas ainda disponíveis ou da colheita de certidões de óbito.

A presença de fenótipo atenuado foi aceite sempre que

numa família a maioria dos seus membros exprimia adenomas do cólon em número inferior a 100. Em média, a idade de aparecimento do fenótipo e dos casos de carcinoma colorectal foi tardio em relação aos fenótipos convencionais de PAFC.

Os indivíduos analisados tinham uma idade média de 35 anos (8-75 anos), sendo 52 do sexo masculino e 36 do sexo feminino. Foram incluídos 39 indivíduos com doença já diagnosticada e 49 indivíduos em que não havia qualquer informação sobre o estado portador de PAFC. Destes, 27 tinham uma idade inferior a 30 anos e como tal o diagnóstico de PAFC ainda não podia ser excluído.

Nestas 23 famílias foi possível identificar uma história familiar em 20, enquanto que nas restantes três famílias não havia história na geração anterior, o que permitiu sugerir que estávamos perante uma primeira mutação. Destes 88 indivíduos, 23 (26%) apresentavam manifestações extracólicas: osteomas (n=4), hipertrofia congénita do epitélio pigmentar da retina (HCEPR) (n=14), tumores desmóides intra-abdominais (n=4) e neuroblastoma do cerebello num doente. Duas das famílias analisadas apresentavam uma forma atenuada da doença com um número de polipos do cólon inferior a 50.

### *Consentimento para diagnóstico genético*

Todos os membros das famílias com PAFC foram informados da natureza do teste da IVSP, das possíveis consequências de um teste positivo quer para a programação da vigilância, quer para possíveis consequências no plano social, como acesso a empregos e seguros, e no plano psicológico, pelo conhecimento antecipado do estado de portador de um estigma hereditário. Foram também explicadas possíveis consequências psicológicas adversas de um resultado negativo, naqueles casos em que a história familiar determinou a adopção pelo indivíduo em risco de uma estratégia pessoal diferente da desejada. Foi garantida a confidencialidade de todos os dados e após estes esclarecimentos foi obtido consentimento para diagnóstico, não tendo sido registados casos de recusa.

### *Método de extracção de DNA*

Foram colhidos 3 ml de sangue periférico nos 88 indivíduos incluídos neste estudo, a partir do qual foi extraído DNA por um método de "salting-out", segundo uma modificação do método de Miller *et al.*<sup>22</sup>.

### *Método da IVSP*

Devido ao seu tamanho, o exão 15 foi dividido em

quatro fragmentos cujas extremidades eram sobreponíveis (1º:1959-3789 pb; 2º:3084-5100 pb; 3º:4782-7009 pb; 4º:6300-8668 pb). O facto de as extremidades dos fragmentos analisados serem sobreponíveis, supera a diminuição da sensibilidade na detecção de mutações que originam a truncagem da proteína, no princípio ou no fim de um determinado fragmento.

A síntese *in vitro* das proteínas e a sua análise foram efectuadas com base no método descrito por Van der Luijt *et al.*<sup>23</sup>. As etapas principais deste método encontram-se representadas de um modo esquemático na figura 1.

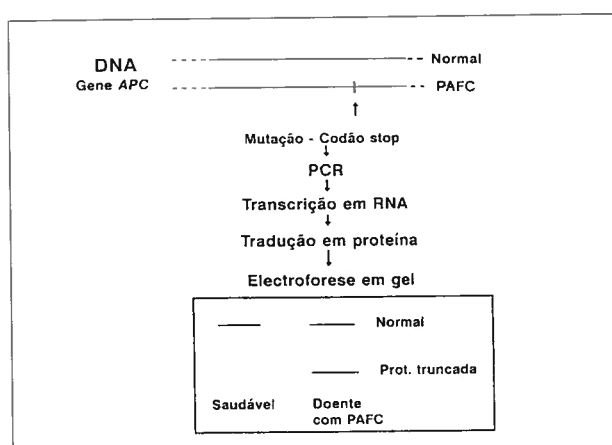


Figura 1: Representação esquemática do método utilizado para a análise mutacional do exão 15 do gene APC.

