



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

RAISSA COELHO ANDRADE

Caracterização molecular de pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*

Orientador: Prof. Dr. Fernando Regla Vargas

**RIO DE JANEIRO
2016**



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

RAISSA COELHO ANDRADE

Caracterização molecular de pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Câncer como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Regla Vargas

**RIO DE JANEIRO
2016**

A553c Andrade, Raissa Coelho.
Caracterização molecular de pacientes com suspeita clínica de síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like. / Raissa Coelho Andrade. – Rio de Janeiro: INCA, 2016.
201 f.: il.; tab.

Tese (Doutorado) - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Programa de Pós-graduação em Oncologia, 2016.

Orientador: Fernando Regla Vargas.

1. Síndrome de Li-Fraumeni. 2. Genes P53. 3. Neoplasias. 4. Mutação. I. Vargas, Fernando Regla (orient.). II. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. III. Título.

CDD 616.994



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

**INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER
Pós-Graduação em Oncologia**

RAISSA COELHO ANDRADE

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA
DE SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E LI-FRAUMENI *LIKE***

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Regla Vargas

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Profa. Dra. Teresa de Souza Fernandez Seixas - **Presidente**
Profa. Dra. Sima Esther Ferman
Prof. Dr. Pedro Hernan Cabello Acero
Profa. Dra. Tatiana de Almeida Simão
Profa. Dra. Leila Maria Cardão Chimelli – Suplente I
Profa. Dra. Flávia Martinez de Carvalho – Suplente II

**RIO DE JANEIRO
2016**

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos pacientes que lutam contra o câncer, e aos profissionais que tornam essa luta mais amena.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Fernando Regla Vargas, pelos ensinamentos compartilhados e pela confiança que depositou em mim;

Aos meus pais, por sempre acreditarem em mim e apoiarem a realização dos meus sonhos. Vocês são meu porto seguro mesmo distantes, e fazem parte de cada conquista minha;

Ao meu Amor, João, pelo apoio, carinho, dedicação e paciência em todas as etapas deste trabalho. Obrigada por estar comigo em todos os momentos. Com você, todo caminho se torna mais leve;

À minha tia Iracema Nascimento, pelo carinho, disponibilidade e palavras de motivação quando eu precisei;

Às médicas Anna Claudia Evangelista e Maria Angélica Lima, pela solicitude e pela orientação quanto aos dados de história familiar dos pacientes;

Aos amigos que a pós-graduação me deu a oportunidade de conhecer, em especial à Marion Amazonas, Hanna Soares, Leila Cabral, Rejane Lapagesse, Tatiana Vaz e Adriana Reis. Por tudo que aprendi com vocês e por terem sido meu apoio em incontáveis momentos, muito obrigada;

Aos demais amigos da Genética, pelos bons momentos compartilhados, por tornarem o ambiente de trabalho alegre, pelo aprendizado e solidariedade. Seria difícil citar todos os nomes, mas foram todos especiais de alguma forma durante esta etapa;

Ao Dr. Miguel Ângelo Martins Moreira, pela dedicação e solicitude com todos os alunos que passam pela Genética, e pela oportunidade que me foi dada de coordenar seu grupo no curso de verão do INCA;

Ao Dr. Héctor Seuànez Abreu, pela oportunidade de trabalhar na Divisão de Genética do INCA;

Ao técnico Cláudio Vieira, pelas risadas, ajuda e companheirismo no laboratório;

Às técnicas Kelly Souza, Renata Fragelli e Bruna Matta, pelo suporte para realização deste trabalho e pela gentileza;

À Dra. Carolina Furtado, por toda ajuda na realização dos experimentos de sequenciamento de nova geração; e ao Dr. Albert Menezes e ao MSc Ayslan Brant, pela orientação na análise dos dados;

Aos MSc Régis Costa e Priscila Sena, pela orientação na realização dos experimentos de MLPA;

Às Dras. Sabrina Helmold e Heloísa de Paula, pela ajuda na revisão do texto do artigo;

Ao Dr. Paulo Faria, pela contribuição na discussão de um caso clínico deste trabalho, e por disponibilizar imagens histopatológicas relacionadas a este caso;

Ao Dr. Pablo Lapunzina e Julian Nevado, do Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), pela colaboração na confirmação dos resultados de MLPA.

À equipe do arquivo médico do INCA, pela gentileza nas inúmeras vezes que precisei de ajuda para coletar dados de prontuários;

À equipe de pediatria do INCA, por sempre me receber bem e tirar dúvidas quando preciso;

Ao Rodrigo, Danielle e Andréia, pela paciência e disposição na secretaria do INCA;

Ao Ministério da Saúde, pelo apoio financeiro;

Aos membros da banca, pelo tempo e presença disponibilizados para contribuir com este trabalho;

Aos pacientes e familiares, por depositarem sua confiança em nós, e pela força e esperança ao lidar com o câncer, servindo como inspiração e motivação para nossos estudos.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE PACIENTES COM SUSPEITA CLÍNICA DE SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E LI-FRAUMENI *LIKE*

RESUMO

TESE DE DOUTORADO

Raissa Coelho Andrade

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e sua variante, Li-Fraumeni *like* (LFL), compõem uma condição clinicamente heterogênea de predisposição a cânceres diversos em idade precoce. O único gene conclusivamente associado à SLF/LFL é o supressor tumoral *TP53*. O estudo da SLF/LFL é importante por diversas razões: (1) o elevado risco de desenvolvimento de câncer em portadores de mutação em *TP53* torna essencial que esses indivíduos sejam identificados e recebam aconselhamento genético; (2) a epidemiologia da SLF/LFL no mundo ainda não está determinada, o que é importante para o desenvolvimento de estratégias de manejo dos pacientes, especialmente no caso do Brasil, onde uma mutação fundadora em *TP53*, a R337H, mostra-se muito frequente em alguns Estados; (3) a SLF/LFL é um modelo para estudo da predisposição genética ao câncer, visto que sua heterogeneidade suscita dúvidas, como quais fatores modificam a penetrância da síndrome, e quais outros genes podem estar associados a ela nos pacientes que não apresentam mutação em *TP53*. A finalidade deste estudo foi realizar a caracterização fenotípica e molecular de pacientes com suspeita clínica da SLF/LFL, além de investigar a frequência da mutação fundadora R337H em diferentes coortes de pacientes oncológicos. Cinquenta e oito pacientes com suspeita clínica da SLF/LFL foram investigados quanto à presença de mutações em *TP53* por sequenciamento direto e MLPA. O gene *CDKN1A*, mediador de *TP53* na regulação do ciclo celular, também foi investigado por sequenciamento direto. Adicionalmente, três coortes de pacientes acompanhados pelo aconselhamento genético do INCA foram investigadas quanto à presença da mutação R337H de *TP53*: 46 pacientes com tumor de Wilms, 81 pacientes com retinoblastoma e 126 pacientes com suspeita clínica de câncer de mama e ovário hereditários. Para a investigação de novos genes associados à síndrome, onze pacientes sem mutações detectadas em *TP53* foram selecionados para a investigação de 124 genes associados a câncer através de sequenciamento de nova geração. Dentre os 58 probandos com suspeita clínica da SLF/LFL, 39 pertenciam a famílias com critérios clínicos estabelecidos para a síndrome (grupo 1), e 19 pacientes pertenciam a famílias sem estes critérios (grupo 2), mas que apresentavam cânceres típicos da síndrome. Foi observada uma frequência de mutações patogênicas em *TP53* de 20,5% (8/39) no grupo 1 (seis mutações *missense* e duas grandes deleções). Os portadores dessas mutações apresentaram uma sobrevida global em 5 anos 35,7% menor que a de não-portadores ($p=0,02$). Apenas uma mutação em *TP53* foi detectada no grupo 2 (5,3%), em uma paciente com carcinoma fibrolamelar. Não foram encontradas mutações em *CDKN1A*. Entre todos os pacientes investigados, a mutação R337H foi encontrada em apenas um, com carcinoma adrenocortical, do grupo 1. Na análise por sequenciamento de nova geração, foram detectadas 34 mutações potencialmente patogênicas em 21 genes. Quatro delas ocorreram em genes associados a síndromes de câncer hereditário com fenótipos similares aos da SLF/LFL: uma em *BRCA1* (F1761S) e três em *ATM* (S49C, C532Y, e a mutação nova E2087A). Mutações novas foram observadas nos genes *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* e *PTPRC*. Estudos adicionais são necessários para confirmar o impacto clínico dessas mutações.



**Ministério da Saúde
Instituto Nacional de Câncer
Coordenação de Pós-graduação**

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER

MOLECULAR CHARACTERIZATION OF PATIENTS WITH CLINICAL SUSPICION OF LI -FRAUMENI AND LI-FRAUMENI LIKE SYNDROMES

ABSTRACT

TESE DE DOUTORADO

Raissa Coelho Andrade

Li-Fraumeni syndrome (LFS) and its variant, Li-Fraumeni like (LFL), comprise a clinically heterogeneous condition of predisposition to various cancers at an early age. The only conclusively gene associated to LFS/LFL is the tumor suppressor *TP53*. The study of LFS/LFL is important for several reasons: (1) the high risk of cancer development in patients with *TP53* mutation makes it essential that these individuals be identified and receive genetic counseling; (2) the worldwide epidemiology of LFS/LFL is not yet determined, which is important for the development of management strategies for patients, especially in the case of Brazil, where a founder mutation in *TP53*, the R337H mutation, has shown to be very frequent in some States; (3) LFS/LFL is a model for the study of genetic predisposition to cancer, since its heterogeneity raises questions such as what factors modify the penetrance of the syndrome, and what other genes may be associated with it in patients without mutations in *TP53*. The purpose of this study was to perform the phenotypic and molecular characterization of patients with clinical suspicion of LFS/LFL, and to investigate the frequency of the R337H founder mutation in different cohorts of cancer patients. Fifty-eight patients with clinical suspicion of LFS/LFL were investigated for the presence of mutations in *TP53* by direct sequencing and MLPA. The *CDKN1A* gene, *TP53* mediator in cell cycle regulation, was also investigated by direct sequencing. Additionally, three cohorts of patients followed by the genetic counseling clinic at INCA were investigated for the presence of the *TP53* R337H mutation: 46 patients with Wilms' tumor, 81 patients with retinoblastoma and 126 patients with suspicion of hereditary breast and ovarian cancer. For the investigation of new genes associated with the syndrome, eleven patients with no mutations detected in *TP53* were selected for the investigation of 124 genes associated with cancer by next generation sequencing. Among the 58 probands with clinical suspicion of LFS/LFL, 39 belonged to families with clinical criteria established for the syndrome (group 1) and 19 patients belonged to families without these criteria (group 2), but which had core cancers of the syndrome. The frequency of pathogenic mutations in *TP53* was 20.5% (8/39) in Group 1 (six missense mutations and two gross deletions). The carriers of these mutations showed a global 5-year survival 35.7% lower than non-carriers ($p=0.02$). Only one *TP53* mutation was detected in Group 2 (5.3%), in a patient with fibrolamellar carcinoma. No mutations were found in *CDKN1A*. Among all the individuals studied, the R337H mutation was found in only one patient of group 1, who had an adrenocortical carcinoma. In the analysis by next generation sequencing, thirty-four potentially pathogenic mutations in 21 genes were identified. Four of them occurred in genes associated with hereditary cancer syndromes with phenotypes similar to the LFS/LFL: one in *BRCA1* (F1761S) and three in *ATM* (S49C, C532Y, and the novel E2087A mutation). Novel mutations were observed in *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* and *PTPRC*. Additional studies are needed to confirm the clinical impact of these variants.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais da Síndrome de Li Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni <i>like</i> (LFL)	1
1.2 Histórico da SLF/LFL: entendendo a definição dos critérios clínicos	1
1.3 O gene e a proteína associados à SLF/LFL: <i>TP53</i> e <i>p53</i>	6
1.3.1 Histórico	6
1.3.2 Estrutura	7
1.3.3 Vias e funções da proteína <i>p53</i>	7
1.4 Mutações em <i>TP53</i> e o câncer	11
1.4.1 Mutações somáticas	12
1.4.2 Mutações germinativas	13
1.5 O acompanhamento clínico e a terapêutica na SLF/LFL	17
1.6 Epidemiologia da SLF/LFL	20
1.7 O envolvimento de outros genes na SLF/LFL.....	22
2 Objetivos	25
2.1 Objetivo Geral:	25
2.2 Objetivos específicos	25
3 Material e Métodos.....	26
3.1 Pacientes	26
3.2 Extração de DNA de sangue periférico	27
3.3 Extração de DNA tumoral	27
3.4 Amplificação das regiões de interesse de <i>TP53</i> , <i>CDKN1A</i> e <i>MDM2</i>	28
3.5 Sequenciamento direto e análise dos fragmentos	29
3.6 Investigação de rearranjos por MLPA	30
3.7 Análises estatísticas	30
3.8 Investigação da frequência da mutação R337H de <i>TP53</i> em coortes de indivíduos acompanhados pelo Aconselhamento Genético do INCA.....	31
3.9 Investigação de alterações em genes associados a câncer por Sequenciamento de nova geração	31
3.9.1 Enriquecimento das regiões de interesse por PCR	32
3.9.2 Preparo das bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina.....	32
3.9.3 Análise das sequências	33
3.9.4 Seleção das mutações potencialmente patogênicas.....	33
3.9.5 Validação por sequenciamento de Sanger das mutações encontradas por NGS	34
3.10 Resumo das principais etapas do estudo.....	35
4 Resultados	36
4.1 Caracterização clínica dos probandos e familiares de probandos do Grupo 1 (SLF/LFL).....	37
4.2 Detecção de mutações germinativas nos probandos do Grupo 1 (SLF/LFL).....	39
4.2.1 Sequenciamento de <i>TP53</i>	39
4.2.2 Sequenciamento de <i>CDKN1A</i>	40
4.2.3 Análise por MLPA	40
4.3 Descrição clínica dos probandos com mutação do Grupo 1 e suas respectivas famílias.....	42
4.3.1 Probando #12.....	42
4.3.2 Probando #25	42
4.3.3 Probanda #28	43
4.3.4 Probando #35.....	44
4.3.5 Probando #36.....	44
4.3.6 Probando #49.....	45
4.3.7 Probando #50.....	46
4.3.8 Probando #53.....	47

4.4	Análise dos critérios clínicos em relação aos achados moleculares em <i>TP53</i>	47
4.5	Sobrevida global em 60 meses dos probandos do Grupo 1	52
4.6	Caracterização clínica do Grupo 2 (suspeita de SLF/LFL)	52
4.7	Detecção de mutações germinativas no Grupo 2.....	56
4.7.1	Sequenciamento de <i>TP53</i>	56
4.7.2	Sequenciamento de <i>CDKN1A</i>	58
4.7.3	Análise por MLPA	58
4.8	Análise conjunta dos Grupos 1 (SLF/LFL) e 2 (LFL-suspeita).....	58
4.9	Polimorfismos relacionados à via de p53	59
4.10	Frequência da mutação <i>TP53</i> R337H em coortes de câncer do estado do Rio de Janeiro.....	61
4.11	Investigação de mutações por sequenciamento de nova geração	64
4.12	Descrição clínica dos probandos investigados por sequenciamento de nova geração e suas respectivas famílias	71
4.12.1	Probanda #01	71
4.12.2	Probanda #06	72
4.12.3	Probanda #09	73
4.12.4	Probando #10.....	74
4.12.5	Probanda #15	74
4.12.6	Probanda #17	75
4.12.7	Probanda #20	76
4.12.8	Probanda #33	76
4.12.9	Probanda #41	77
4.12.10	Probanda #51.....	77
4.12.11	Probando #65.....	78
5	Discussão.....	79
5.1	Caracterização clínica dos indivíduos incluídos no estudo	79
5.2	Detecção de mutações germinativas em <i>TP53</i>	80
5.2.1	Grupo 1	80
5.2.2	Grupo 2	83
5.3	Investigação de mutações em <i>CDKN1A</i>	84
5.4	Comparação entre famílias com mutação e sem mutação em <i>TP53</i>	85
5.5	Critérios clínicos utilizados na investigação de mutações em <i>TP53</i>	89
5.6	Achados de polimorfismos da via de p53	90
5.7	Frequência da mutação R337H no Rio de Janeiro.....	91
5.8	Investigação por sequenciamento de nova geração	95
5.8.1	Mutações detectadas em <i>BRCA1</i> , <i>BRCA2</i> e <i>ATM</i>	95
5.8.2	Mutações novas detectadas: genes <i>SETD2</i> , <i>PIK3C2A</i> , <i>SMO</i> e <i>PTPRC</i>	97
5.8.3	Demais mutações encontradas neste estudo e interpretação geral dos resultados	99
5.9	Aconselhamento genético no Brasil e acompanhamento clínico de pacientes com suspeita de SLF/LFL.....	101
6	Conclusões	105
7	Referências	106
	ANEXOS.....	130
	Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para maiores de 18 anos	130
	Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido para responsável por menor de 18 anos	135
	Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido para familiares de pacientes	140
	Anexo 5 – Lista de 124 genes associados a câncer incluídos no painel NGHS-501Z (Qiagen®).....	146
	Anexo 6 – Protocolo de preparo das bibliotecas para sequenciamento de nova geração ...	149

Anexo 7 – Histopatologia dos tumores dos 58 probandos com suspeita clínica da SLF/LFL	152
Anexo 8 – Heredogramas dos 58 probandos incluídos no estudo	155
Anexo 9 – Artigo – Associação de polimorfismos de <i>TP53</i> com o risco de tumor de Wilms	161
Anexo 10 – Artigo / manuscritos	167

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Características dos 58 probandos com suspeita clínica de SLF/LFL	36
Tabela 4.2. Caracterização epidemiológica dos probandos LFS/LFL e suas famílias.....	37
Tabela 4.3. Espectro tumoral do Grupo 1 (SLF/LFL), incluindo tumores de probandos e de seus familiares	39
Tabela 4.4. Mutações patogênicas detectadas em <i>TP53</i> no Grupo 1 e características clínicas de seus portadores	41
Tabela 4.5. Impacto funcional das alterações patogênicas em <i>TP53</i> encontradas no Grupo 1 (LFS/LFL).....	41
Tabela 4.6. Pacientes do Grupo 1 com e sem mutação detectável em <i>TP53</i> , em relação aos critérios clínicos da síndrome de Li-Fraumeni.....	48
Tabela 4.7. Características clínicas dos 31 probandos do Grupo 1 (SLF/LFL) sem mutação patogênica detectada em <i>TP53</i>	50
Tabela 4.8. Caracterização epidemiológica dos probandos do Grupo 2 e suas famílias.....	53
Tabela 4.9. Espectro tumoral das famílias do Grupo 2, incluindo os tumores dos probandos e de seus familiares	54
Tabela 4.10. Características clínicas dos probandos do Grupo 2.....	55
Tabela 4.11. Eficiência dos critérios clínicos utilizados neste estudo em relação à detecção de mutações em <i>TP53</i>	58
Tabela 4.12. Espectro tumoral dos probandos com mutação em <i>TP53</i> detectada e suas respectivas famílias.....	59
Tabela 4.13. Distribuição genotípica de polimorfismos da via de p53 em pacientes e controles.	60
Tabela 4.14. Dados clínicos de pacientes acompanhados pelo aconselhamento genético do INCA, rastreados para a mutação R337H de <i>TP53</i>	62
Tabela 4.15. Tumores no grupo de 11 pacientes submetidos à análise por sequenciamento de nova geração	65
Tabela 4.16. Mensurações e cobertura do sequenciamento de nova geração	65