Cada um dos quatro fragmentos foi amplificado por PCR numa reacção de 25 µl. Foi usada 1 unidade de Taq DNA polimerase (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, CT) em Tris-HCl 10mM (pH 8,6) com trifosfatos de desoxirribonucleósidos (dNTPs) 0,4 mM. Consoante o fragmento amplificado foram utilizados entre 2-5 mM de MgCl<sub>2</sub> e 2,5-6 pmol de cada um dos "primers". O "primer" 5' possui, na sua extremidade a 5', uma sequência de bases que compreende a sequência de "consensus" para o reconhecimento pela T7 RNA polimerase, necessária para a iniciação da transcrição, assim como a sequência de "consensus" de Kozak para a iniciação da tradução.

O produto de PCR (cerca de 500 ng) foi utilizado numa reacção de transcrição e tradução acopladas utilizando um lisado de reticulócitos e uma mistura de resíduos de aminoácido (Promega, Madison, WI). Para marcação das proteínas foi utilizada a [<sup>3</sup>H]leucina (Amersham/USB, Cleveland, OH). Após 1 hora de incubação, as amostras foram desnaturadas e analisadas num gel de poliacrilamida-SDS 14%. Após a electroforese o gel foi fixado, impregnado com um intensificador (Amersham/USB) e, posteriormente, seco durante 2 horas a 70°C. As proteínas foram visualizadas por

autorradiografia, com exposição a -70°C.

## RESULTADOS

Foram detectadas mutações que provocam a truncagem da proteína APC em nove das 23 (39%) famílias analisadas. Naquelas famílias em que foi detectada mutação, 20 dos 42 (48%) indivíduos analisados, apresentavam uma mutação que provocava a truncagem da proteína. Em cada família diagnosticada, os indivíduos saudáveis apresentavam a banda correspondente à proteína normal, aproximadamente 85 Kd no primeiro fragmento (figuras 2 e 3) e aproximadamente 95 Kd no segundo fragmento (figura 4). Os indivíduos afectados, para além da banda correspondente à proteína normal, apresentavam também uma banda adicional correspondente a uma proteína de menor peso molecular (proteína truncada). Nas restantes 14 famílias a análise dos quatro fragmentos não revelou a existência de nenhuma proteína truncada, observando-se apenas a banda correspondente à proteína normal.

### Acuidade diagnóstica

Verificámos que dos 39 doentes com manifestações clínicas, 18 revelaram a presença de uma proteína truncada, a qual apresentava o mesmo tamanho dentro de cada família, indicando por isso que todos os afectados numa família possuíam a mesma mutação. Os restantes 21 indivíduos com manifestações clínicas mas sem mutação detectada no exão 15, pertencem provavelmente a famílias com mutação nos exões 1-14. Em

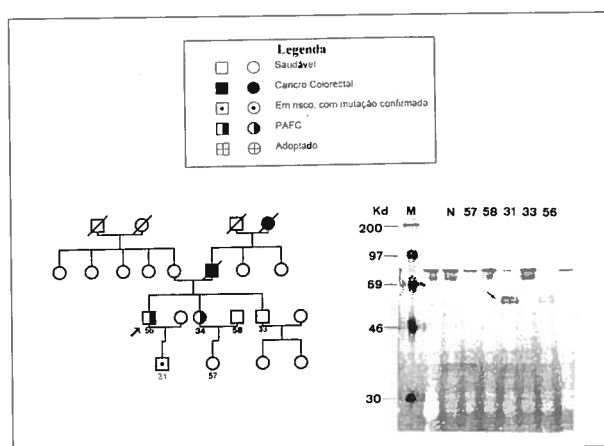


Figura 2: Em cima encontra-se representada a simbologia da árvore genealógica. Em baixo, à esquerda, encontra-se representada a árvore genealógica da família 7. À direita pode-se observar o resultado da análise por IVSP do primeiro fragmento do exão 15 na família 7, mostrando a banda correspondente à proteína normal (aproximadamente 85 Kd) e a banda correspondente à proteína truncada (aproximadamente 60 Kd), a qual se encontra indicada com uma seta. Os números em cada linha correspondem aos indivíduos no pedigree. N é o controle normal. M é o marcador de peso molecular.