LISTA DE QUADROS

Quadro 1.1. Critérios para o diagnóstico clínico da SLF/LFL	5
Quadro 1.2. Recomendações da NCCN para o rastreo de indivíduos com mutações germinativas em <i>TP53</i>	18
Quadro 1.3. Programa de vigilância sugerido por MCBRIDE et al. (2014) para indivíduos com mutação germinativa em <i>TP53</i>	19
Quadro 3.1. Iniciadores intrônicos utilizados na amplificação dos éxons 2 a 11 do gene <i>TP53</i>	28
Quadro 3.2. Iniciadores utilizados para amplificação dos éxons 2-3 de <i>CDKN1A</i> e da região 5'UTR de <i>MDM2</i>	28
Quadro 3.3. Condições de amplificação por PCR.....	29
Quadro 3.4. Iniciadores utilizados para a validação das mutações prioritárias encontradas por NGS.....	34
Quadro 4.1. Frequência da mutação R337H em diferentes coortes de tumores em estudos brasileiros.	63
Quadro 4.2. Mutações potencialmente patogênicas encontradas em onze pacientes SLF/LFL.....	67
Quadro 4.3. Genes com mutações potencialmente patogênicas e suas funções.....	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Gene <i>TP53</i> e proteína p53	7
Figura 1.2. A via de p53	9
Figura 1.3. Mutações somáticas e germinativas relatadas na base de dados IARC <i>TP53</i> versão R18.	14
Figura 1.4. Distribuição de famílias com mutação germinativa detectada em <i>TP53</i>	22
Figura 3.1. Fluxograma com as principais etapas deste trabalho	35
Figura 4.1. Heredograma da família do probando #12.....	42
Figura 4.2. Heredograma da família do probando #25	43
Figura 4.3. Heredograma da família da probanda #28	43
Figura 4.4. Heredograma da família do probando #35	44
Figura 4.5. Heredograma da família da probanda #36	45
Figura 4.6. Heredograma da família do probando #49	46
Figura 4.7. Heredograma da família do probando #50	46
Figura 4.8. Heredograma da família da probanda #53	47
Figura 4.9. Porcentagens de diferentes tipos de tumores entre famílias de probandos com mutação e sem mutação detectada em <i>TP53</i>	49
Figura 4.10. Sobrevida global em 60 meses de pacientes do grupo 1 (SLF/LFL) com e sem mutação em <i>TP53</i>	52
Figura 4.11. Coloração H&E do tumor da paciente #11	56
Figura 4.12. Heredograma da família da probanda #11, portadora da mutação R156H.....	57
Figura 4.13. Coloração H&E do tumor da paciente #11	57
Figura 4.14. Frequência da mutação R337H em diferentes regiões.....	64
Figura 4.15. Clustergrama demonstrando as principais vias de sinalização representadas dentro do grupo de 21 genes com mutações potencialmente patogênicas.	68
Figura 4.16. Eletroferogramas da validação por sequenciamento de Sanger.....	71
Figura 4.17. Heredograma da família da probanda #01	72
Figura 4.18. Heredograma da família da probanda #06	73
Figura 4.19. Heredograma da família da probanda #09	73
Figura 4.20. Heredograma da família do probando #10.....	74
Figura 4.21. Heredograma da família da probanda #15	75
Figura 4.22. Heredograma da família da probanda #17	75
Figura 4.23. Heredograma da família da probanda #20	76
Figura 4.24. Heredograma da família da probanda #33	76
Figura 4.25. Heredograma da família da probanda #41	77
Figura 4.26. Heredograma da família da probanda #51	78
Figura 4.27. Heredograma da família do probando #65.....	78

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μg: Micrograma
μL: Microlitro
μM: Micromolar
3'UTR: Região 3' não traduzida do gene
5'UTR: Região 5' não traduzida do gene
ADP: Difosfato de adenosina
ADR: Carcinoma adrenocortical
ALK: Gene *anaplastic lymphoma kinase*
AMP: Monofosfato de adenosina
ARFp14: proteína matriz de leitura alternativa 14 do gene *CDKN2A*
ATM: Gene ataxia-telangiectasia
ATR: Gene *ataxia telangiectasia and Rad3-related*
BARD1: Gene *BRCA1 associated RING domain 1*
BAX: Gene *BCL2 associated X*
BBC3 (ou *PUMA*): Gene *BCL2 binding component 3*
BCL10: Gene *B-cell lymphoma 10*
Bcl2: Proteína *B-cell lymphoma 2*
Bcl-xL: Proteína *B-cell lymphoma-extra large*
BIC: *Breast Cancer Information Core*
BIRC5: Gene *baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5*
BNT: Banco Nacional de Tumores
BRCA1: Gene *breast cancer 1*
BRCA2: Gene *breast cancer 2*
BRCT: Domínio C-terminal da proteína BRCA1
Ca: Câncer
CCB: Carcinoma de células basais
CCR: Câncer colorretal
CS: Condrossarcoma
CDK: Cinase dependente de ciclina
CDK4: Gene da cinase dependente de ciclina 4
CDKN1A (*p21*): Gene inibidor de cinase dependente de ciclina 1A
CDKN2A: Gene inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CEC: Carcinoma de células escamosas
CFL: Carcinoma fibrolamelar
CHC: Carcinoma hepatocelular
CHEK1: Gene *checkpoint kinase 1*
CHEK2: Gene *checkpoint kinase 2*
ClinVar: *Clinical Variants database*
CMV: Citomegalovírus
CNVs: Variações de número de cópias (*copy number variation*)
CpG: Sítios de dinucleotídeos citosina-guanina
CREBBP: Gene *CREB-binding protein*
CTNNB1: Gene *catenin beta 1*

D-CK4: Complexo das proteínas ciclina D e cinase dependente de ciclina 4
 DDB2: Gene *DNA damage-binding 2*
 DDIT4: Gene *DNA damage inducible transcript 4*
 DFNAJB1: Gene *DNAJ heat shock protein Family member B1*
 DFSP: Dermatofibrossarcoma *protuberans*
 DNA: Ácido Desoxirribonucleico
 DP1: Proteína *dimerization partner 1*
 DPP4: Gene *dipeptidyl peptidase 4*
 E2F: Fator de transcrição E2
 EBV: Vírus Epstein-Barr
 EDTA: Ácido etilenodiamino tetra-acético
 EGFR: Gene do receptor do fator de crescimento epidérmico
 EP: Ependimoma
 EP300: Gene *E1A binding protein p300*
 EWS: Sarcoma de Ewing
 FDG-PET/CT: tomografia computadorizada por emissão de *pósitrons com 18 fluordesoxiglicose*
 FLT4 (ou VEGFR3): Gene *fms-related tyrosine kinase 4* (ou *vascular endothelial growth factor receptor 3*)
 FOXM1: Gene *forkhead box M1*
 G1: Fase *Gap 1* do ciclo Celular
 GADD45: Gene *growth arrest and DNA damage-inducible 45*
 HAT: Histona acetiltransferase
 HBOC: Câncer de mama e ovário hereditários (*Hereditary breast and ovarian cancer*)
 HBV: Vírus da hepatite B
 HCV: Vírus da hepatite C
 HDAC: Histona deacetilase
 HER-2: Gene *human epidermal growth factor receptor 2*
 HF: História familiar
 HGMD: *Human Gene Mutation Database*
 Hi-Di: altamente deionizada (*highly deionized*)
 HIV-1/2: Vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2
 HTLV-I/II: vírus T-linfotrópico humano tipos I e II
 IARC: *International Agency for Research on Cancer*
 IGF-2: Gene *insulin-like growth factor 2*
 IGF2R: Gene *insulin-like growth factor 2 receptor*
 INCA: Instituto Nacional de Câncer
 Kb: Quilobases
 KDa: Quilodalton
 KDR (ou VEGFR2): Gene *kinase insert domain receptor* (ou *vascular endothelial growth factor receptor 2*)
 LFL: Síndrome de Li-Fraumeni *like*
 LFL-B: Critério Li-Fraumeni like - Birch
 LFL-C: Critério Li-Fraumeni like - Chompret
 LFL-E: Critério Li-Fraumeni like - Eeles
 LiFE: *Li-Fraumeni Exploration Consortium*

LLA: Leucemia linfóide aguda
LMS: Leiomiossarcoma
LNH: Linfoma não Hodgkin
LOVD: *Leiden Open Variation Database*
LRP6: Gene *LDL receptor related protein 6*
LS: Lipossarcoma
MB: Meduloblastoma
MDM2: Gene *murine double minute 2*
MDM4: Gene *murine double minute 4*
MEL: Melanoma
MEN1: Gene *menin 1*
Min: Minutos
MIR26A2: Gene *microRNA 26a-2*
mL: Mililitro
MLPA: Amplificação *multiplex* de sondas dependente de ligação (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*)
mM: Milimolar
MNPs: *Multiple nucleotide polymorphisms* – polimorfismos de nucleotídeos múltiplos
mRNA: Ácido Ribonucleico Mensageiro
mTOR: Gene *mechanistic target of rapamycin*
MYC: Gene *Myelocytomatosis oncogene*
NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*
NF: Neurofibroma
NF1: Gene *neurofibrin 1*
NFKB1A: Gene *nuclear factor kappa B subunit 1A*
ng: Nanograma
NOS1: Gene *nitric oxide synthase 1*
°C: Graus Celsius
OLG: Oligodendroglioma
OMIM: *Online Mendelian Inheritance in Men*
OS: Osteossarcoma
p53: *protein 53*
PARP4: Gene *poly (ADP-ribose) polymerase 4*
PAX5: Gene *paired-box 5*
Pb: Pares de bases
PCR: *Polimerase chain reaction* – Reação em cadeia da polimerase
PDGFRA: Gene *platelet-derived growth factor receptor alpha*
PEX4: polimorfismo no éxon 4 de *TP53* (rs1042522)
pH: potencial hidrogeniônico
PI3: Fosfatidilinositol 3
PIK3C2A: Gene *phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase catalytic subunit type 2 alpha*
PIK3CA: Gene *phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha*
PIN2: polimorfismo no íntron 2 de *TP53* (rs1642785)
PIN3: polimorfismo no íntron 3 de *TP53* (rs17878362)
pKa: Constante de dissociação
pMol: Picomolar

POT1: Gene *protection of telomeres 1*
PRKACA: Gene *protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha*
PTCH: Gene *patched*
PTEN: Gene *phosphatase and tensin homolog*
PTPRC (ou *CD45*): Gene *protein tyrosine phosphatase receptor type C*
RAD51: Gene *RAD51 recombinase*
RAS: Gene *Rat sarcoma oncogene*
RBI: Gene *retinoblastoma 1*
RET: Gene *Rearranged during transfection proto-oncogene*
RGC: Gene *regulator of cell cycle*
RM: Ressonância Magnética
RMS: Rabdomiossarcoma
RNA: Ácido ribonucleico
ROS1: Gene *Tyrosine-protein kinase ROS proto-oncogene*
rpm: Rotações por minuto
S: fase S do ciclo celular
SDS: Dodecil sulfato de sódio
SETD2: Gene *SET domain containing 2*
SLF: Síndrome de Li-Fraumeni
SMO: Gene *smoothed, frizzled class receptor*
SNC: Sistema nervoso central
SNPs: *Single nucleotide polymorphisms* – polimorfismos de nucleotídeo único
SPM: Sarcoma de partes moles
SS: Sinoviossarcoma
SV-40: *simian virus 40*
TGF-B: Gene *transforming growth factor beta 1*
TP53: Gene *tumor protein 53*
TP63: Gene *tumor protein 63*
TP73: Gene *tumor protein 73*
TRIM22: Gene *tripartite motif containing 22*
Tris-HCl: Cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano
TSHR: Gene *thyroid stimulating hormone receptor*
TW: Tumor de Wilms
UV: Radiação ultravioleta
VEGF: Gene *vascular endothelial growth factor*
VEGFR: Gene *vascular endothelial growth fator receptor*
VPN: Valor preditivo negativo
VPP: Valor preditivo positivo
WTX: Gene *Wilms tumor on X chromosome* (ou *APC membrane recruitment protein 1*)

1. Introdução

1.1 Aspectos gerais da Síndrome de Li Fraumeni (SLF) e Li-Fraumeni like (LFL)

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma condição autossômica dominante de predisposição a diversos tumores malignos em idade precoce. Os tumores mais característicos da SLF são: osteossarcomas, sarcomas de partes moles, câncer de mama, tumores de sistema nervoso central, tumores adrenocorticais e leucemias. Esses são conhecidos como *core cancers*, ou “tumores típicos” da SLF. Entretanto, diversas outras neoplasias também ocorrem em excesso nos indivíduos afetados (LI et al., 1988). A SLF está associada a mutações germinativas no gene *TP53* (MALKIN et al., 1990), que podem conferir um risco vital de desenvolvimento de câncer de até 73% em homens e aproximadamente 100% em mulheres (CHOMPRET et al., 2000).

Os critérios clássicos para o diagnóstico clínico da síndrome incluem pelo menos três casos de câncer entre familiares relacionados em 1º ou 2º grau, sendo pelo menos um desses cânceres um sarcoma antes dos 45 anos de idade (LI et al., 1988). Fenótipos mais brandos da síndrome, isto é, com menos casos de câncer na família e/ou diagnóstico de câncer em idades mais avançadas também foram associados a mutações germinativas em *TP53*. Dessa forma, a caracterização clínica da síndrome vem sofrendo modificações desde sua primeira descrição (BIRCH et al., 1994; EELES, 1995; TINAT et al., 2009). Esses fenótipos “não clássicos”, ou “variantes” da SLF ficaram conhecidos como síndrome de Li-Fraumeni *like* (LFL). As alterações genéticas relacionadas aos pacientes com características clínicas da SLF/LFL que não apresentam mutação identificável em *TP53* ainda são desconhecidas. A frequência da SLF/LFL no mundo ainda não foi determinada, e os fatores moleculares e ambientais que influenciam na sua variabilidade de fenótipos ainda são pouco compreendidos.

1.2 Histórico da SLF/LFL: entendendo a definição dos critérios clínicos

A primeira descrição da Síndrome de Li-Fraumeni data de 1969. Federick Li e Joseph Fraumeni conduziram um estudo epidemiológico nos EUA para investigar fatores associados ao desenvolvimento de rhabdomyosarcoma infantil. Ao analisarem certidões de óbito e/ou prontuários médicos de um total de 648 crianças acometidas com essa doença, os pesquisadores se depararam com um padrão peculiar de ocorrência de tumores em cinco famílias. Três crianças tinham irmãos também acometidos com sarcomas de partes moles, e outras duas tinham primos em primeiro grau com essa doença. Os familiares dessas crianças exibiam uma alta frequência de diversos tumores: 31 indivíduos dessas famílias foram acometidos com câncer, sendo os sarcomas de partes moles e câncer de mama os mais

comuns, mas também haviam casos de câncer de pâncreas, leucemia, câncer de pele, câncer de pulmão, câncer de tireóide e do sistema nervoso central (LI; FRAUMENI, 1969b).

Os achados de LI e FRAUMENI foram publicados em dois artigos no mesmo ano. No primeiro deles, os autores caracterizaram com maiores detalhes quatro dessas famílias, mostrando a ocorrência dos tumores em idade mais precoce que o esperado para a população geral, e sugeriram a existência de uma nova síndrome de câncer familiar (LI; FRAUMENI, 1969a). O acompanhamento dessas famílias por doze anos mostrou a ocorrência de 16 novos tumores em 10 indivíduos, enquanto o número de casos que seria esperado ao acaso era de apenas 0,5. Este estudo reforçou o fenótipo diferenciado da SLF em relação a outras síndromes de câncer hereditário já conhecidas, e a importância do acompanhamento clínico dessas famílias. Também foi sugerido que fatores ambientais, como exposição ao cigarro e à radiação ionizante, pudessem influenciar no espectro tumoral desses indivíduos (LI; FRAUMENI, 1982).

A partir dos relatos de outras famílias exibindo fenótipos tumorais similares, alguns autores inicialmente se referiram à síndrome como SBLA. Essa sigla surgiu devido ao espectro tumoral relatado até aquele momento na síndrome, que incluía principalmente: Sarcomas, cânceres de mama e cerebral (do inglês *Breast and Brain cancers*), leucemias, câncer de laringe e câncer de pulmão (do inglês *Leukemia, Larynx and Lung cancers*), e carcinoma Adrenocortical (LYNCH et al., 1978; LYNCH; GUIRGIS, 1979; HARTLEY et al., 1987a).

LI e colaboradores (1988), a fim de evitar a inclusão de fenocópias (isto é, casos de câncer que não estivessem associados a uma herança genética), propuseram os seguintes critérios de seleção de famílias para uma análise mais precisa da síndrome: (1) um probando com sarcoma antes dos 45 anos e; (2) um familiar de primeiro grau com câncer antes dos 45 anos e; (3) outro familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 45 anos ou com sarcoma em qualquer idade.

Utilizando esses critérios, os autores fizeram uma análise de 151 indivíduos com câncer, entre 24 famílias, e comprovaram as principais características da síndrome: um padrão autossômico dominante de herança, e susceptibilidade a diversos tumores em idade jovem, com predominância de sarcomas de partes moles, osteossarcoma e câncer de mama, além de um excesso de tumores de sistema nervoso central, leucemias e carcinoma adrenocortical, em relação à população geral. Esses critérios de seleção compuseram o primeiro diagnóstico clínico desenvolvido para a síndrome, o critério clássico SLF (Quadro 1.1) (LI et al., 1988).