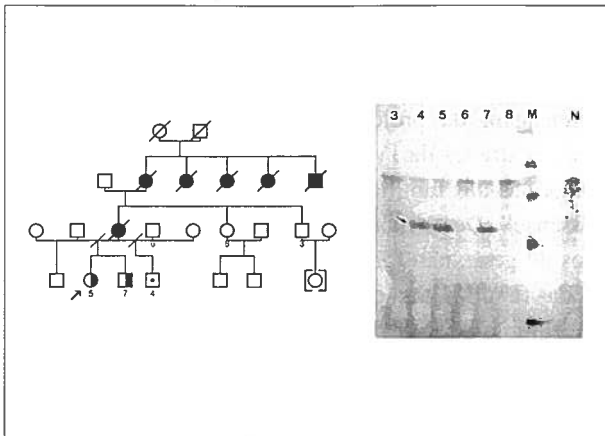


Figura 3: À esquerda encontra-se representada a árvore genealógica da família 17 (Para simbologia ver figura 2). À direita pode-se observar o resultado da análise por IVSP do primeiro fragmento do exão 15 na família 17, mostrando a banda correspondente à proteína normal (aproximadamente 85 Kd) e a banda correspondente à proteína truncada (aproximadamente 52 Kd), a qual se encontra indicada com uma seta. Os números em cada linha correspondem aos indivíduos no pedigree. N é o controle normal. M é o marcador de peso molecular (os valores do peso molecular são idênticos aos da figura 2).

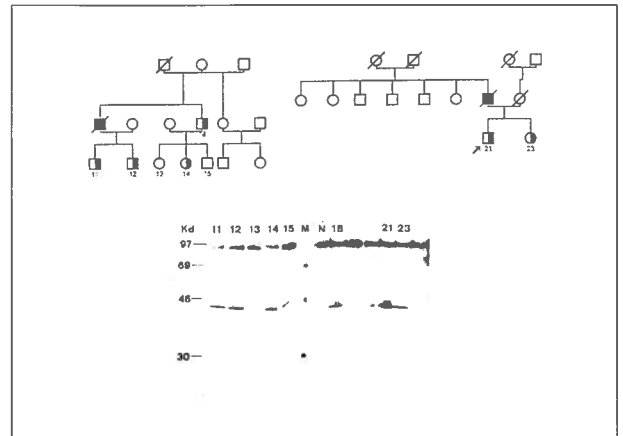


Figura 5: Resultados da análise por IVSP nos indivíduos pertencentes a famílias com PAFC, mas sem manifestações clínicas, consoante a sua idade fosse inferior ou superior a 30 anos.

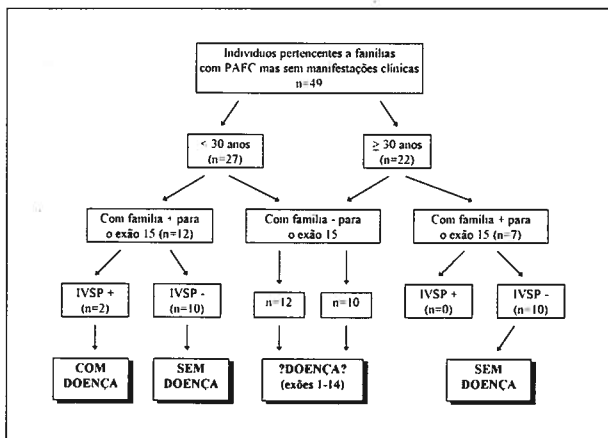


Figura 4: Em cima encontram-se representadas as árvores genealógicas das famílias 1 (à esquerda) e 5 (à direita) (Para simbologia ver figura 2). Em baixo pode-se observar o resultado da análise por IVSP do segundo fragmento do exão 15 nas famílias 1 e 5, mostrando a banda correspondente à proteína normal (aproximadamente 95 Kd) e a banda correspondente à proteína truncada (aproximadamente 45 Kd), a qual se encontra indicada com uma seta. Os números em cada linha correspondem aos indivíduos no pedigree. N é o controle normal.

relação aos indivíduos analisados, mas sem manifestações clínicas, encontram-se representados na figura 5 os resultados da análise por IVSP consoante tivessem uma idade inferior ou superior a 30 anos. Assim, 27 dos 49 indivíduos tinham uma idade inferior a 30 anos e, como tal, o diagnóstico de PAFC não podia ser excluído em base clínica. Destes 27 indivíduos, 12 pertenciam a famílias com mutação no exão 15. Em dois deles, foi detectada uma proteína truncada e deste modo foi possível o diagnóstico genético de PAFC em fase pré-sintomática. Nos 10 indivíduos que não apre-

sentaram proteína truncada foi possível, por outro lado, excluir com base na IVSP o diagnóstico genético de PAFC.

Analisando com mais detalhe a árvore genealógica dos dois indivíduos em que foi feito diagnóstico genético pré-sintomático, verifica-se que nas duas crianças saudáveis, mas em risco (casos 31 e 4), pertencentes a duas famílias diferentes (figuras 2 e 3) com mutação no primeiro fragmento, foi detectada uma proteína truncada de tamanho igual à apresentada pelos membros afectados da família.

Como pode ser observado, a criança em risco (caso 31) na família 7 (figura 2) apresenta uma proteína truncada de aproximadamente 60 Kd, tal como o pai (caso 56), enquanto a prima também em risco (caso 57) não apresenta a proteína truncada. A tia (caso 34), clinicamente afectada, não foi analisada por não se dispôr do sangue respectivo. Na família 17 (figura 3), os dois irmãos afectados (casos 5 e 7) apresentaram uma proteína truncada de aproximadamente 52 Kd, assim como o irmão saudável mas em risco. Esta criança, após o resultado positivo da IVSP, foi submetida a uma colonoscopia tendo-lhe sido detectados polipos adenomatosos no cólon.

Nos indivíduos assintomáticos e com idade igual ou superior a 30 anos (n=22) o diagnóstico de PAFC torna-se menos provável. Destes, 12 pertenciam a famílias com mutação no exão 15, e como tal pode ser excluído o diagnóstico de PAFC com base na IVSP. Nos indivíduos pertencentes a famílias negativas para o exão 15 (n=10), o diagnóstico ainda não pode ser excluído com segurança, nomeadamente devido ao facto de duas destas famílias terem uma forma atenuada de doença em que as manifestações clínicas podem ser mais tardias.

### ***Padrão de mutações***

Em relação à localização do local de truncagem da proteína, todas as mutações estavam na região 5' do exão 15. Em sete das famílias foi detectada uma proteína truncada no primeiro fragmento, enquanto nas restantes duas famílias a proteína truncada foi detectada no segundo fragmento, tudo indicando, neste caso, tratar-se da mesma mutação visto as proteínas truncadas observadas nas duas famílias apresentarem igual tamanho (aproximadamente 45 Kd) (*figura 4*).

### ***Relações fenotípicas***

Uma das famílias analisadas possuía uma forma atenuada de polipose, não lhe tendo sido detectada nenhuma mutação no exão 15.