Embora o gene associado à síndrome ainda não estivesse determinado, já era conhecida a relação dos genes supressores tumorais com o câncer hereditário (MALKIN et

al., 1990; SRIVASTAVA et al., 1990). Supressores tumorais são genes responsáveis pela regulação negativa da divisão celular em resposta a situações que possam comprometer a integridade do DNA. Quando ocorre a perda da função desses genes, essa regulação é comprometida, o que cria uma circunstância facilitadora para o desenvolvimento de tumores. O conceito de genes supressores tumorais surgiu através dos estudos epidemiológicos de KNUDSON (1971), que formulou a hipótese dos dois *hits*, isto é, dois eventos mutacionais necessários para inativar as duas cópias de um supressor tumoral, permitindo que a transformação maligna ocorra. Dessa forma, os indivíduos que herdaram uma cópia mutada de um gene supressor tumoral teriam um risco superior para o desenvolvimento de tumores em idade jovem, pois necessitariam de apenas uma mutação adicional, na cópia normal do gene, para que aquele supressor tumoral perdesse totalmente sua função.

O gene *TP53* foi identificado como um supressor tumoral por volta de 1989 (FINLAY; HINDS; LEVINE, 1989). Mutações inativadoras nesse gene estavam presentes em diversos tipos de tumor (NIGRO et al., 1989). Dessa forma, ele parecia um candidato plausível para a predisposição ao câncer hereditário na SLF. Um ano depois, dois grupos de pesquisa encontraram mutações germinativas em *TP53* em um total de seis famílias com critérios para a SLF (MALKIN et al., 1990; SRIVASTAVA et al., 1990).

À medida que mutações germinativas em *TP53* foram investigadas em grupos maiores de pacientes, BIRCH e colaboradores (1994) observaram que menos da metade das famílias que apresentavam essas mutações preenchia o critério clássico da SLF. Desse modo, os autores propuseram um critério clínico menos restritivo para a síndrome (Quadro 1.1), sugerindo que os fenótipos das famílias com mutações em *TP53* eram mais abrangentes do que anteriormente proposto. Os critérios “não clássicos” para a SLF ficaram conhecidos como formas variantes da Síndrome de Li-Fraumeni, ou Li-Fraumeni *like* (LFL).

Além dos *core cancers* (tumores típicos) da síndrome, alguns estudos haviam evidenciado um excesso significativo de melanomas, cânceres de próstata e de pâncreas nas famílias com a SLF (HARTLEY et al., 1987b; STRONG; STINE; NORSTED, 1987). A inclusão desses tumores caracterizava o espectro tumoral “estendido” da síndrome. Dessa forma, EELES (1995) propôs uma definição ainda mais abrangente, incluindo famílias com dois tumores do espectro estendido da síndrome, em indivíduos relacionados em primeiro ou segundo grau, em qualquer idade (Quadro 1.1).

CHOMPRET e colaboradores (2000) fizeram uma ampla investigação em *TP53* em 268 crianças com câncer que tivessem pelo menos um familiar próximo afetado por câncer antes dos 46 anos de idade, ou afetado por múltiplos tumores primários em qualquer idade. A partir dos fenótipos das famílias com mutações detectadas, os autores desenvolveram os

critérios de Chompret, que teriam melhor custo/benefício em relação aos outros critérios, considerando a sensibilidade e o valor preditivo positivo na detecção de mutações em *TP53* (CHOMPRET et al., 2001). O principal diferencial dos critérios de Chompret foi a indicação do teste molecular para probandos com determinadas histórias individuais de câncer que por si só já representavam uma elevada chance de associação com uma mutação em *TP53*, independente desses probandos possuírem ou não familiares afetados com câncer. Investigações posteriores levaram a um aprimoramento deste critério, substituindo a versão de 2001 pelas versões de 2009 e 2015 (Quadro 1.1).

A caracterização e elaboração dos critérios clínicos envolvidos na SLF/LFL revelam sua heterogeneidade clínica, e a dificuldade em definir o método mais eficiente a ser utilizado na indicação do exame molecular para famílias sob risco. Apesar da síndrome possuir características marcantes (um amplo espectro de tumores, idades precoces ao diagnóstico e tendência ao desenvolvimento de múltiplos tumores primários), nenhuma combinação dessas características mostra-se capaz de prever com precisão a ocorrência de uma mutação germinativa em *TP53*. Mutações em *TP53* são detectadas em 50 a 80% das famílias com critérios SLF e em 20 a 40% das famílias com critérios LFL (BIRCH et al., 1994; VARLEY et al., 1997; HWANG et al., 2003; VARLEY, 2003; TINAT et al., 2009). Desse modo, ainda persiste a dúvida a respeito de outros genes possivelmente envolvidos no desenvolvimento da síndrome, e dos fatores ambientais que determinam como ela irá se manifestar (MALKIN, 2011).

Quadro 1.1. Critérios para o diagnóstico clínico da SLF/LFL.

<p>Critério clássico da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (LI et al., 1988)</p> <ul style="list-style-type: none">(1) Probando com sarcoma diagnosticado antes dos 45 anos de idade; e(2) um familiar de primeiro grau com qualquer câncer antes dos 45 anos; e(3) um familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 45 anos ou um sarcoma em qualquer idade.
<p>Li-Fraumeni <i>like</i> – Birch (LFL-B) (BIRCH et al., 1994)</p> <ul style="list-style-type: none">(1) probando com qualquer câncer pediátrico, ou sarcoma, tumor de SNC ou carcinoma adrenocortical antes dos 45 anos; e(2) um familiar de primeiro ou segundo grau com um câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR ou leucemia) em qualquer idade e(3) um familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.
<p>Li-Fraumeni <i>like</i> – Eeles (LFL-E) (EELES, 1995)</p> <ul style="list-style-type: none">(1) presença de dois familiares relacionados em primeiro ou segundo grau com tumores do espectro estendido da SLF (sarcoma, câncer de mama, tumor de SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático) em qualquer idade.
<p>Critérios de Chompret, versão de 2009 (TINAT et al., 2009)</p> <ul style="list-style-type: none">(1) probando com tumor do espectro da síndrome de Li-Fraumeni antes dos 46 anos de idade (sarcoma, tumor de SNC, câncer de mama, carcinoma adrenocortical, leucemia, câncer de broncoalveolar de pulmão), e(2) pelo menos um familiar de primeiro ou segundo grau com tumor da SLF (exceto câncer de mama se o probando tiver câncer de mama) antes dos 56 anos; ou(1) probando com múltiplos tumores primários (exceto múltiplos tumores de mama), sendo que dois deles pertençam ao espectro SLF, e o primeiro deles tenha ocorrido antes dos 46 anos, independente da história familiar, ou(1) probando diagnosticado com carcinoma adrenocortical ou carcinoma do plexo coróide, independente da história familiar.
<p>Critérios de Chompret, versão de 2015 (BOUGEARD et al., 2015)</p> <ul style="list-style-type: none">(1) probando com tumor do espectro da síndrome de Li-Fraumeni antes dos 46 anos de idade (câncer de mama pré-menopausa, sarcoma de partes moles, osteossarcoma, tumor de SNC, carcinoma adrenocortical), e(2) pelo menos um familiar de primeiro ou segundo grau com tumor da SLF (exceto câncer de mama se o probando tiver câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores; ou(1) probando com múltiplos tumores primários (exceto múltiplos tumores de mama), sendo que dois deles pertençam ao espectro SLF, e o primeiro deles tenha ocorrido antes dos 46 anos, independente da história familiar, ou(1) probando diagnosticado com carcinoma adrenocortical, carcinoma do plexo coróide, ou rabdomiossarcoma embrionário anaplásico, independente da história familiar; ou(1) probando com câncer de mama antes dos 31 anos.

SNC: Sistema nervoso central; ADR: carcinoma adrenocortical.

1.3 O gene e a proteína associados à SLF/LFL: *TP53* e p53

1.3.1 Histórico

A proteína p53 foi descoberta em 1979. Nessa década, a associação de certos vírus com o desenvolvimento de tumores era um dos principais focos da pesquisa em câncer. Ao estudarem tumores induzidos pelo vírus SV-40 (*simian virus 40*), grupos de pesquisa independentes observaram que uma proteína de aproximadamente 53 kDa (p53) co-precipitava com um dos antígenos desse vírus. Esse antígeno (*large T-antigen*) era necessário para a transformação celular induzida pelo vírus, e sua interação com uma proteína do hospedeiro levantou grande interesse (KRESS et al., 1979; LANE; CRAWFORD, 1979; LINZER; LEVINE, 1979).

A primeira conclusão acerca de p53 é que ela era um co-efetor na transformação celular, levando, inicialmente, à sua classificação como oncogene. De fato, foi descoberto que células transfectadas com clones de *TP53* tinham a capacidade de se imortalizar e de induzir a transformação de culturas de fibroblastos por interação com o oncogene *RAS* (JENKINS; RUDGE; CURRIE, 1984; PARADA et al., 1984). Entretanto, estudos posteriores mostraram que os clones utilizados nesses experimentos eram versões mutantes de *TP53*, obtidas a partir de células tumorais (ELIYAHU et al., 1988; FINLAY et al., 1988), e que a p53 selvagem regulava negativamente o crescimento celular (ELIYAHU et al., 1989; FINLAY; HINDS; LEVINE, 1989). A partir desses dados, os estudos se voltaram para sua caracterização como um possível gene supressor tumoral, corroborada pelo fato de que mutações em *TP53* eram comuns em tumores (BAKER et al., 1990; NIGRO et al., 1989). O acúmulo aberrante da proteína em células tumorais foi atribuído à sua versão mutante (BARTEK et al., 1990).

A classificação de *TP53* como gene supressor tumoral foi confirmada com a descoberta que pacientes que herdavam uma mutação de perda de função em *TP53* apresentavam a SLF (MALKIN et al., 1990; SRIVASTAVA et al., 1990). Além disso, ratos nocaute para *TP53* tinham uma suscetibilidade ao desenvolvimento precoce de tumores (DONEHOWER et al., 1992). Dessa forma, ficou claro que o gene *TP53* possuía um papel essencial na prevenção do câncer, sendo extensivamente estudado por diversos grupos. Atualmente, é reconhecido que a proteína p53 possui muitas funções além da atividade de supressão tumoral, com evidências sugerindo sua atuação na fertilidade, desenvolvimento, divisão de células-tronco e envelhecimento celular (SOUSSI, 2010).

1.3.2 Estrutura

O gene supressor tumoral *TP53* localiza-se no cromossomo 17, posição p13.1 (17p13.1). Possui 20 kb de extensão e está organizado em 11 éxons, sendo os éxons 2 a 11 codificantes, responsáveis pela tradução de uma proteína de 393 aminoácidos e 53 kDa (Figura 1.1). O gene *TP53* codifica a proteína p53, responsável pela regulação do ciclo celular em resposta a situações de *stress* celular. A proteína é composta por cinco domínios: o domínio de transativação (resíduos 1-40), necessário para a ativação da atividade transcricional; o domínio rico em prolínas (resíduos 61-94), que possibilita interações proteína-proteína; o domínio de ligação ao DNA (resíduos 100-300), que se liga a sequências de reconhecimento nas regiões promotoras de genes-alvo; o domínio de oligomerização (resíduos 324-355), e o domínio regulatório C-terminal (resíduos 360-393), que pode atuar na regulação da ligação ao DNA através do domínio de ligação (TOLEDO; WAHL, 2006).

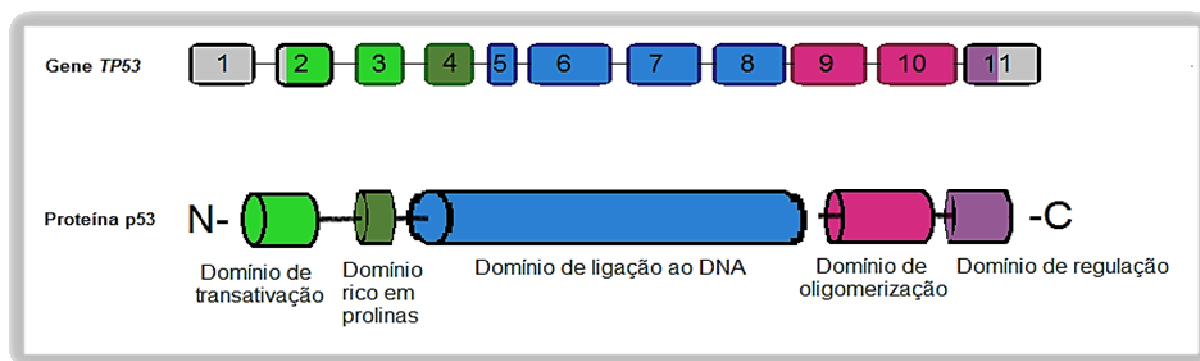


Figura 1.1. Gene *TP53* e proteína p53. As áreas retangulares representam os 11 éxons de *TP53*, coloridos conforme os domínios que codificam na proteína p53. O éxon 1 e parte dos éxons 2 e 11 (em cinza) correspondem a regiões não traduzidas. Modificado de ACHATZ, 2008.

1.3.3 Vias e funções da proteína p53

A proteína p53 é produzida constitutivamente nos tecidos humanos. Entretanto, em células não expostas a situações de *stress*, essa proteína é mantida em níveis reduzidos, essencialmente pela ação da proteína MDM2, que se liga ao domínio de transativação de p53 e induz sua ubiquitinação para posterior degradação via proteassoma. Em situações de *stress* celular, como hipóxia, danos ao DNA, privação de nutrientes, ativação oncogênica, entre outros, a fosforilação de p53 reduz sua afinidade por MDM2, e ela atuará na manutenção da integridade genômica, ativando vias que evitam a proliferação celular inapropriada (Figura 1.2). Estudos mostraram que a proteína MDM4 também funciona como um regulador de p53, ocluindo o domínio de transativação de p53 e mantendo-a inativa. Em situações de *stress* celular, MDM4 é degradado, liberando p53 para exercer sua função (TOLEDO; WAHL, 2006; BOURDON, 2007).

Entre os inúmeros estímulos que ativam a via de p53, está a atividade anômala de oncoproteínas (Figura 1.2) como MYC, RAS, E2F, que induzem a transcrição de *ARF* (ou *p14*). A proteína p14, por sua vez, sequestra MDM2 e deixa p53 livre para se estabilizar e exercer sua função (MEEK, 2009). Outro caminho é mediado por cinases sensíveis a danos ao DNA, como ATM e ATR, que agem direta ou indiretamente via CHEK2, fosforilando p53 no seu domínio N-terminal, impedindo a ligação de p53 à proteína MDM2 (Figura 1.2) (BANIN et al., 1998; CANMAN et al., 1998).

A p53 ativa a sinalização de três respostas celulares principais: em certas circunstâncias, induz a parada do ciclo celular, e em outras, ativa a maquinaria apoptótica, levando a célula à morte; a terceira possibilidade é o direcionamento à senescência celular (Figura 1.2). A primeira resposta permite que mecanismos de reparo sejam ativados, existindo a possibilidade de sobrevivência da célula, caso o dano sofrido seja revertido. Já as outras duas são terminais para a célula (RILEY et al., 2008; BROWN et al., 2009). Para exercer essas funções, p53 age principalmente como um fator de transcrição, embora também atue em associação direta a outras proteínas. Seu domínio de ligação ao DNA tem afinidade pelo motivo: RRRCWWGYYY...n...RRRCWWGYYY (onde R é uma purina, Y é uma pirimidina, W é uma adenina ou timina e o espaçamento entre as duas sequências é de 0-13 nucleotídeos). Após a ligação ao DNA, complexas modificações ocorrem em p53, essencialmente na porção C-terminal, incluindo acetilação, glicosilação, fosforilação, ribosilação e sumoilação. Essas modificações alteram a capacidade de p53 interagir com outros fatores de transcrição, e portanto modulam sua atividade transcricional (MENENDEZ; INGA; RESNICK, 2009; AMARAL et al., 2010).

Os genes que atuam *downstream* à p53 são diversos e conduzem importantes processos de manutenção da homeostase do organismo. Esses genes são diferencialmente ativados dependendo do tipo de célula, extensão do dano sofrido e diversos parâmetros ainda não identificados (MEEK, 2009).

Um dos mais importantes alvos transcricionais de p53 é o gene *CDKN1A* (ou *p21*), cuja proteína atua como um inibidor de CDKs (cinases dependentes de ciclina). *CDKN1A* se liga ao complexo D-CDK4. Essa ligação impede que ocorra a hiperfosforilação da proteína RB na fase G1 do ciclo celular. A proteína RB não fosforilada se liga aos fatores de transcrição da família E2F (formando o complexo E2F-DP1-RB), impedindo sua atuação. Dessa forma, os alvos de E2F (como por exemplo, as ciclinas E e A, DNA polimerase e timidina cinase) são reprimidos, o que paralisa o ciclo celular na fase G1. A partir desta parada, podem ser ativados mecanismos de reparo, ou a progressão para senescência ou apoptose, caso haja impossibilidade de reparo (RILEY et al., 2008).