Onze dos indivíduos analisados que tinham diagnóstico genético positivo (neste caso com mutação no exão 15), foram simultaneamente submetidos a exame oftalmológico. Em 10 (91%) foi diagnosticada HCEPR. Por outro lado, em todos os indivíduos da presente série que apresentavam tumores desmóides (n=4) foi detectada uma mutação no exão 15. Todas as famílias com mutação neste exão apresentavam um fenótipo exuberante com abundantes manifestações extra-cólicas.

## **DISCUSSÃO**

O diagnóstico genético da PAFC foi inicialmente abordado por análise de "linkage". No entanto, esta tem o inconveniente de depender de colheitas em múltiplos familiares e de não poder ser aplicada quando se está na presença de uma primeira mutação ou quando os marcadores polimórficos não são informativos<sup>18</sup>. Pelo contrário, a detecção directa da mutação responsável pela doença tem a vantagem de depender apenas da análise do indivíduo suspeito.

Para a pesquisa de mutações no gene APC têm sido utilizados vários métodos, entre os quais, o SSCP<sup>7,21</sup> e o DGGE<sup>19</sup>. No entanto, devido ao facto de as mutações se encontrarem distribuídas ao longo de toda a região codificante do gene, estes métodos revelaram-se bastante demorados e dispendiosos, dado permitirem apenas a análise de fragmentos de DNA de 100-500 pb de cada vez. A IVSP ao permitir a análise de fragmentos maiores é mais rápida e, pelo facto de se efectuar ao nível da proteína, tem a vantagem de detectar apenas as mutações que provocam alterações na proteína e consequentemente no fenótipo do indivíduo.

No entanto, a IVSP não detecta mutações *missense*, as quais provocam apenas a alteração de um resíduo de

aminoácido na sequência amonoacídica da proteína, não originando a truncagem da proteína. Assim, apesar de pelo menos 95% das mutações no gene APC originarem a truncagem da proteína<sup>19,20</sup>, o que assegura a sua detecção através da IVSP, há que considerar a hipótese de algumas das famílias analisadas terem uma mutação "missense". Deste modo, se após a análise de todos os exões do gene, não for identificada a mutação em algumas das famílias, terá que se utilizar outro método, como por exemplo o SSCP ou o DGGE, para analisar essas famílias.

Neste estudo, foram detectadas mutações no exão 15 em nove das 23 (39%) famílias analisadas. Esta percentagem é, no entanto, inferior ao que é geralmente encontrado nas séries estrangeiras (cerca de 70%), quer utilizando o método da IVSP ou outros<sup>20,21,23</sup>, o que sugere uma maior percentagem de mutações nos exões 1-14, nas famílias portuguesas, em relação ao descrito noutras populações, entre 16%<sup>20,24</sup> e 32%<sup>21</sup>. Por outro lado, esta observação pode resultar apenas de um problema de amostragem e não representar uma especificidade portuguesa. Outro factor que pode contribuir para esta diferença é a inclusão de duas famílias com fenótipo atenuado, o que não acontece geralmente nas outras séries. Como este fenótipo parece estar associado a mutações nos primeiros exões do gene APC, este facto contribui para descer a percentagem de famílias com mutação no exão 15.

Nas nove famílias a mutação foi encontrada na região 5' do exão 15 (dois primeiros fragmentos). Na região 3' (dois últimos fragmentos) não foram encontradas mutações, o que está de acordo com a raridade de mutações reportada nesta região<sup>18,21</sup>.

No que respeita à relação com o fenótipo, os dados da literatura sugerem que mutações localizadas na região 5' do exão 15 correspondem geralmente a formas graves de doença. De facto, na série analisada, todos os indivíduos com mutação na região 5' do exão 15 tinham formas clínicas graves, com exuberantes manifestações extra-cólicas, o que está de acordo com descrições prévias<sup>17</sup>. Por outro lado, as famílias com uma forma atenuada de PAFC não apresentaram mutações no exão 15, o que está de acordo com a associação destas formas clínicas a mutações nos primeiros exões do gene APC. A associação entre formas clínicas atenuadas e mutações nos primeiros exões pode parecer um pouco paradoxal, uma vez que deveriam originar proteínas extremamente pequenas e não funcionais. No entanto, estudos anteriores sugerem que nestas formas "frustres" de doença, associadas geralmente a mutações nos exões 3 e 4<sup>25</sup>,



poderiam ocorrer frequentemente fenómenos de *splicing* alternativo que dariam origem a deleções dos referidos exões já mutados. Esta hipótese é fundamentada pela ocorrência, em certos casos, de *splicing* alternativo que origina a deleção dos exões 1-4<sup>26</sup>. Deste modo, se os exões 3 e 4 estiverem mutados, a sua deleção origina uma proteína com alguns dos domínios de oligomerização e com o domínio de ligação às cateninas ainda intactos, a qual pode desempenhar uma função quase normal<sup>26</sup>. Tal não aconteceria se não houvesse deleção destes exões, pois provavelmente a mutação iria provocar a truncagem da proteína alguns pares de bases a jusante, eliminando assim domínios importantes para a função da proteína. Esta explicação parece, deste modo, justificar de um modo plausível a provável associação entre formas clínicas atenuadas e mutações nos primeiros exões.

Ainda em relação à possível correlação entre padrão de mutações e expressão fenotípica verificámos que dos 11 indivíduos que possuíam exame oftalmológico, 10 tinham simultaneamente HCEPR e mutação no exão 15. O mesmo acontecia com os 4 indivíduos com tumores desmóides incluídos na presente série. Estes resultados estão de acordo com descrições prévias<sup>27</sup>, segundo as quais indivíduos com mutações nos codões 463-1387, região que inclui os dois primeiros fragmentos do exão 15, apresentam tumores desmóides com alguma frequência e invariavelmente têm HCEPR, o que não acontece quando a mutação ocorre nas regiões anterior e posterior a estes codões, mais concretamente nos codões 136-302 e 1445-1578. Para justificar a expressão da HCEPR nos codões 463-1387 tem sido postulado que as proteínas truncadas nestes codões possam estabelecer, na retina, heterodímeros estáveis com a proteína normal, interferindo assim com a ligação normal às cateninas<sup>27</sup>. Por outro lado, proteínas truncadas mais pequenas (antes do codão 463) serão pouco estáveis e facilmente degradadas, não apresentando por isso consequências fenotípicas. Esta relação entre as manifestações extracólicas e o local da truncagem da proteína APC aponta para um papel específico da proteína APC nos diferentes tecidos.

No presente estudo verificámos que a IVSP permite o diagnóstico da PAFC em fase pré-sintomática e no limite, pode mesmo ser usada para diagnóstico pré-natal. Contudo, em resultado da probabilidade de expressão fenotípica só começar a subir a partir dos 12-14 anos, não se justifica, em geral, proceder a manobras de diagnóstico antes desta idade. As vantagens de seleccionar rigorosamente os descendentes que realmente estão afec-

tados, são por demais óbvias, dado que assim se restringe significativamente o universo dos descendentes a vigiar, evitando-se o incómodo físico e psicológico àqueles descendentes não portadores da mutação.

Assim, na série analisada, os 10 indivíduos com idade inferior a 30 anos, pertencentes a famílias com mutação no exão 15, mas que não herdaram a mutação, poderão assim ser dispensados do programa de vigilância anual a que estavam anteriormente sujeitos. Pudemos ainda confirmar que os 12 indivíduos que estavam na mesma situação mas que tinham idade superior a 30 anos e nos quais o diagnóstico de PAFC já era pouco provável, não terão herdado a mutação e por esse motivo não irão desenvolver quase seguramente PAFC.