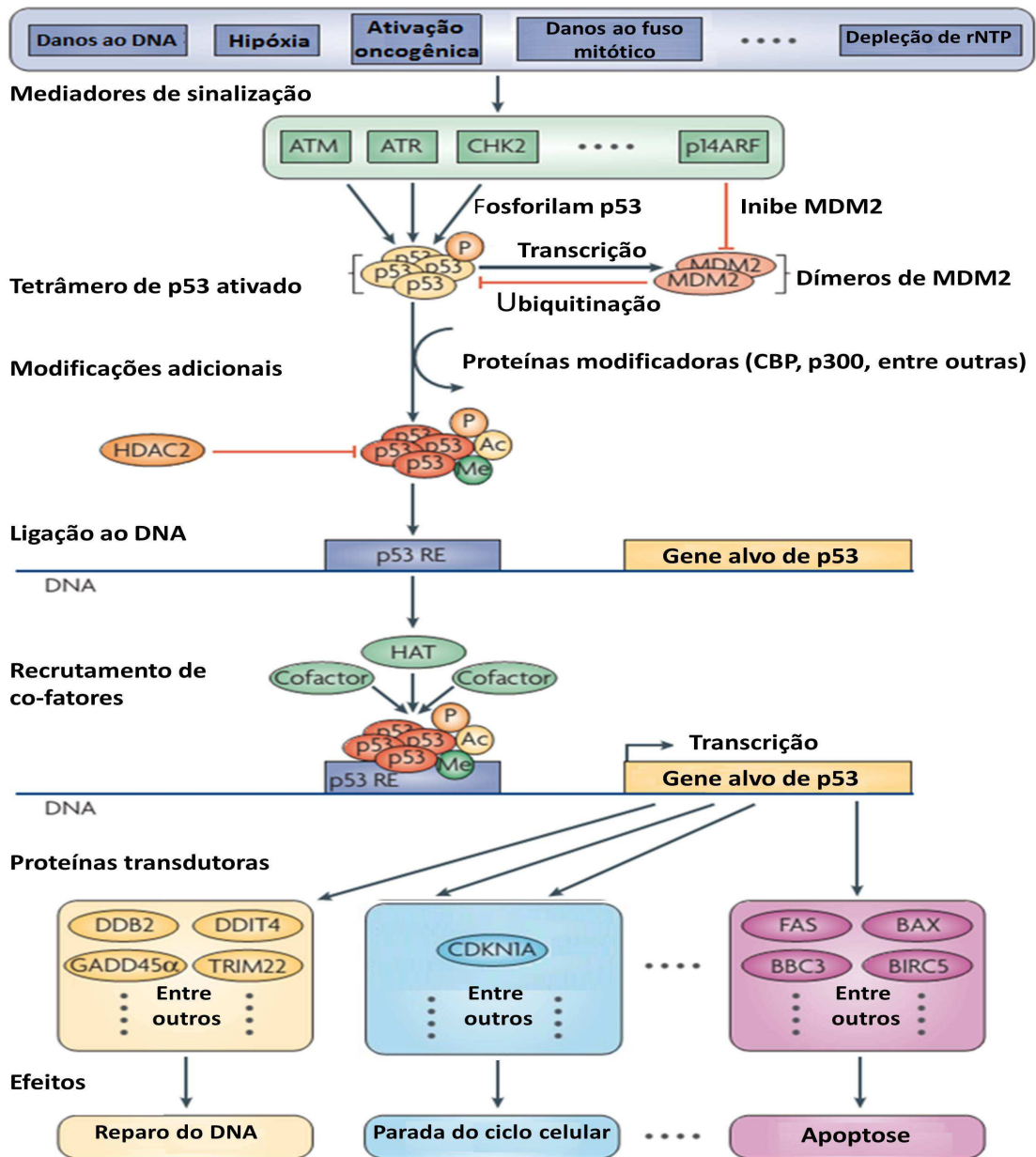


Figura 1.2. A via de p53. Uma versão simplificada com alguns dos principais sinais de ativação da via, os mediadores desses sinais *upstream* à p53 (ATM, ATR, CHEK2 e ARF), a proteína MDM2 como principal reguladora negativa da ativação de p53, e os eventos *downstream* à ativação de p53. p53 é o centro de complexas interações celulares. Ela pode atuar como fator de transcrição ou por interação direta com outras proteínas. Entre suas respostas mais importantes estão a parada do ciclo celular, cujo principal mediador é a proteína CDKN1A (p21), e a indução da apoptose. Ac: acetilação; Me: metilação; P: fosforilação. Modificado de RILEY et al, 2008.

A indução da apoptose é o efeito mais pronunciado de p53. Essa indução é necessária rotineiramente durante a morfogênese para descartar células não mais necessárias, resultando na formação de tecidos e órgãos funcionais. De forma geral, a apoptose é utilizada para manter um número apropriado de células nos diversos tecidos (WEINBERG, 2007). Para induzir a apoptose, a p53 atua como fator de transcrição para genes como *BAX*, *PUMA/BBC3*, *BIRC5* e *FAS* (RILEY et al., 2008). Além disso, ela também se liga diretamente a outras

proteínas, como BclXL e Bcl2, às quais p53 se liga na mitocôndria, induzindo a apoptose via abertura dos canais de membrana e liberação do citocromo c (MIHARA et al., 2003; CHIPUK et al., 2005; GREEN; KROEMER, 2009). A alta produção de p53 também induz a elevação dos níveis de MDM2. Dessa forma, após induzir reparo ou apoptose, a p53 conduz um *feedback* negativo, permitindo que o ciclo celular retome sua progressão e que a apoptose seja mantida somente em níveis necessários (WU et al., 1993).

Por sua função anti-proliferativa em células que sofreram danos no DNA, a p53 tem papel crítico no bloqueio do desenvolvimento tumoral, motivo pelo qual o gene *TP53* foi denominado “guardião do genoma” (LANE, 1992). A presença da maquinaria apoptótica desencadeada por p53 é um empecilho à proliferação de células tumorais. A atividade de p53 é perdida na progressão tumoral, tanto por mutação no gene *TP53* quanto por perda de sinalização celular *upstream* ou *downstream* à proteína (TOLEDO; WAHL, 2006; BOURDON, 2007).

A inativação de p53 confere uma grande vantagem seletiva para células malignas. Isso é fácil de ser compreendido, levando em conta, por exemplo, que uma célula com ativação exacerbada de um oncogene não poderá mais responder com a cascata de sinalização que leva à parada do ciclo celular ou apoptose induzida por p53, mantendo uma proliferação anômala. O efeito da inativação de p53 é também prejudicial ao tratamento do câncer. Quimioterapia e radioterapia, por exemplo, são tratamentos que atuam danificando o DNA de células cancerosas, provocando sua morte por apoptose. A perda da resposta apoptótica via p53 é portanto um fator prognóstico ruim, podendo levar essas neoplasias a uma resposta menor ao tratamento (WEINBERG, 2007).

Dois outros genes foram descritos como pertencentes à mesma família que *TP53*: *TP63* (3q28) e *TP73* (1p36). Evidências sugerem que esses três genes tenham surgido pela amplificação de um ancestral comum. Apesar de exibirem similaridade estrutural e funcional, os três genes evoluíram de forma a adquirirem funções mais específicas na célula. As proteínas p63 e p73 parecem ter predominantemente funções de morfogênese, e menor função supressora tumoral que p53. A função de p63 é essencial na formação do crânio, face, membros e pele. Já p73 atua na neurogênese (PFLAUM; SCHLOSSER; MÜLLER, 2014). Dessa forma, a proteína p53 pode ser considerada um componente da família cuja indução ocorre preferencialmente por situações de *stress* celular, enquanto as outras duas proteínas respondem melhor a estímulos de desenvolvimento tecidual (COURTOIS; CARON DE FROMENTEL; HAINAUT, 2004). Mutações germinativas de *TP63* causam síndromes de malformação congênita em humanos (BRUNNER; HAMEL; BOKHOVEN HV, 2002), enquanto mutações germinativas em *TP73* não estão descritas. Não obstante, estes dois genes

apresentam função supressora tumoral, ainda que menos pronunciada. Isoformas oncogênicas de p63 e p73 são diferencialmente expressas em tumores humanos (INOUE; FRY, 2014).

1.4 Mutações em *TP53* e o câncer

Mutações em *TP53* já foram associadas à susceptibilidade, desenvolvimento, progressão e prognóstico no câncer (SOUSSI; LEROY; TASCHNER, 2014). A importância desse gene como “guardião do genoma” e a elevada frequência dessas mutações em tumores gerou um vasto campo de pesquisa. O IARC (Agência Internacional para Pesquisa em Câncer, do inglês *International Agency for Research on Cancer*) criou uma base de dados específica para este gene. Nela, podem ser acessados dados referentes a mutações germinativas e somáticas, suas frequências, tipos de tumores em que elas são encontradas, idade ao diagnóstico dos pacientes, localização das mutações no gene, tipo de mutação (de sentido trocado, sem sentido, inserções/deleções, etc), entre outros. A base de dados é uma compilação de informações publicadas em periódicos e de comunicação pessoal com grupos de pesquisa colaboradores, disponível em <http://p53.iarc.fr/> (PETITJEAN et al., 2007b). O *IARC TP53 DATABASE* também inclui dados de ensaios *in vitro* realizados por KATO e colaboradores (2003), que verificaram o impacto de alterações em todos os códons da proteína p53 na atividade transcricional da mesma.

Enquanto outros genes supressores de tumor apresentam como mutações mais frequentes aquelas dos tipos sem sentido e de mudança na matriz de leitura, as mutações em *TP53* são majoritariamente do tipo sentido trocado (do inglês *missense*), tanto as somáticas quanto as germinativas. Em sua maioria, elas estão localizadas nos éxons 5 a 8, que codificam o domínio de ligação ao DNA da proteína p53, uma região altamente conservada (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010; MALKIN, 2011). Entretanto, essa observação está associada a um importante viés, já que muitos estudos focam suas investigações apenas nesses éxons, o que pode causar uma subestimação da frequência de mutações em outras regiões do gene (SOUSSI; LEROY; TASCHNER, 2014).

Mutações em *TP53* podem conter propriedades de efeito dominante negativo e/ou de ganho de função. O efeito dominante negativo ocorre quando a proteína mutante não só perde sua função supressora tumoral, mas também prejudica a função da proteína selvagem remanescente. A p53 atua em forma de tetrâmeros, isto é, em um conjunto de quatro subunidades de polipeptídeos. Dessa forma, um polipeptídeo mutado presente no tetrâmero pode interferir na atuação do polipeptídeo selvagem (WEINBERG, 2007). Esse efeito é demonstrado pela alteração da atividade de transcrição da p53 selvagem quando em conjunto com a mutante. Foi demonstrado que mutantes que exercem um efeito negativo sobre a

transcrição de dois genes alvos de p53 (*CDKN1A* e *RGC*) ocorrem em excesso em tumores esporádicos, sugerindo que o efeito dominante negativo pode ser importante na seleção positiva de mutações no câncer (PETITJEAN et al., 2007a).

Outros estudos mostram que o acúmulo de algumas formas de p53 mutante (R175H e R273H) podem não apenas acarretar na perda da função de p53, mas ainda aumentar a capacidade metastática dos tumores (LANG et al., 2004; OLIVE et al., 2004). Algumas formas mutantes de p53 já demonstraram cooperar com oncogenes na transformação celular, o que representa um ganho de função (HINDS et al., 1990). Os mecanismos pelos quais as proteínas com essas alterações exercem essas propriedades ainda não estão elucidados (OREN; ROTTER, 2010).

Estudos recentes têm demonstrado que alguns mutantes de p53 podem adquirir propriedades semelhantes às das proteínas priônicas de mamíferos. Os príons são agentes infecciosos proteicos capazes de converter proteínas normais em proteínas de conformação inadequada, formando agregados que se acumulam nas células, prejudicando a fisiologia do tecido em questão. Essas proteínas são responsáveis pelo grupo de doenças neurodegenerativas conhecidas como encefalopatias espongiformes transmissíveis (PRUSINER, 1982; KOCISKO et al., 1994). Algumas formas da p53 mutada, por adquirirem uma conformação incorreta, se acumulam na célula, e também têm capacidade de converter a p53 selvagem em uma proteína com dobramento incorreto, formando agregados semelhantes aos dos príons. Esses eventos podem levar à interação desses agregados com novos sítios no DNA, alterando a expressão gênica na célula. Esse modelo explica tanto o efeito dominante negativo quanto o efeito de ganho de função dessas mutações (RANGEL et al., 2014; SILVA et al., 2014b).

1.4.1 Mutações somáticas

As mutações somáticas de *TP53* ocorrem em praticamente todos os tipos de câncer, estando presente em até 50% dos tumores. Isso faz do gene *TP53* o mais frequentemente mutado no câncer, e normalmente suas mutações têm um papel fundamental no processo de carcinogênese (SOUSSI; LOZANO, 2005; OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010). De acordo com a base de dados IARC, os tumores onde as mutações em *TP53* são mais relatadas são os tumores colorretais (12,7%), do sistema respiratório (12,2%), de mama (10,1%), órgãos genitais femininos (10%) e cabeça e pescoço (9,9%) (PETITJEAN et al., 2007b) (Figura 1.3). Em alguns tumores, essas mutações costumam ser mais frequentes em estádios mais avançados da progressão tumoral, ou ainda em subtipos histológicos mais agressivos, como tumores de mama triplo negativos ou com HER-2 amplificado (WANG et al., 2004;

LANGEROD et al., 2007). No caso do câncer colorretal, a participação das mutações em *TP53* é crítica para a transição do adenoma para adenocarcinoma (NACCARATI et al., 2012).

Os *hotspots* (“sítios quentes”) de mutações somáticas nesse gene ocorrem em códons correspondentes ao domínio de ligação ao DNA da proteína (Figura 1.3) (PETITJEAN et al., 2007b). Alguns desses códons são *hotspots* por influência de agentes carcinogênicos que induzem mutações sítio-específicas. O caso mais conhecido é o da aflatoxina B1, um metabólito secundário produzido pelo fungo *Aspergillus flavus*. A aflatoxina B1 é um contaminante frequente em plantações de grãos (como milho, arroz e amendoins) em certas regiões do planeta, especialmente na China e África. Esse metabólito induz transversões G para T na terceira base do códon 249 de *TP53*. Em regiões com elevada exposição à aflatoxina B1, os casos de hepatocarcinoma apresentam elevada frequência da mutação no códon 249, enquanto os hepatocarcinomas em outras regiões geográficas apresentam um espectro mutacional de *TP53* diferente (HUSSAIN et al., 2007). Isso também ocorre no carcinoma de pele do tipo não melanoma, no qual a radiação ultravioleta induz transições CC:TT, especialmente nos códons 248 e 278 (GIGLIA-MARI; SARASIN, 2003); e no câncer de pulmão, no qual a exposição a hidrocarbonetos derivados do tabaco induz principalmente transversões G:T nos códons 157, 158 e 273 (PFEIFER; HAINAUT, 2003).

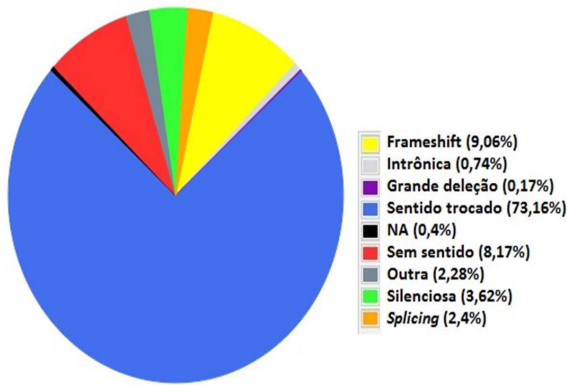
1.4.2 Mutações germinativas

Entre os tumores de indivíduos com mutação germinativa em *TP53*, os mais comuns são o câncer de mama (27,3%), sarcoma de partes moles (13,1%), câncer de sistema nervoso central (12,4%), de glândula adrenal (11,6%) e tumores ósseos (10,2%) (Figura 1.3) (PETITJEAN et al., 2007b). Não é conhecido o motivo pelo qual mutações germinativas nesse gene causam uma predisposição maior aos *core cancers* já mencionados em relação a outros tipos de câncer (MARIS; KNUDSON, 2015), visto que *TP53* é expresso ubiquamente e suas mutações somáticas são um evento comum em diversos outros tumores.

Entre os códons *hotspot* para mutações germinativas, o único que não se localiza em um éxon correspondente ao domínio de ligação ao DNA na proteína é o códon 337, que contém a mutação fundadora R337H, de elevada prevalência no Brasil (PALMERO et al., 2008).

A proporção de mutações em sítios CpG é de 54% para mutações germinativas e 25% para mutações somáticas. Isso pode indicar um caráter mais espontâneo das mutações germinativas, já que os sítios CpG são mais susceptíveis a mutações derivadas de deaminação espontânea (OLIVIER; HOLLSTEIN; HAINAUT, 2010).

Mutações somáticas em TP53



Mutações germinativas em TP53

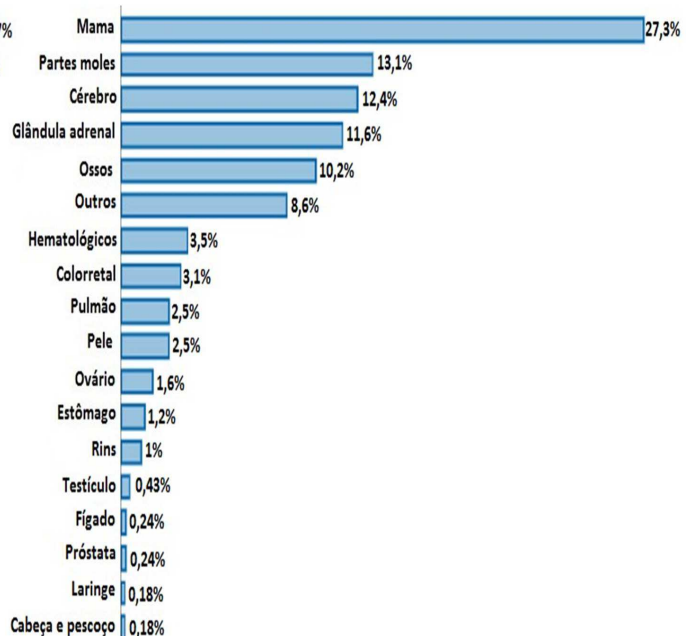
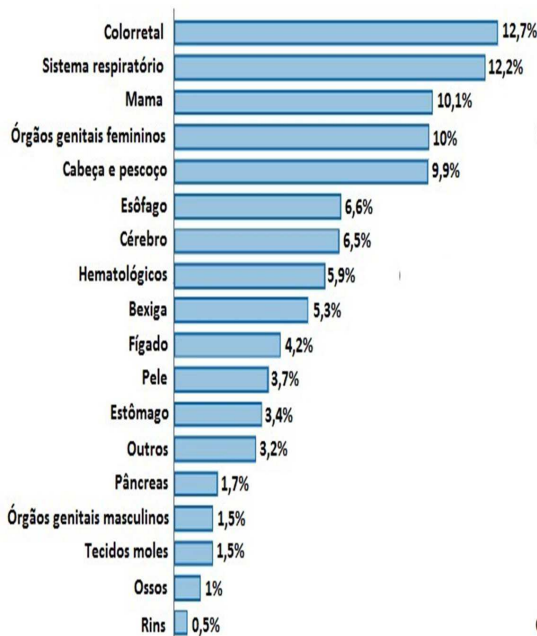
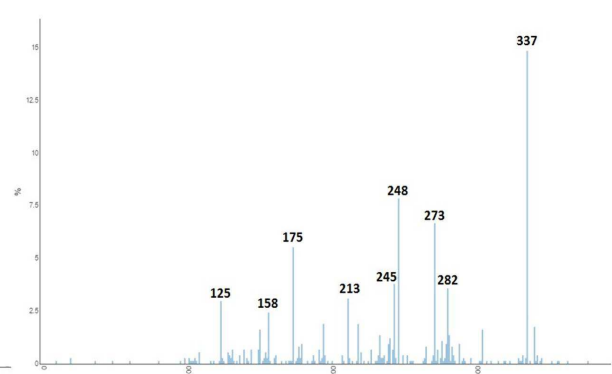
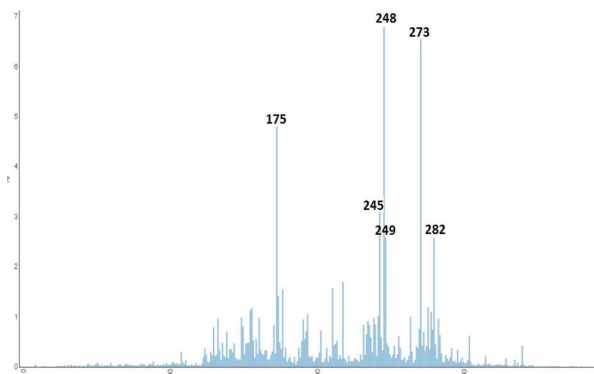
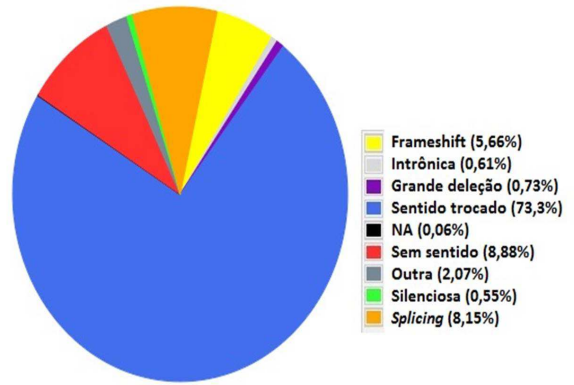


Figura 1.3. Mutações somáticas e germinativas relatadas na base de dados IARC TP53 versão R18. No topo da imagem vemos a frequência das mutações em relação ao efeito na proteína. As mutações de sentido trocado (*missense*) são as mais comuns tanto em tumores quanto em linhagem germinativa. No centro, os códons *hotspots* das mutações de sentido trocado. Na parte de baixo da imagem, a distribuição tumoral das mutações em TP53, em amostras tumorais (esquerda), e em indivíduos com mutações germinativas (direita). NA: *Not available* (Não disponível).