Outra vantagem do diagnóstico pré-sintomático, por enquanto ainda teórica, é de estes doentes poderem beneficiar dos avanços na terapêutica farmacológica da PAFC<sup>28,29</sup>, por exemplo com o sulindac, a aspirina e o amido resistente. A administração profiláctica destas substâncias em indivíduos ainda saudáveis, mas que tenham herdado uma mutação no gene APC, poderá ter um efeito supressor no desenvolvimento do fenótipo. Levanta-se a hipótese de que esse efeito possa ser mais nítido se o tratamento for iniciado em idade jovem, antes do aparecimento das primeiras lesões. Em consequência deste programa, um dos dois jovens com diagnóstico genético de PAFC em fase pré-sintomática foi já incluído em programas de quimioprofilaxia com aspirina e amido resistente.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, o diagnóstico genético da PAFC por IVSP é exequível e possui uma elevada sensibilidade, para além de apresentar vantagens em relação a outras técnicas como a análise de *linkage* e o rastreio de mutações ao nível do DNA, por métodos como o SSCP e o DGGE. Entre estas vantagens contam-se uma maior rapidez, a detecção de primeiras mutações e o facto de detectar apenas mutações que provocam a alteração da proteína.

Deste modo, este estudo corrobora a noção de que a IVSP constitui a escolha de primeira linha para o diagnóstico genético da PAFC. Assim, neste estudo, a detecção da mutação em nove famílias tornou possível o diagnóstico genético para qualquer dos membros em risco nestas famílias, incluindo futuros descendentes.

Num futuro breve, a pesquisa de mutações nos exões 1-14, aumentará o número de famílias com diagnóstico genético disponível. Por outro lado, a pesquisa de mutações nestes exões, assim como a obtenção da localiza-

ção exacta das mutações através de sequenciação poderá levar ao estabelecimento de mais relações entre genótipo e fenótipo, que permitirão um maior esclarecimento sobre a função da proteína APC no processo de carcinogénese.