Embora o risco mais proeminente em portadores de mutação em *TP53* seja para um grupo específico de cânceres, sabe-se que o espectro tumoral dessas mutações é bem amplo (Figura 1.3). Desde a descoberta de *TP53* como gene alvo da SLF/LFL, o espectro de tumores possíveis nesses indivíduos parece ainda não estar totalmente elucidado. Recentemente, foi relatado um caso de coriocarcinoma gestacional, um raro e agressivo tumor gerado por células trofoblásticas do embrião, associado a uma mutação em *TP53*. A mutação em questão foi herdada do pai pelo bebê, e ocorreu a transmissão transplacentária do tumor para a mãe (PATRIER-SALLEBERT et al., 2015).

O risco vital de câncer em portadores de mutação em *TP53* foi estimado em 73% para homens, e próximo de 100% para as mulheres, diferença atribuída à alta incidência de câncer de mama nas mulheres (CHOMPRET et al., 2000). HWANG e colaboradores (2003) estimaram uma penetrância média, para ambos os sexos, de 12% até os 20 anos de idade; 35% até os 30 anos de idade; 52% até os 40 anos de idade; e 80% até os 50 anos. Porém, as mulheres, quando avaliadas de forma independente, mostraram-se mais suscetíveis e com idade ao diagnóstico mais precoce. Para elas, o risco de desenvolvimento de câncer foi de 93% até os 50 anos (contra 68% para os homens), e a idade média ao diagnóstico foi de 29 anos (contra 40 para os homens). O estudo também mostrou que, em relação aos familiares sem mutação e à população em geral, pacientes com mutação em *TP53* possuíam um risco aumentado de desenvolver uma segunda neoplasia. Quanto menor era a idade ao diagnóstico do primeiro tumor, maior o risco de surgimento de um segundo tumor, especialmente quando o tratamento do primeiro câncer envolvia radioterapia.

O risco de múltiplos tumores primários foi corroborado por outros estudos (GARBER et al., 1991; HISADA et al., 1998). Entre 24 famílias SLF estudadas, 15% dos indivíduos desenvolveram um segundo tumor, 4% desenvolveram um terceiro, e 2% desenvolveram um quarto câncer (HISADA et al., 1998). A associação da radiação com o desenvolvimento de novos tumores já havia sido sugerida por LI e colaboradores (1988) e foi corroborada por diversos estudos (HISADA et al., 1998; CHOMPRET et al., 2000; LIMACHER et al., 2001; VARLEY, 2003; HEYMANN et al., 2010). Culturas de fibroblastos de portadores de mutações em *TP53* mostraram ser resistentes a baixas doses de radiação, quando comparadas a células de indivíduos controle (SPROSTON et al., 1996).

Foi levantada a hipótese de que existiria uma antecipação genética em portadores de mutação em *TP53*, fenômeno pelo qual uma doença genética se apresenta mais precocemente ao longo das sucessivas gerações. A causa dessa antecipação poderia ser uma instabilidade genômica causada por *TP53*, herdável ao longo das gerações (TRKOVA et al., 2002; BROWN et al., 2005). Dois mecanismos moleculares associados a mutações em *TP53* foram

propostos para explicar a suposta antecipação genética da SLF: o encurtamento progressivo dos telômeros e o aumento na variação do número de cópias no genoma.

TABORI e colaboradores (2007) evidenciaram, em nove famílias com mutações em *TP53*, um encurtamento dos telômeros ao longo de sucessivas gerações. Esse encurtamento poderia ser um marcador da suposta instabilidade genômica herdável, causada por uma mutação em *TP53*, que estaria levando à antecipação do fenótipo. Os telômeros entre as crianças portadoras de mutação que desenvolveram câncer eram menores que o de crianças com mutação e sem a doença, e essa diferença se mostrou ainda mais pronunciada em relação aos telômeros de indivíduos sem mutação em *TP53*. TRKOVA e colaboradores (2007) analisaram amostras de DNA de sangue periférico de 20 portadores de mutação em *TP53* e 83 controles. Ao fazerem o pareamento por idade, os indivíduos com mutação apresentaram telômeros mais curtos.

Da mesma forma, um estudo utilizando *microarray* mostrou que a quantidade de variações de número de cópia (CNVs) em DNA de indivíduos com mutação em *TP53* era maior que em indivíduos controle. Entre os controles, a média de CNVs foi de 2,93, enquanto nos portadores de mutação, foi de 12,9 ($p=0,01$) (SHLIEN et al., 2008). Um estudo semelhante mostrou que essas alterações também dependiam do tipo de mutação em *TP53* apresentada: mutações no domínio de ligação ao DNA estão associadas a um número maior de CNVs do que a mutação R337H, que se localiza no domínio de oligomerização da proteína (SILVA et al., 2012).

Entretanto, um estudo recente sugeriu que a antecipação não se aplica às famílias com SLF/LFL. Ao analisarem 13 indivíduos de duas gerações por sequenciamento de genoma completo, não foram encontrados CNVs *de novo*, nem uma diferença considerável na quantidade de CNVs entre gerações sucessivas. O estudo propôs que o desenvolvimento de tipos de tumores mais agressivos e em idade mais precoce pode estar associado a uma relação entre a mutação em *TP53* herdada de um dos progenitores, e variantes genéticas raras herdadas do outro progenitor, que modificariam o fenótipo apresentado pelo indivíduo (ARIFFIN et al., 2014).

Alguns polimorfismos foram relatados como modificadores de penetrância em indivíduos com mutação em *TP53*, influenciando na idade de desenvolvimento de câncer. O rs17878362, um polimorfismo no íntron 3 de *TP53* (também chamado de PIN3), consiste numa duplicação de 16 pares de bases. Em portadores de mutações em *TP53*, os estudos mostram que o alelo duplicado de PIN3 resulta numa idade ao diagnóstico de câncer significativamente maior em relação aos pacientes com mutação e sem o alelo duplicado, sugerindo um possível efeito protetor (MARCEL et al., 2009).

Outro polimorfismo digno de nota é o rs1042522, um polimorfismo no éxon 4 de *TP53* (também chamado de PEX4), localizado no códon 72. As sequências possíveis para este códon são: CGC, que codifica a arginina (R), ou CCC, que codifica a prolina (P), no domínio rico em prolinas de p53. DUMONT e colaboradores (2003) mostraram, em linhagens celulares, que a proteína contendo o resíduo R72 apresenta maior capacidade de indução da apoptose. Entretanto, SIDDIQUE e SABAPATHY (2006) mostraram que a proteína com resíduo P72 possui maior eficiência em ativar genes de reparo do DNA em relação à proteína com resíduo R72. Portadores de mutação patogênica em *TP53* e homocigotos para o alelo G desse polimorfismo exibiram uma idade de desenvolvimento de câncer mais precoce em relação aos que possuíam apenas o alelo C deste polimorfismo (MCBRIDE et al., 2014).

Por fim, o SNP rs2279744 (SNP 309) de *MDM2* é alvo de interesse dos grupos que estudam a SLF/LFL. A proteína MDM2 é o principal regulador negativo de p53. Camundongos que apresentam uma hiperexpressão de *MDM2* são mais suscetíveis ao desenvolvimento de câncer (JONES et al., 1998). O SNP rs2279744 (T>G), na posição 309 do íntron 1 desse gene, aumenta sua afinidade pelo seu fator de transcrição (BOND et al., 2004). Dessa forma, é possível que esse SNP eleve sutilmente a expressão de *MDM2*, e portanto o risco de desenvolvimento de câncer. Além de já ter sido associado à susceptibilidade a diversos tipos de tumores (PHILLIPS et al., 2010; LI et al., 2011; CHAAR et al., 2012), ele já foi associado a uma idade menor de desenvolvimento de câncer nos indivíduos com mutações patogênicas em *TP53* (BOUGEARD et al., 2006; FANG et al., 2010).

1.5 O acompanhamento clínico e a terapêutica na SLF/LFL

Não existe um consenso acerca da melhor forma de acompanhamento de indivíduos com mutações em *TP53*. Como pouco pode ser feito para evitar o desenvolvimento de tumores, as estratégias se concentram nas técnicas de rastreamento precoce de lesões, para elevar as chances de cura. Os aspectos éticos e financeiros, e as implicações sociais e psicológicas acerca desse rastreio ainda estão em discussão (MAI et al., 2012).

Um estudo realizado com membros de nove famílias com SLF na Holanda mostrou que 78% (25/32) das pessoas convidadas para rastreio precoce de cânceres aderiram às indicações. Pela percepção dos pacientes, o acompanhamento é benéfico principalmente por possibilitar a detecção da doença em estágio inicial e por “dar uma sensação de controle sobre o problema”. Entretanto, 42% relataram ter medo que isso afetasse o valor de seguros de saúde e de vida, e 36% acham que o acompanhamento pode trazer preocupações desnecessárias (LAMMENS et al., 2010). Apesar do estresse psicológico que o rastreio pode

causar, as evidências apontam que ele traz benefícios no prognóstico da maioria dos tumores associados à SLF (MCBRIDE et al., 2014; VILLANI et al., 2011).

Até o momento, os métodos de rastreio têm sido diferentes entre as instituições. Entre as principais dificuldades, encontram-se o fato da síndrome predispor a tumores em múltiplos órgãos, e de ser necessário evitar a exposição à radiação, o que tem implicações na indicação de exames como a mamografia. As recomendações atuais do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN-USA) para esses indivíduos se encontram no quadro 1.2 (MAI et al., 2012). Outras questões importantes são o conhecimento ainda modesto que se tem da epidemiologia da síndrome no mundo e dos fatores que influenciam a heterogeneidade de fenótipos, dificultando a elaboração de programas de vigilância. Em 2010, ocorreu o primeiro *Li-Fraumeni Syndrome workshop*, em Bethesda, Maryland, no qual foi criado um Consórcio para facilitar a integração do conhecimento acerca da síndrome, o *Li-Fraumeni Exploration* (LiFE) (MAI et al., 2012).

Baseando-se nas evidências até o momento, MCBRIDE e colaboradores (2014) propuseram um extenso programa de vigilância, para ser testado e servir de base para o desenvolvimento de um protocolo universal. Este programa está descrito no quadro 1.3.

Quadro 1.2. Recomendações da NCCN para o rastreio de indivíduos com mutações germinativas em TP53. Adaptado de MAI et al. (2012).

Câncer de mama:

- Treinamento para realização do autoexame das mamas mensalmente a partir dos 18 anos;
- Exame clínico das mamas anualmente, a partir dos 20-25 anos, ou 5-10 anos antes do caso de câncer de mama mais precoce na família;
- Mamografia e/ou ressonância magnética das mamas anualmente a partir do 20-25 anos ou 5-10 anos antes do caso de câncer de mama mais precoce na família;
- Discutir a opção de mastectomia profilática, analisando os custos e benefícios.

Outros cânceres:

- Exame físico anual com avaliação dermatológica e neurológica cuidadosa;
- Colonoscopia a cada 2-5 anos;
- Outros rastreios órgão-específicos, de acordo com o padrão de tumores apresentado pela família

Quadro 1.3. Programa de vigilância sugerido por MCBRIDE et al. (2014) para indivíduos com mutação germinativa em TP53.

Câncer adrenocortical:

- Ultrassonografia abdominal a cada 3-4 meses até os 10 anos*

Câncer de mama:

- Treinamento para realização do autoexame das mamas mensalmente a partir dos 18 anos;
- Exame clínico das mamas a cada 6-12 meses, a partir dos 20-25 anos;
- Ressonância magnética (RM) das mamas anualmente a partir do 20-25 anos até os 50 anos**;
- Discutir a opção de mastectomia profilática.

Câncer cerebral:

- Incluir RM cerebral na RM de corpo inteiro anual;
- Exame neurológico anual;
- Aconselhar a notificação imediata de sintomas neurológicos.

Sarcoma:

- RM anual de corpo inteiro*;
- Exame físico abrangente anual;
- Aconselhar a notificação imediata de qualquer sintoma.

Cânceres hematopoiéticos:

- Hemograma completo a partir dos 18 anos.

Câncer colorretal:

- Colonoscopias de 5 em 5 anos***, aumentando para cada 2-5 anos a partir dos 25 anos de idade, ou 10 anos antes do caso mais precoce de CCR na família;
- Os riscos associados à colonoscopia devem ser devidamente esclarecidos.

Câncer gástrico:

- Endoscopias de 5 em 5 anos, aumentando para cada 2-5 anos a partir dos 25 anos de idade, ou 10 anos antes do caso mais precoce de câncer gástrico na família.

*A seleção e marcação dos exames pediátricos ainda é um assunto para discussão e pesquisa. ** Se a RM das mamas não for possível, considerar a mamografia, com ou sem ultrassonografia, e discutir a possibilidade de mastectomia profilática. A preocupação com a radiação ionizante da mamografia deve ser levada em conta.

***Baseado nas recomendações do NCCN, para indivíduos com um parente de 1º grau com CCR < 50 anos.

CCR: câncer colorretal.

A p53 é um alvo terapêutico importante tanto para indivíduos com SFL/LFL quanto para pacientes com câncer esporádico. Estratégias têm sido desenvolvidas tanto para a desestabilização/inativação da p53 mutante, quanto para a reativação da p53 selvagem. Já foram descritas drogas que inibem a agregação de algumas formas mutantes de p53, que a resgatam de sua degradação induzida por MDM2, que inibem sua interação com determinados fatores de transcrição, ou que reativam sua função normal alterando a conformação da proteína. Mas os mecanismos por trás da atuação dessas drogas ainda não são bem conhecidos, e algumas parecem atuar só em mutantes específicos (MULLER; VOUSDEN, 2013).

Terapias gênicas visando a introdução de cópias selvagens de *TP53* em tumores também têm sido testadas. Foram desenvolvidas drogas utilizando vetores adenovirais para introdução de *TP53*, mostrando alguns resultados promissores (CHEN et al., 2014). Como exemplo, temos a droga Advexin®. SENZER e colaboradores (2007) relataram o caso de uma paciente com mutação germinativa em *TP53*, que havia desenvolvido três tumores pélvicos aos 21 anos. Após sucessivas tentativas terapêuticas sem resposta satisfatória, a paciente foi encaminhada ao tratamento experimental com a droga Advexin®, porém apenas um dos três tumores era acessível para injeções intratumorais com a droga. Após quatro injeções com o Advexin®, o exame de FDG-PET/CT mostrou remissão completa do tumor tratado em dois meses, enquanto os outros dois tumores continuavam a progredir. Entretanto, o Advexin® ainda não foi aprovado pela *Food and Drug Administration*, e a empresa que o desenvolvia (*Introgen Therapeutics, Inc.*) fechou. Os mecanismos de ação e os efeitos dessas drogas ainda precisam ser melhor investigados, sendo também necessário desenvolver formas mais eficientes de administração das mesmas (CHEN et al., 2014).

1.6 Epidemiologia da SLF/LFL

A prevalência da SLF/LFL ainda não foi mundialmente estimada. Trata-se de uma síndrome clinicamente heterogênea, pouco conhecida, e portanto, subdiagnosticada. Algumas estimativas foram feitas considerando a frequência de mutações germinativas em *TP53* em coortes de pacientes com determinados tumores, e a frequência populacional desses tumores. O estudo de GONZALEZ e colaboradores (2009) estimou uma frequência de mutações germinativas em *TP53* na população geral entre 1/17.000 e 1/23.000 indivíduos. Essa estimativa foi obtida a partir de dados publicados nos Estados Unidos e na Europa. No Reino Unido, seguindo o mesmo raciocínio, a estimativa mais recente de mutações germinativas em *TP53* é de 1/10.000 a 1/25.000 indivíduos (MAI et al., 2012). Essas estimativas se baseiam apenas no diagnóstico molecular da síndrome, determinado pela detecção de mutações em *TP53*, e não incluem famílias com diagnóstico clínico da síndrome, para os quais outras alterações não foram investigadas.

No Brasil, ACHATZ e colaboradores (2007), ao investigarem probandos de 45 famílias com critérios clínicos para SLF/LFL, encontraram 13 pacientes com mutação em *TP53*. Divergindo do esperado, seis desses 13 probandos (46,2%) carregavam a mesma mutação, R337H, no éxon 10 de *TP53*, correspondente ao domínio de oligomerização da proteína. A mutação R337H (c.1010G>A) já havia sido descrita em 2001, no Paraná. Ela foi encontrada em 35 de 36 crianças com carcinoma adrenocortical e sem história familiar sugestiva de câncer hereditário. Inicialmente, acreditou-se que a mutação ocorria

independentemente nos indivíduos, possivelmente pela exposição a algum fator ambiental em comum que agia de forma sítio específica no códon 337 de *TP53*. Também se achava que esta mutação predisponha apenas a carcinoma adrenocortical, que é 10 a 15 vezes mais incidente no Paraná que em outras partes do mundo (RIBEIRO et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2006).