## BIBLIOGRAFIA

1. MIYOSHI Y, NAGASE H, ANDO H, *et al.*: Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet*, 1992, 1: 229-33.
2. POWELL S, ZILZ N, BEAZER-BARCLAY Y, *et al.*: APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 1992, 359: 235-7.
3. VOGELSTEIN B, FEARON E, HAMILTON S., *et al.*: Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med*, 1988, 319: 525-32.
4. HERRERA L, KAKATI S, GIBAS L, PIETRZAK E AND SANDBERG A: Brief clinical report: Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet*, 1986, 25:473-6.
5. BODMER W, BAILEY C, BODMER J, *et al.*: Localization of the gene for familial adenomatous polyposis on chromosome 5. *Nature*, 1987, 328: 614-16.
6. LEPPERT M, BURT R, HUGHES J, SAMOWITZ W, NAKAMURA Y, WOODWARD S, *et al.*: Genetic analysis of an inherited predisposition to colon cancer in a family with a variable number of adenomatous polyps. *N Engl J Med*, 1990, 322: 904-8.
7. GRODEN J, THLIVERIS A, SAMOWITZ W, CARLSON M, GELBERT L, ALBERTSEN H, *et al.*: Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell*, 1991, 66: 589-600.
8. JOSLYN G, CARLSON M, THLIVERIS A., ALBERTSEN H., GELBERT L., SAMOWITZ W., *et al.*: Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell*, 1991, 66: 601-13.
9. KINZLER K., NILBERT M., VOGELSTEIN B., BRYAN T., LEVY D., SMITH K., *et al.*: Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science*, 1991, 251: 1366-70.
10. NISHISHO I., NAKAMURA Y., MIYOSHI Y., MIKI Y., ANDO H., HORII A., *et al.*: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 1991, 253: 665-9.
11. RUBINFELD B., SOUZA B., ALBERT I., MÜLLER O., CHAMBERLAIN S., MAŞIARZ F., *et al.*: Association of the APC gene product with b-catenin. *Science*, 1993, 262: 1731-4.
12. SU L-K., VOGELSTEIN B. AND KINZLER K.: Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*, 1993, 262: 1734-6.
13. KEMLER R.: Classical cadherins. *Sem Cell Biol*, 1992, 3: 149-55.
14. NAGAFUCHI A., SHIRAYOSHI Y., OKAZAKI K., YASUDA K., AND TAKEICHI M.: Transformation of cell adhesion properties by exogenously introduced E-cadherin cDNA. *Nature*, 1987, 329: 341-3.
15. BAEG G., MATSUMINE A., KURODA T., BHATTACHARJEE R., MIYASHIRO I., TOYOSHIMA K., *et al.*: The tumor suppressor gene product APC blocks cell cycle progression from G0/G1 to S phase. *EMBO J*, 1995, 14: 5618-25.
16. SU L-K., JOHNSON K. A., SMITH K. J., HILL D. E., VOGELSTEIN B. AND KINZLER K.: Association between wild-type and mutant APC products. *Cancer Res*, 1993, 53: 2728-31.
17. CASPARI R., FRIEDL W., MANDL M., MÖSLEIN G., KADMON M., KNAPP M., *et al.*: Familial adenomatous polyposis: mutation at codon 1309 and early onset of colon cancer. *The Lancet*, 1994, 343: 629-32.
18. POWELL S., PETERSEN G., KRUSH A., BOOKER S., JEN J., GIARDELLO F., *et al.*: Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, 1993, 329: 1982-7.
19. FODDE R., VAN DER LUIJT R., WIJNEN J., TOPS C., VAN DER KLIFT H., VAN LEEUWEN-CORNELISSE I., *et al.*: Eight novel inactivating germ line mutations at the APC gene identified by denaturing gradient electrophoresis. *Genomics*, 1992, 13: 1162-8.
20. MIYOSHI Y., ANDO H., NAGASE H., NISHISHO I., HORII A., MIKI Y., *et al.*: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 4452-6.
21. MIYAKI M., KONISHI M., KIKUCHI-YANOSHITA R., ENOMOTO M., IGARI T., TANAKA K., *et al.*: Characteristics of somatic mutation of the adenomatous polyposis coli gene in colorectal tumors. *Cancer Res*, 1994, 54: 3011-20.
22. MILLER S., DYKES D. AND POLESKY H.: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16.
23. VAN DER LUIJT R., MEERA KHAN P., VASEN H., VAN LEEUWEN C., TOPS C., ROEST P., *et al.*: Rapid detection of translation-terminating mutations at the adenomatous polyposis coli (APC) gene by direct protein truncation test. *Genomics*, 1994, 20: 1-4.
24. OLSCHWANG S., LAURENT-PUIG P., GRODEN J., WHITE R. AND THOMAS G.: Germ-line mutations in the first 14 exons of the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Am J Hum Genet*, 1993, 52: 273-9.
25. SPIRIO L., OLSCHWANG S., GRODEN J., ROBERTSON M., SAMOWITZ W., JOSLYN G., *et al.*: Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell*, 1993, 75: 951-7.
26. SAMOWITZ W., THLIVERIS A., SPIRIO L. AND WHITE R.: Alternatively spliced adenomatous polyposis coli (APC) gene transcripts that delete exons mutated in attenuated APC. *Cancer Res*, 1995, 55: 3732-4.
27. CASPARI R., OLSCHWANG S., FRIEDL W., MANDL M., BOISSON C., BÖKER T., *et al.*: Familial adenomatous polyposis: desmoid tumors and lack of ophthalmic lesions (CHRPE) associated with APC mutations beyond codon 1444. *Hum Molec Genet*, 1995, 4: 337-40.
28. GIARDELLO F. M., HAMILTON S. R., KRUSH A. J., PIANTADOSI S., HYLAND L. M., CELANO P., *et al.*: Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*, 1993, 328: 1313-16.
29. LABAYLE D., FISHER D., VIELH P., DROUHIN F., PARIENTE A., BORIES C., *et al.*: Sulindac causes regression of rectal polyps in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology*, 1991, 101: 635-9.