Entretanto, a análise de 29 SNPs em 12 portadores de R337H não relacionados evidenciou que todos possuíam o mesmo haplótipo segregando com a mutação, e que as chances desse evento ter ocorrido ao acaso eram de $3,1 \times 10^{-9}$, confirmando o efeito fundador para esta mutação. As famílias com R337H encontram-se principalmente entre São Paulo e Rio Grande do Sul, e foi proposto que a mutação teria se espalhado entre os séculos XVIII e XIX, na rota entre esses dois estados, conhecida como caminho dos tropeiros (ACHATZ et al., 2008; GARRITANO et al., 2010).

Também ficou evidente que esta mutação predispõe a um amplo espectro de tumores, entretanto ela aparenta ter uma penetrância menor em relação às mutações que alteram o domínio de ligação ao DNA da p53 (ACHATZ et al., 2008; GARRITANO et al., 2010). Além disso, alguns tumores que não são comuns nas famílias SLF/LFL no resto do mundo, como o carcinoma de tireóide e o carcinoma renal, mostraram-se frequentes nas famílias com a mutação R337H (ACHATZ, 2008; ACHATZ; HAINAUT; ASHTON-PROLLA, 2009).

A prevalência dessa mutação foi estimada em grupos controle do Sul do Brasil, onde sua presença foi observada em cerca de 0,3% dos indivíduos (PALMERO et al., 2008; CUSTÓDIO et al., 2013). Dessa forma, a prevalência extraordinariamente elevada de uma mutação patogênica e a ampla gama de cânceres associados a ela representam um desafio para a Saúde pública no Brasil. ACHATZ e colaboradores (2009) avaliaram a possibilidade do teste preditivo para a mutação R337H como triagem neonatal em nosso país, mas concluíram que a mutação ainda não preenche os critérios necessários para este tipo de rastreio. É necessário um estudo mais amplo da prevalência dessa mutação em diferentes regiões do país, e do fenótipo associado a ela, para um melhor entendimento do quanto a mutação contribui para a incidência de câncer no Brasil.

A última atualização da base de dados IARC *TP53* foi realizada em abril de 2016. Até esta data, o número de famílias incluídas na base de dados com mutações germinativas em *TP53* detectadas era de 885. Destas, 38,5% foram relatadas na Europa, 30,5% na América do Norte e América Central, 12,9% na América do Sul, 8,7% na Ásia, 3,3% na Oceania, e 0,1% na África (Figura 1.4). Cinquenta e três famílias (6,0%) não têm a localização geográfica definida.

Das 114 famílias sul-americanas, 113 são brasileiras. Entre elas, 97 apresentam a mutação fundadora R337H. Apenas cinco famílias com essa mutação foram relatadas fora do Brasil. Dessa forma, a mutação R337H representa 85,8% das mutações em *TP53* encontradas em famílias brasileiras, e 10,9% das mutações em *TP53* encontradas em famílias no mundo todo até a última atualização do banco de dados do IARC (PETITJEAN et al., 2007b).

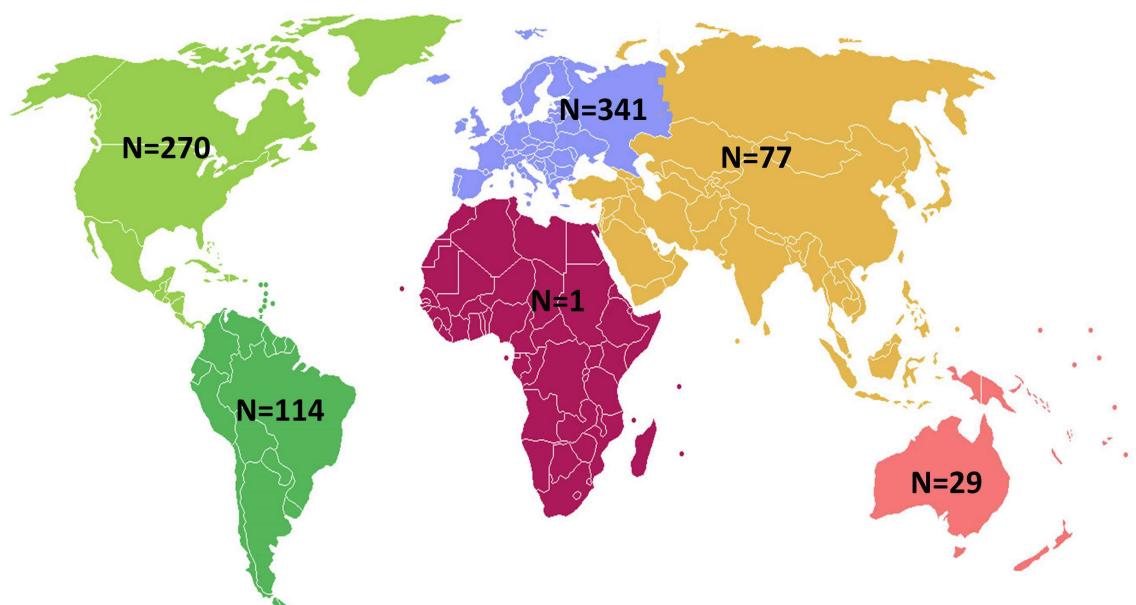


Figura 1.4. Distribuição de famílias com mutação germinativa detectada em *TP53*. Mapa elaborado a partir de dados do IARC *TP53* database versão R18.

1.7 O envolvimento de outros genes na SLF/LFL

O fato de uma proporção considerável de famílias com critérios clínicos para a SLF/LFL não apresentar mutação detectável em *TP53* sugere a existência de outros genes envolvidos na síndrome. Mutações germinativas no gene *CHEK2* (22q11), que codifica uma cinase que fosforila p53, foram relatadas em famílias com história de câncer sugestiva de SLF. Três mutações nesse gene foram relatadas em famílias não relacionadas, e considerou-se o gene *CHEK2* como segundo *locus* da SLF (BELL et al., 1999; VAHTERISTO et al., 2001). No entanto, uma dessas três mutações mostrou se tratar de um erro de análise, enquanto as outras duas revelaram-se polimorfismos que não podiam ser considerados alelos de alta penetrância envolvidos na SLF (SODHA, 2000; MEIJERS-HEIJBOER et al., 2002; CYBULSKI et al., 2009). BACHINSKI e colaboradores (2005) realizaram um estudo de ligação envolvendo 62 indivíduos de quatro famílias SLF sem mutação em *TP53*, e relataram um *locus* de susceptibilidade na região 1q23, mas o possível gene envolvido nessa associação não foi identificado.

O vasto espectro de tumores que ocorrem na SLF/LFL por vezes acarreta em uma sobreposição de fenótipos com outras síndromes de câncer hereditário (SCHNEIDER et al., 2013). Dessa forma, genes associados a algumas dessas síndromes eventualmente podem apresentar mutações em famílias que preenchem principalmente os critérios LFL, por serem menos restritos que os critérios da SLF. SILVA e colaboradores (2012) encontraram uma deleção no gene *BRCA1* em uma família com critérios para síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC) e LFL. De fato, a sobreposição de fenótipos entre essas síndromes já fez com que a investigação de *TP53* fosse sugerida para mulheres com câncer de mama antes dos 30 anos que tivessem resultado negativo para mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, os genes normalmente associados à HBOC (GONZALEZ et al., 2009).

Outros estudos investigaram mutações em genes candidatos importantes das vias de controle do ciclo celular e apoptose em famílias SFL/LFL. Entre eles estão *CHEK1*, *CDKN2A*, *BAX*, *TP63*, *BCL10* e *PTEN*. Mas até o momento, nenhum desses genes foi associado à SLF/LFL (MALKIN, 2011). Resta saber se rearranjos envolvendo esses genes poderiam estar associados à síndrome, já que a maioria das investigações foi realizada por meio de técnicas para investigação de mutações pontuais. Rearranjos envolvendo genes que atuam na modificação de histonas foram recentemente relatados em alguns indivíduos de famílias LFL sem mutação em *TP53* (AURY-LANDAS et al., 2013).

O gene *CDKN1A*, localizado em 6p21.2, é um candidato a alterações plausível na SLF/LFL. A proteína p21, codificada por esse gene, atua imediatamente *downstream* à p53, impedindo a progressão do ciclo celular na fase G1 em resposta a danos ao DNA. Culturas de células que não expressam p21 são deficientes nesse tipo de resposta (WALDMAN; KINZLER; VOGELSTEIN, 1995). Até o momento, não há relatos sobre a investigação da associação desse gene com a SLF/LFL.

As técnicas de sequenciamento em larga escala podem contribuir com a investigação de alterações genéticas em famílias SLF/LFL. As novas tecnologias de sequenciamento nos permitem investigar uma ampla quantidade de genes associados às mais diversas doenças em um curto período de tempo. Em relação ao câncer familiar, a descoberta de variantes de susceptibilidade em múltiplos genes pode servir de base para o desenvolvimento de estratégias de acompanhamento clínico mais precisas dos indivíduos sob risco. Painéis com genes específicos para síndromes de câncer hereditário estão disponíveis para uma investigação mais focada, e investigações mais abrangentes permitem a identificação de novos genes associados a essas síndromes (SAMUEL et al., 2014). Dessa forma, acreditamos que o uso de novas tecnologias será de extrema importância na busca de alterações genéticas em famílias SLF/LFL. A heterogeneidade clínica da síndrome dificulta a investigação de

genes específicos além do *TP53*, e uma abordagem mais ampla e custo-efetiva pode ser uma mais valia na investigação dessas famílias.

Considerando o conhecimento que se tem a respeito da SLF/LFL até o momento, acreditamos que a investigação de indivíduos com suspeita clínica dessa condição é de suma importância. Primeiro, pois o elevado risco de desenvolvimento de câncer em portadores de mutação em *TP53* torna essencial que esses indivíduos sejam identificados e recebam aconselhamento genético. Segundo, para contribuir com a caracterização da epidemiologia da SLF/LFL, que é relevante para o desenvolvimento de estratégias de manejo dos pacientes, especialmente no caso do Brasil, onde a SLF/LFL mostra-se mais prevalente. Por fim, por se tratar de uma síndrome complexa e com elevada heterogeneidade, é um modelo interessante para estudo da predisposição genética ao câncer, especialmente na investigação de mutações em outros genes que possam mimetizar os efeitos de mutações em *TP53*.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral:

Investigar variantes genéticas associadas às características clínicas da Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*

2.2 Objetivos específicos

Investigar a presença de mutações e deleções/duplicações germinativas em *TP53* por sequenciamento de Sanger e MLPA, respectivamente;

Estimar a eficiência dos critérios utilizados para encaminhamento ao teste genético de *TP53*;

Investigar a presença de mutações germinativas em *CDKN1A*, por sequenciamento de Sanger;

Rastrear a mutação R337H de *TP53* não só em indivíduos com suspeita clínica de SLF/LFL, mas também em coortes de indivíduos com diferentes tumores encaminhados ao aconselhamento genético do INCA;

Investigar a presença de mutações potencialmente patogênicas em múltiplos genes associados ao câncer, em indivíduos com critérios clínicos SLF/LFL sem alterações em *TP53* ou *CDKN1A*, por sequenciamento de nova geração;

3 Material e Métodos

3.1 Pacientes

Cinquenta e oito probandos com suspeita clínica de SLF/LFL, não relacionados, participaram deste trabalho. Os pacientes foram convidados a participar deste estudo durante consultas no ambulatório de Aconselhamento Genético do INCA, realizadas entre 2010 e 2013, por profissionais qualificados do Programa de Genética do INCA. Apenas um paciente não realizou acompanhamento no INCA, sendo proveniente da Santa Casa de Belo Horizonte/MG. Os pacientes foram encaminhados tanto do ambulatório adulto quanto pediátrico (que atende pacientes com até 18 anos).

Durante entrevista com os pacientes e/ou seus responsáveis, foram obtidas informações detalhadas sobre a história familiar de câncer de cada um deles. Quando disponíveis, foram acessados documentos que comprovassem os tumores nas famílias dos pacientes, como laudos anátomo-patológicos e relatórios médicos. As histórias familiares de câncer foram então analisadas para classificação de acordo com os critérios SLF/LFL (quadro 1.1, pág. 5). Os probandos foram divididos em dois grupos: os que pertenciam a famílias que preenchiam os critérios de SLF/LFL (Grupo 1), e os que pertenciam a famílias que tinham tumores característicos da síndrome, sem no entanto preencher os critérios (Grupo 2). Após concordância em participar do estudo, os 58 probandos tiveram uma amostra de 2 a 5 mL de sangue periférico coletada para investigação molecular, mediante assinatura (do próprio paciente ou seu responsável legal) de um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexos 1 e 2). Quando possível, familiares de probandos com mutação patogênica detectada foram convidados a participar do estudo, também mediante assinatura de TCLE (Anexo 3). Este estudo é parte do projeto intitulado “Implementação de rede nacional de câncer familiar”, aprovado pelo comitê de ética em pesquisa do INCA sob número de registro 114/07 (Anexo 4).

Três outras coortes de pacientes acompanhadas pelo Aconselhamento Genético do INCA foram incluídas para investigação da mutação R337H de *TP53*: (1) 46 pacientes com tumor de Wilms; (2) 81 pacientes com retinoblastoma; e (3) 126 pacientes com suspeita clínica de câncer de mama e ovário hereditários, com resultados negativos para pesquisa de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As amostras de DNA dessas três coortes estavam disponíveis na Divisão de Genética do INCA, sendo utilizadas concomitantemente para outras investigações acerca do câncer hereditário.

Ao final deste capítulo, encontra-se um fluxograma resumindo as principais etapas deste trabalho (Figura 3.1, pág. 35).

3.2 Extração de DNA de sangue periférico

A extração de DNA de sangue periférico foi realizada pelo protocolo de *salting out*, com modificações (MILLER; DYKES; POLESKY, 1988). Inicialmente, 2 a 5 mL de sangue colhido em EDTA foram vertidos em um tubo Falcon de 50mL. Adicionou-se tampão de lise de hemácias (155mM NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 1mM EDTA, pH 7,4), em quantidade correspondente a 3,5X o volume de sangue. A mistura foi homogeneizada gentilmente e incubada em gelo por 30 minutos, seguida de centrifugação, a 3.000 rpm, por 30 minutos. O sobrenadante foi descartado para isolamento do *pellet* de leucócitos.

Para eliminação dos resquícios de hemoglobina, o *pellet* de leucócitos foi ressuspensão com o uso do *vortex* em 10 mL de tampão de lise de hemácias, para nova lavagem. Realizou-se nova centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi novamente descartado. Foram acrescentados 3 mL de tampão de lise de núcleos (400mM NaCl, 10mM Tris-HCl, 2mM EDTA), e a mistura foi homogeneizada em *vortex*. Adicionaram-se 150µl de SDS 20% (GIBCO®) e 10µl de proteinase K (20mg/ml) (SIGMA®). As amostras foram incubadas em banho-maria a 56°C, por 16 horas. Após esse período, foi adicionado 1 mL de NaCl 5M à amostra, que foi então agitada em *vortex* por 15 segundos, para precipitação das proteínas. Foi realizada centrifugação a 3.000 rpm por 30 minutos, e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo Falcon. Foi realizada nova centrifugação, a 3.000 rpm por 10 minutos, e o sobrenadante foi novamente transferido para outro tubo.

Foi adicionado etanol 100% a 4°C em quantidade correspondente a 2X o volume da amostra, seguido de inversão do tubo para precipitação do *pellet* de DNA. O DNA foi então centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. Realizou-se lavagem do *pellet* com 500µl de etanol 70%, seguida de nova centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o DNA foi mantido em temperatura ambiente por 15 minutos para secar. O DNA foi reidratado em 500µl de água milli-Q® e armazenado em um criotubo a -20°C. Para verificação da integridade do DNA, foi realizada eletroforese em gel de agarose 0,8%, como o corante *GelRed* (Uniscience®), e posterior visualização sob luz UV. Também foi realizada quantificação e verificação dos índices de pureza das amostras com o uso do *NanoDrop ND-1000*®.

3.3 Extração de DNA tumoral

A amostra de tecido tumoral fixado em parafina de uma das pacientes deste estudo foi disponibilizada pelo Banco Nacional de Tumores (BNT) do INCA. A amostra era de um carcinoma fibrolamelar, e a extração de DNA foi realizada com o uso do *QIAamp DNA Mini Kit* (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante.

3.4 Amplificação das regiões de interesse de *TP53*, *CDKN1A* e *MDM2*

Nas amostras de DNA de sangue periférico, foram amplificados, por reação em cadeia da polimerase (PCR), os éxons 2 a 11 do gene *TP53*, e os éxons 2 e 3 do gene *CDKN1A*. O éxon 1 de ambos os genes não é traduzido (JAVELAUD; BESANÇON, 2001; TOLEDO; WAHL, 2006). A presença do SNP rs2279744 (SNP 309) de *MDM2* também foi investigada nos probandos, pelo fato dele ser considerado um modificador de penetrância de mutações em *TP53*.

O quadro 3.1 mostra as sequências dos iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos de *TP53*, obtidas na base de dados IARC *TP53* (PETITJEAN et al., 2007b). O quadro 3.2 mostra os iniciadores utilizados para amplificação dos éxons 2 e 3 de *CDKN1A*, descritos por GRAVINA et al. (2009), e os iniciadores utilizados para amplificação da região 5'UTR de *MDM2*, descritos por PERFUMO et al. (2009).

Em cada reação, foram utilizados: 50-100 ng de DNA genômico; [1X] *Taq Platinum Buffer* (Invitrogen); 1,25 mM de MgCl₂; 0,02 mM de dNTPs; 1,2 µM de cada iniciador (direto e reverso); 1,25 U de *Taq Platinum DNA Polymerase* (Invitrogen); e água milli-Q® em quantidade suficiente para 25 µL.

Quadro 3.1. Iniciadores utilizados na amplificação dos éxons 2 a 11 do gene *TP53*.

Região	Iniciador direto (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')	Tamanho do fragmento
Éxons 2-3	P-558: ccagtgaccaggggtgga	P-338: agcatcaaatcatccattgc	445 pb
Éxon 4	P-326: tgaggacctggtcctctgac	P-327: agaggatcccaagtcca	413 pb
Éxons 5-6	P-236: tgtcactgtgcctgact	P-256: cggaggccactgacaacca	490 pb
Éxon 7	P-333: cttgccacaggtctcccaa	P-313: aggggtcagcggcaagcaga	237 pb
Éxons 8-9	P-314: ttggagtagatggagcct	P-317: actgataagaggtccaag	423 pb
Éxon 10	P-E10Li: caattgtaactgaaccatc	P-562: ggatgagaatggaatctat	260 pb
Éxon 11	P-564: atctctcctcctgcttctg	P-E11Ri: aggctgtcagtggggaacaa	145 pb

Quadro 3.2. Iniciadores utilizados para amplificação dos éxons 2-3 de *CDKN1A* e da região 5'UTR de *MDM2*.

Gene	Região	Iniciador direto (5'-3')	Iniciador reverso (5'-3')	Tamanho do fragmento
<i>CDKN1A</i>	Éxon 2	accagctggaaggagtgaga	gtctttgctgcctacttgc	750 pb
	Éxon 3	tgcggtgatggataaaatca	gaaaggagaacacgggatg	551 pb
<i>MDM2</i>	Região 5'UTR	acgtggctttcggaggttt	ggagacaagtcaggacttaa	347 pb

A reação de amplificação foi realizada por *touchdown*, que consiste na diminuição gradativa da temperatura de anelamento dos iniciadores durante os primeiros ciclos da PCR,

seguida de temperatura de anelamento inespecífica durante os últimos ciclos. O quadro 3.3 mostra as condições utilizadas para todos os fragmentos. Os produtos foram visualizados em gel de agarose a 1,5%, com uso do corante GelRed (Uniscience[®]), sob luz UV.

Quadro 3.3. Condições de amplificação por PCR.

Estágio	Etapas	Nº de Ciclos	Temperatura	Duração
1	Desnaturação inicial	1	94°C	2min 30s
2	Desnaturação	10	94°C	30s
	Anelamento		65°C (-0.5°C/ciclo)	30s
	Extensão		72°C	30s
3	Desnaturação	25	94°C	30s
	Anelamento		51°C	30s
	Extensão		72°C	1min 30s
4	Extensão final	1	72°C	5min

3.5 Sequenciamento direto e análise dos fragmentos

Os fragmentos amplificados por PCR foram sequenciados por meio do *kit Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems[®])*, de acordo com o protocolo do fabricante. O *kit* emprega o uso de dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência. Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 3,2 pmol do iniciador direto ou reverso.

As condições da reação de sequenciamento foram: etapa de desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto; 35 ciclos com desnaturação a 96°C por 15 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 4 minutos; e finalmente extensão a 72°C por 5 minutos. A precipitação dos produtos foi feita com a adição de 40 µL de etanol 65%, seguida de incubação em temperatura ambiente por 15 minutos. Foi realizada centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos, e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 200 µL de etanol 70%, seguido de ressuspensão do *pellet* e nova centrifugação a 13.000 rpm por 20 minutos. O sobrenadante foi novamente descartado e as amostras foram mantidas a 37°C, por cerca de 15 minutos, para secagem do produto.

Os produtos dessa reação foram submetidos à eletroforese capilar na plataforma de sequenciamento *ABI3130xl (Applied Biosystems[®])*. As sequências obtidas foram analisadas no *software SeqMan Pro (LaserGene[®])*. A análise das sequências e nomenclatura das mutações encontradas foi realizada de acordo com as sequências referências obtidas no *GenBank* para *TP53* (NG_017013.2; NM_000546.5; NP_000537.3.), *CDKN1A* (NG_009364.1; NM_078467.2; NP_510867.1), e *MDM2* (NG_016708.1). Todas as alterações não polimórficas encontradas foram confirmadas com uma nova análise por PCR e sequenciamento.

3.6 Investigação de rearranjos por MLPA

Os pacientes com suspeita clínica de SLF/LFL que não apresentaram mutação detectável em *TP53* por sequenciamento foram submetidos à análise de rearranjos desse gene, bem como de outros genes associados ao câncer, com o emprego da técnica de MLPA (*Multiplex ligation probe amplification*), utilizando o *kit* P105 versão D1 (MRC Holland[®]). Este *kit* contém, além de oito sondas para regiões exônicas de *TP53*, sondas para outros genes envolvidos no desenvolvimento tumoral: *EGFR* (11 sondas), *PTEN* (nove sondas), *CDKN2A* (quatro sondas), *PDGFRA* (três sondas), *NFKBIA* (três sondas), *CDK4* (duas sondas), *MIR26A2* (uma sonda) e *MDM2* (duas sondas). O *kit* foi desenvolvido com base nos rearranjos mais frequentes em gliomas, que fazem parte dos tumores típicos da SLF. As reações foram feitas de acordo com as instruções do fabricante.

Após a reação, 0,7 µL de cada produto foram misturados a 0,2 µL de LIZ 500 (*Life Technologies*[®]) e 9,1 µL de formamida Hi-Di (*Life Technologies*[®]). Os produtos foram então desnaturados a 95°C por 3 minutos e imediatamente submetidos à eletroforese capilar na plataforma de sequenciamento *ABI3130xl* (*Applied Biosystems*[®]). As análises foram realizadas por meio do programa *GeneMarker* (*SoftGenetics*[®]).

As amostras com alterações detectadas por MLPA foram investigadas novamente, com o uso de um *kit* diferente (P056 versão C1 – MRC Holland[®]). Essa segunda análise foi realizada em colaboração com o Dr. Pablo Lapunzina e sua equipe, do Instituto de Genética Médica y Molecular (INGEMM), Universidad Autónoma de Madrid, Espanha.

3.7 Análises estatísticas

O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar a frequência de tipos específicos de tumores entre famílias com mutação detectada em *TP53* e sem mutação. Também foi analisada a influência da presença de mutação em *TP53* na sobrevida em 60 meses dos pacientes, pelo método não paramétrico de *Kaplan-Meier*. As comparações entre as curvas de sobrevida foram realizadas pelo teste de *log-rank* com o *software GraphPad Prism*[®]. O tempo de acompanhamento para calcular a sobrevida foi estimado considerando a idade ao diagnóstico do primeiro tumor, até a data da última visita ao hospital, admitindo um máximo de 60 meses. Foram calculados também a sensibilidade, especificidade, os valores preditivos positivo e negativo dos critérios clínicos SLF/LFL quanto à presença de mutações patogênicas em *TP53*.

Os polimorfismos encontrados nos genes *TP53* e *CDKN1A*, bem como o SNP rs2279744 de *MDM2*, tiveram suas distribuições genotípicas avaliadas quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. A razão de chances (*odds ratio*) foi estimada para testar se os genótipos

menos frequentes de cada polimorfismo estavam relacionados ao risco ou proteção nos grupos estudados, com a ajuda do programa *VassarStats* (<http://vassarstats.net/>).

Os resultados de todas as análises foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3.8 Investigação da frequência da mutação R337H de *TP53* em coortes de indivíduos acompanhados pelo Aconselhamento Genético do INCA

Para investigação da frequência da mutação R337H de *TP53*, foram incluídos, além dos 58 probandos com suspeita clínica de SLF/LFL, mais três grupos de pacientes referidos ao Aconselhamento Genético do INCA: 126 pacientes com suspeita clínica de síndrome de câncer de mama e ovário hereditários que tinham resultado negativo para mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*; 46 pacientes com tumor de Wilms; e 81 pacientes com Retinoblastoma. Os dois últimos grupos foram coletados consecutivamente, sem seleção quanto à história familiar de câncer.

A PCR para o éxon 10 de *TP53* foi realizada como descrito no tópico 3.4. Entretanto, para os pacientes nos quais apenas a mutação R337H foi investigada, foi utilizado o método de RFLP (Polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição), com o uso da enzima de restrição *HhaI* (*Life Technologies*[®]). O fragmento correspondente ao éxon 10 de *TP53* possui 260 pb. Quando o alelo selvagem c.1010G está presente, o fragmento é clivado pela enzima *HhaI* em fragmentos de 92 pb e 168 pb. Quando a substituição c.1010G>A está presente, a sequência de reconhecimento da enzima é desfeita, e o fragmento não é clivado.

Para cada reação, foram utilizados: 1 µL de tampão da enzima *HhaI* (concentração final de 1X); 0,5 µL (5U) da enzima; 5,0 µL de PCR; e 5,0 µL de água milli-Q[®]. As amostras foram incubadas a 37°C por 4 horas e então visualizadas em gel de agarose 2% com corante *GelRed* (*Uniscience*[®]). Em todas as reações foram utilizados um controle positivo homocigoto e um heterocigoto para a mutação (GIACOMAZZI et al., 2013a), gentilmente cedidos pela Dra. Patricia Ashton Prolla, coordenadora do Serviço de Oncogenética do Hospital das Clínicas de Porto Alegre.

3.9 Investigação de alterações em genes associados ao câncer por Sequenciamento de nova geração

Foram escolhidos um total de 11 pacientes com critérios clínicos SLF/LFL que não apresentaram mutação em *TP53* ou *CDKN1A* pelos métodos de sequenciamento ou MLPA, para investigação de mutações em múltiplos genes associados ao câncer, por sequenciamento de nova geração. Todos os probandos selecionados apresentavam tumores típicos da SLF, e eram de

famílias que preenchiam pelo menos o critério clínico de Chompret (quadro 1.1, pág. 5), considerado o critério mais sensível quanto à presença de mutações em *TP53*. A análise foi realizada por meio do painel NGHS-501Z (Qiagen[®]), que abrange os éxons e regiões intrônicas flanqueadoras de 124 genes nos quais mutações germinativas e/ou somáticas já foram relacionadas a diversos tipos de câncer. O anexo 5 apresenta a listagem desses genes.

3.9.1 Enriquecimento das regiões de interesse por PCR

O protocolo para uso do kit NGHS-501Z (Qiagen[®]) foi realizado de acordo com instruções do fabricante. O kit inclui oito conjuntos de iniciadores (A1 a A4, B1 a B4) para oito reações de PCR *multiplex* por amostra. Para cada uma das oito reações, foram adicionados 90 ng de DNA, 10 µL de *GeneRead Panel mastermix*, 5µL de um dos conjuntos de iniciadores, e água em quantidade suficiente para completar 20 µL. As amostras foram amplificadas em termociclador por meio do seguinte programa: 95°C por 10 minutos; 20 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 2 minutos; 72°C por 5 minutos; com temperatura final de 4°C. Após a reação, os produtos das oito PCR *multiplex* de cada amostra foram misturados em um único tubo e purificadas com o uso do *QIAquick Purification kit* (Qiagen[®]), para posterior preparo das bibliotecas.

3.9.2 Preparo das bibliotecas para sequenciamento na plataforma Illumina

O preparo das bibliotecas foi realizado em três etapas, resumidas a seguir, de acordo com as instruções do fabricante (Illumina[®]), com adaptações. O protocolo detalhado dessas etapas encontra-se no anexo 6.

Etapa 1 - Reparo das pontas dos fragmentos de DNA: Esse processo converte as pontas sobressalentes dos fragmentos de DNA que possam estar presentes após o enriquecimento por PCR em pontas “cegas”, utilizando um *Mix End Repair*. A atividade exonuclease 3' e 5' nas enzimas desse *mix* remove os nucleotídeos sobressalentes em 3' e a atividade polimerase preenche as pontas 5' sobressalentes.

Etapa 2 - Ligação dos adaptadores: Nessa etapa é realizada a ligação dos múltiplos adaptadores indexadores às pontas dos fragmentos de DNA, preparando-os para a hibridização na *flow cell* do equipamento.

Etapa 3 - Enriquecimento dos fragmentos de DNA: Esse processo usa PCR para enriquecer seletivamente os fragmentos de DNA que tenham adaptadores em ambas as pontas. A PCR é realizada com um conjunto de iniciadores que anelam às pontas dos adaptadores.

As concentrações das bibliotecas obtidas ao final do protocolo foram mensuradas por PCR em tempo real, e um total de 2 nmol de cada biblioteca foi utilizado para clusterização e

sequenciamento com *paired end reads* de 100 pares de bases na plataforma HiSeq2000 (Illumina®).

3.9.3 Análise das sequências

As sequências foram submetidas ao sistema de análise de dados de sequenciamento de nova geração da Qiagen (<http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2>), que integra várias ferramentas de análise. Nesse sistema, o alinhamento das *reads* (fragmentos de leitura) ao genoma de referência (GRCH37, UCSC hg19) foi realizado por meio do programa BWA-MEM (<http://biobwa.sourceforge.net/>). Apenas as *reads* com comprimento igual ou maior a 45 pares de base são mantidas pelo filtro de qualidade. As *reads* muito curtas podem resultar de produtos de PCR não desejados ou baixa qualidade do sequenciamento. As regiões de *primers* são reconhecidas e cortadas da análise até a primeira base após o local de ligação dos *primers*. O sistema também gera estatísticas básicas de cobertura, incluindo o total de *reads* mapeadas, a profundidade mediana de cobertura, e o número de bases-alvos cobertas por pelo menos 10, 30 e 100 *reads*.

O *software* usado para identificação de mutações foi o *GATK Unified Genotyper* (*GATKLite version 2.3–9*). SNPs com frequência menor que 20% e inserções/deleções com frequência menor que 25% foram desconsideradas da análise. Os outros filtros utilizados para SNPs e MNPs (polimorfismos de múltiplos nucleotídeos) foram: FS - *Fisher's exact test for strand bias* (Teste exato de Fisher para viés de fita), para o qual os resultados maiores que 60 foram desconsiderados; MQ - *Mapping quality* (qualidade do mapeamento), para o qual valores menores que 40 foram desconsiderados; HAP - *Haplotype Score* (razão de haplótipos), para o qual valores maiores que 200 foram desconsiderados. Para inserções/deleções, apenas o FS foi utilizado, e os valores maiores que 200 foram desconsiderados. As mutações que não passaram nesses filtros foram consideradas “de baixa confiança”. Apenas as mutações de “alta confiança” foram consideradas para análises posteriores nesse estudo.

3.9.4 Seleção das mutações potencialmente patogênicas

Para dar enfoque às mutações com maiores chances de patogenicidade, foram filtradas as mutações localizadas nos éxons (e não sinônimas) ou sítios de *splicing*, e que tinham baixa frequência alélica na população geral. Dessa forma, as mutações consideradas potencialmente patogênicas foram as que obedeciam a todos os três critérios abaixo, de forma similar ao modelo proposto por YANG e colaboradores (2015):

(1) Mutações localizadas em éxons ou nos sítios doador e acceptor de *splicing* (posições ± 1 e 2); (2) Mutações indels (inserções/deleções) ou substituições não sinônimas,

ou mutações de sítio de *splicing*; (3) Mutações que não ocorram na base de dados do projeto 1000 genomas com uma frequência alélica global maior que 0,01;

Adicionalmente, essas mutações foram investigadas da seguinte forma: *Indels* (inserções/deleções), mutações em sítios de *splicing* e mutações sem sentido seriam consideradas deletérias. Já as mutações de sentido trocado foram analisadas por meio dos seguintes programas *in silico*: (1) Os programas SIFT e *Polyphen* foram utilizados para a predição de patogenicidade causada pela alteração de aminoácido. As mutações foram consideradas deletérias quando algum desses programas a definia como tal; (2) análise do grau de conservação do(s) nucleotídeo(s) trocado(s). Os escores obtidos com os programas *PhyloP* e *PhastCons* foram utilizados para tanto. Esses programas identificam nucleotídeos evolutivamente conservados. Quanto mais conservado um nucleotídeo, maiores as chances de uma mutação naquele sítio ser patogênica.

As mutações de sentido trocado consideradas deletérias nos dois tipos de análise (tanto por alteração do aminoácido quanto por conservação do nucleotídeo) foram consideradas potencialmente patogênicas, e investigadas em bases de dados (*ClinVar*, LOVD, HGMD e BIC) e artigos científicos para obtenção de dados adicionais. Também foram investigadas as vias de sinalização em que os genes com estas mutações atuam em conjunto, através do programa *EnrichR* (KULESHOV et al., 2016).

3.9.5 Validação por sequenciamento de Sanger das mutações encontradas por NGS

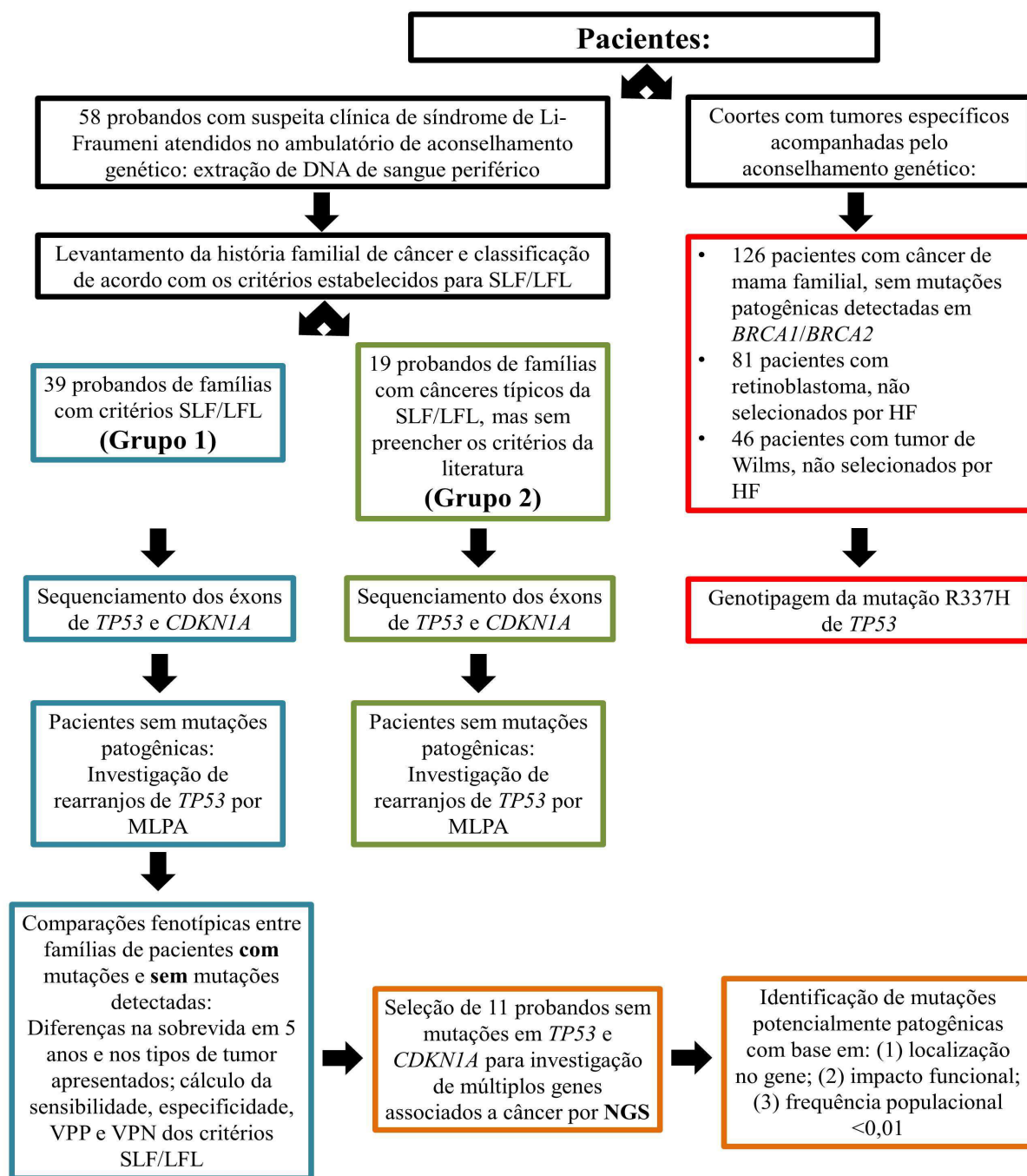
Após a investigação das mutações potencialmente patogênicas e com base em dados da literatura, foram consideradas prioritárias para validação por sequenciamento de Sanger: todas as mutações novas (i.e., não relatadas na literatura científica) encontradas neste estudo, bem como as mutações encontradas nos genes *ATM* e *BRCA1*. Os protocolos de PCR e sequenciamento utilizados foram os mesmos descritos nos tópicos 3.4 e 3.5. O conjunto de iniciadores utilizado para essas reações encontra-se no quadro 3.4.

Quadro 3.4. Iniciadores utilizados para a validação das mutações prioritárias encontradas por NGS.

Mutação	Iniciador senso (5'-3')	Iniciador anti-senso (5'-3')	Tamanho do fragmento (pb)
<i>ATM</i> S49C	atttaagcgcctgattcgag	tgccaaattcatatgcaagg	238
<i>ATM</i> C532Y	ttggcttacttgagccataa	aagtcttctcggccaacaa	246
<i>ATM</i> E2087A	ttaggccttgcaaatgtg	tacctgacggaagtgcaatg	156
<i>BRCA1</i> F1761S	aagctctccttttgaagtc	gtagagaaatagaatagcctct	298
<i>PIK3C2A</i> T1431P	caaatgcttgaacttagcag	acaaccttgctcagcttcgt	250
<i>PTPRC</i> R1107I	tactggggagaaggaagca	ggccttgctgcatagagta	195
<i>SETD2</i> R2040G	ctgggtagatgacggaggag	Tgagttgctgtctgggtct	242
<i>SMO</i> R168G	tgccaagtgtgagaatgac	cagagagcctggacctgtc	181

3.10 Resumo das principais etapas do estudo

A seguir encontra-se um fluxograma indicando as principais etapas desenvolvidas neste trabalho, bem como a ordem de apresentação delas no capítulo de Resultados (Figura 3.1).



Apresentação das diferentes etapas deste trabalho no capítulo de Resultados:

Tópicos 4.1 a 4.5

Tópicos 4.6 e 4.7

Tópico 4.10

Tópicos 4.11 e 4.12

Figura 3.1. Fluxograma das principais etapas deste trabalho. Na base da imagem é mostrada a ordem de apresentação destas etapas no capítulo de Resultados. VPP: valor preditivo positivo; VPN: valor preditivo negativo; HF: história familiar; NGS: sequenciamento de nova geração.

4 Resultados

Este estudo incluiu 58 pacientes, de famílias diferentes, com fenótipos tumorais que levaram à suspeita clínica de SLF/LFL. Após a análise da história familiar de câncer de cada um deles, foram identificados 39 probandos de famílias com critérios clínicos para a SFL/LFL e 17 probandos de famílias sem critérios clínicos para a síndrome. Dois pacientes não possuíam dados de história familiar que possibilitassem sua classificação. As características gerais dos probandos e classificação clínica de suas famílias encontram-se na Tabela 4.1. Dados histopatológicos disponíveis dos tumores dos 58 pacientes encontram-se no Anexo 7.

Tabela 4.1. Características dos 58 probandos com suspeita clínica de SLF/LFL.

Classificação clínica das famílias dos probandos (n=58)	N. (%)	
Critério clássico para SLF	3 (5,2%)*	
Critério LFL – Birch	11 (18,9%)*	
Critério LFL – Chompret	23 (39,7%)*	
Critério LFL – Eeles	33 (56,9%)*	
Famílias sem critérios SLF/LFL	17 (29,3%)	
Probandos sem história familiar disponível para análise de critérios clínicos SLF/LFL	2 (3,4%)	
Tipo de tumor dos probandos (n=79)**	N (%)	Idade média dx
Sarcoma ósseo	16 (20,3%)	15
SPM	14 (17,7%)	21
Pediátrico (exceto tumores típicos da SLF)	9 (11,4%)	8
Mama	8 (10,1%)	45
SNC	4 (5,1%)	18
ADR	2 (2,5%)	6
Leucemia	1 (1,3%)	1
Outros	25 (31,6%)	55

*Existe uma sobreposição para as famílias de 19 probandos, que preenchiam mais de um dos 4 critérios SLF/LFL. ** Foram diagnosticados 79 tumores em 58 probandos.

SLF: síndrome de Li-Fraumeni. LFL: Li-Fraumeni *like*. SPM: Sarcoma de partes moles. SNC: tumor de sistema nervoso central. ADR: tumor adrenocortical. Dx: Idade média ao diagnóstico (em anos).

Os resultados dos grupos serão apresentados separadamente, para uma comparação mais precisa com os dados da literatura. Nos tópicos posteriores, os probandos e suas famílias serão referidos como:

- **Grupo 1 (Grupo SLF/LFL):** probandos de famílias com critérios clínicos para a síndrome de Li-Fraumeni e/ou Li-Fraumeni *like*. Neste grupo foram incluídos 39 pacientes.
- **Grupo 2 (LFL-suspeita):** probandos de famílias sem critérios SLF/LFL. Todas essas famílias tinham pelo menos um caso de tumor típico da SLF. Na maior parte delas, esse tumor ocorreu num indivíduo com menos de 45 anos de idade, e pelo menos um outro caso de câncer em idade precoce também foi relatado, o que levantou a suspeita clínica da síndrome e indicação para o sequenciamento de *TP53*, ainda que não preenchessem os critérios descritos na literatura para a SLF/LFL. No total, 19 pacientes foram incluídos neste grupo.

Os heredogramas de todos os probandos encontram-se no Anexo 8.

4.1 Caracterização clínica dos probandos e familiares de probandos do Grupo 1 (SLF/LFL)

Entre os probandos do Grupo 1, 3/39 (7,7%) apresentaram os critérios familiares clássicos para a síndrome (SLF), e 36 apenas os critérios de LFL (92,3%). Entre os pacientes LFL, 16 preenchem mais de um critério, 2 preenchem apenas os critérios de Birch, 4 preenchem apenas os critérios de Chompret e 14 preenchem apenas os critérios de Eeles.

Entre os 39 probandos, foram relatados 57 tumores, e entre os 156 familiares afetados destes probandos, 163 tumores. Vinte e um dos 39 probandos (53,8%) desenvolveram tumores infanto-juvenis (i.e., até os 18 anos de idade). Entre eles, a idade média de diagnóstico do primeiro tumor foi de 8,9 anos, e entre o grupo de probandos que desenvolveu tumores apenas na idade adulta essa média foi de 48,4 anos. Nenhum dos pacientes ou responsáveis relatou uniões consanguíneas em suas famílias. A maior parte dos indivíduos era do sexo feminino: 59,0% dos probandos (23/39), e 60,3% dos familiares com câncer (94/156). Com relação ao estado de residência, trinta e seis probandos eram residentes no estado do Rio de Janeiro e três de Minas Gerais (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Caracterização epidemiológica dos probandos SLF/LFL e suas famílias.

	Probandos	Familiares com câncer
Sujeitos (n=195)	39 (100%)	156 (100%)
Diagnóstico		
SFL	3 (7,7%)	NA
LFL	36 (92,3%)	NA
Sexo		
Masculino	16 (41,0%)	62 (39,7%)
Feminino	23 (59,0%)	94 (60,3%)
Indivíduos com mais de um tumor primário	9 (23,1%)	7 (4,5%)
Estado de Residência		
Rio de Janeiro	36 (92,3%)	ND
Minas Gerais	3 (7,7%)	ND
Tumores (n=220)	57 (100%)	163 (100%)
Homens	28 (49,1%)	63 (38,7%)
Mulheres	29 (50,9%)	100 (61,3%)
Infanto-juvenis*	24 (42,1%)	12 (7,4%)
Adultos	33 (57,9%)	151 (92,6%)

ND: Não disponível. NA: Não aplicável. *Até os 18 anos de idade.

O número de tumores malignos na família de cada probando variou de 1 a 16, e o número de indivíduos afetados variou de 1 a 15. Entre os nove probandos que apresentaram múltiplos tumores primários (9/39 - 23,1%), sete (17,9%) apresentaram dois tumores, um (2,6%) apresentou cinco tumores primários e um (2,6%) apresentou oito tumores primários. Os sete casos de indivíduos com múltiplos tumores primários dentre os 156 familiares afetados (4,5%) apresentaram dois tumores primários cada um (Tabela 4.2).

O tumor mais frequente entre as famílias dos probandos foi o câncer de mama, constituindo 50 dos 220 (22,7%) tumores relatados, considerando probandos e familiares. Entre os 50 tumores de mama, 26 ocorreram entre os 31 e 50 anos de idade, correspondendo a 11,8% do total de 220 tumores. O câncer colorretal foi o segundo mais frequente (8,2%), seguido das leucemias e linfomas (7,3%). Entretanto, somando os diferentes tipos de sarcoma (incluindo os com localização não especificada), há um total de 22 tumores (10%). Somando as categorias de câncer de pele do tipo melanoma, não melanoma, e não especificado, há um total de 20 tumores, representando 9,1% dos 220 tumores relatados (Tabela 4.3). Dois tumores benignos foram incluídos na amostra: um neurofibroma presente em um probando que havia desenvolvido um rhabdomyosarcoma previamente; e um adenoma adrenocortical, presente em uma probanda que também desenvolveu um osteossarcoma.

Tabela 4.3. Espectro tumoral do Grupo 1 (SLF/LFL), incluindo tumores de probandos e de seus familiares.

Tumores (n=220)	Faixa etária de apresentação do tumor					Total
	0-18 anos	19-30 anos	31-50 anos	51 ou mais	Idade indeterminada	
Mama	0	7 (3,2%)	26 (11,8%)	15 (6,8%)	2 (0,9%)	50 (22,7%)
Colorretal	0	4 (1,8%)	4 (1,8%)	9 (4,1%)	1 (0,5%)	18 (8,2%)
Leucemia/Linfoma	7 (3,2%)	3 (1,4%)	2 (0,9%)	4 (1,8%)	0	16 (7,3%)
Estômago	0	1 (0,5%)	6 (2,7%)	6 (2,7%)	0	13 (5,9%)
SNC	8 (3,6%)	1 (0,5%)	3 (1,4%)	0	0	12 (5,5%)
Osteossarcoma	8 (3,6%)	2 (0,9%)	0	0	0	10 (4,5%)
Próstata	0	0	1 (0,5%)	7 (3,2%)	2 (0,9%)	10 (4,5%)
SPM	5 (2,3%)	0	3 (1,4%)	0	0	8 (3,6%)
Trato genital feminino	0	3 (1,4%)	4 (1,8%)	1 (0,5%)	0	8 (3,6%)
Cabeça e pescoço	0	0	1 (0,5%)	4 (1,8%)	2 (0,9%)	7 (3,2%)
Pele, melanoma	0	3 (1,4%)	0	4 (1,8%)	0	7 (3,2%)
Pele, não especificado	0	0	2 (0,9%)	4 (1,8%)	1 (0,5%)	7 (3,2%)
Pele, não melanoma	0	0	0	6 (2,7%)	0	6 (2,7%)
Câncer ósseo (outros)	1 (0,5%)	0	2 (0,9%)	3 (1,4%)	0	6 (2,7%)
Pulmão	0	1 (0,5%)	1 (0,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	5 (2,3%)
Pâncreas	0	0	1 (0,5%)	2 (0,9%)	1 (0,5%)	4 (1,8%)
Testículo	0	3 (1,4%)	0	0	0	3 (1,4%)
Adrenocortical	2 (0,9%)	0	0	0	0	2 (0,9%)
Fígado	1 (0,5%)	0	1 (0,5%)	0	0	2 (0,9%)
Neuroblastoma	1 (0,5%)	1 (0,5%)	0	0	0	2 (0,9%)
Renal	0	0	0	2 (0,9%)	0	2 (0,9%)
Sarcoma de Ewing	2 (0,9%)	0	0	0	0	2 (0,9%)
Tumor de Wilms	2 (0,9%)	0	0	0	0	2 (0,9%)
Esôfago	0	0	0	1 (0,5%)	0	1 (0,5%)
Neurofibroma	1 (0,5%)	0	0	0	0	1 (0,5%)
Tireóide	0	0	1 (0,5%)	0	0	1 (0,5%)
Câncer não especificado	0	0	4 (0,9%)	1 (0,5%)	10 (4,5%)	15 (6,8%)
Total	38 (17,3%)	29 (13,2%)	62 (28,2%)	71 (32,3%)	20 (9,1%)	220 (100%)

SNC: Tumor de sistema nervoso central; SPM: Sarcoma de partes moles.

4.2 Detecção de mutações germinativas nos probandos do Grupo 1 (SLF/LFL)

4.2.1 Sequenciamento de *TP53*

O sequenciamento das regiões codificantes de *TP53* revelou mutações em heterozigose em seis dos 39 pacientes (15,4%) com critérios clínicos para a SLF/LFL. Todas essas mutações eram do tipo sentido trocado (*missense*), 5 delas do tipo transição e uma transversão. Quatro mutações estavam localizadas entre os éxons 5 e 8, regiões correspondentes ao domínio de ligação ao DNA na proteína p53, e duas no éxon 10, correspondente ao domínio de oligomerização na proteína (Tabela 4.4). A mutação fundadora R337H foi encontrada em apenas um probando, que apresentava um carcinoma adrenocortical.

A base de dados IARC *TP53* versão R18 (PETITJEAN et al., 2007b) foi consultada para verificar a descrição prévia das mutações e seus respectivos impactos funcionais. Estes dados encontram-se na Tabela 4.5. Todas as mutações foram previamente descritas em tumores malignos, como mutações somáticas. Já em linhagem germinativa, cinco mutações já haviam sido descritas em pacientes com a SLF/LFL, e a mutação c.584T<A (I195N) foi detectada pela primeira vez neste estudo. Cinco mutações resultam em proteínas não funcionais, e a mutação R337H resulta numa proteína parcialmente funcional. Todas são consideradas deletérias (Tabela 4.5). Três familiares de dois probandos com mutação detectada aceitaram realizar o teste para investigação da mutação. Eles podem ser observados nas figuras 4.1 e 4.2.

4.2.2 Sequenciamento de *CDKN1A*

Em relação ao gene *CDKN1A*, nenhum dos 39 probandos investigados apresentou mutação patogênica nas regiões investigadas.

4.2.3 Análise por MLPA

Entre os probandos com resultado normal no sequenciamento (n=33), a análise de deleções/duplicações por MLPA foi possível para 30 deles. Os pacientes para os quais não foi possível realizar essa análise foram os pacientes #18, #70 e #71. Dois dos 30 pacientes apresentaram deleções em heterozigose no gene *TP53*: o paciente #49 apresentou uma deleção que abrangia os éxons 2 a 4 (região que tem aproximadamente 628 pares de bases), e a paciente #53 apresentou uma deleção no éxon 8 (éxon com 136 pares de bases) (Tabela 4.4). Essas alterações não se encontram relatadas na base de dados IARC *TP53*. Não foram observadas alterações em nenhuma das sondas correspondentes aos outros genes contidos no kit de MLPA utilizado (*EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A*, *PDGFRA*, *NFKBIA*, *CDK4*, *MIR26A2* e *MDM2*). As duas amostras com deleções detectadas foram submetidas a uma nova análise de MLPA, por meio de um *kit* diferente, que também incluía sondas para o gene *TP53*. Os mesmos resultados foram observados.

Tabela 4.4. Mutações patogênicas detectadas em *TP53* no Grupo 1 e características clínicas de seus portadores.

Probando	Sexo	Tipo de alteração	Éxon(s)	Alteração DNA	Alteração Proteína	Tumores (Dx)	Tumores nos familiares (Sexo – Dx)	Diagnóstico clínico			
								SLF	LFL-B	LFL-C	LFL-E
#49	M	Grande deleção	2 – 4	Deleção E2-4	p.?	LNH (3), OS (17), OS (25), MEL (27), LMS (33)	Colorretal (M-31)			✓	
#50	M	Missense	5	c.524G>A	R175H	OS (14)	Próstata (M-65)				✓
#28	F	Missense	6	c.584T>A	I195N	RMS (3)	Próstata (M-58), Mama (F-34)	✓	✓	✓	✓
#12	M	Missense	6	c.659A>G	Y220C	RMS (2), NF (9)	OS (M-29*), SNC (M-14), Mama (F-23)	✓	✓	✓	✓
#36	F	Missense	7	c.742C>T	R248W	ADR (<1), OS (11)	Colorretal (F-46, F-<30, F-20, M-25)			✓	
#53	F	Grande deleção	8	Deleção E8	p.?	OS (14)	Próstata (M- >60), Testículo (M-25), Estômago (M-35), Leucemia (F-22), Pulmão (F-40)				✓
#35	M	Missense	10	c.1009C>T	R337C	OS (16)	Mama (F-29), RMS (F-6), Pulmão (M-ND)	✓	✓	✓	✓
#25	M	Missense	10	c.1010G>A	R337H	ADR (12)	ND			✓	

Sequências referências: Genbank NP_000537.3 e NM_000546.5. Dx: Idade ao diagnóstico. M: Masculino; F: Feminino; SLF: Critérios clássicos para a síndrome de Li-Fraumeni; LFL-C: Li-Fraumeni *like* - critérios de Chompret; LFL-B: Li-Fraumeni *like* - critérios de Birch; LFL-E: Li-Fraumeni *like* - critérios de Eeles. ND: Não disponível. ADR: tumor adrenocortical; LNH: Linfoma não Hodgkin; LMS: Leiomiossarcoma; MEL: melanoma; NF: Neurofibroma; OS: Osteossarcoma; RMS: Rbdomiossarcoma; SNC: tumor de sistema nervoso central. *Familiar testado e também portador da mutação. Tumores em negrito ocorreram no mesmo indivíduo.

Tabela 4.5. Impacto funcional das alterações patogênicas em *TP53* encontradas no Grupo 1 (LFS/LFL).

Mutação	Atividade transcricional de p53	Evidências de efeito dominante negativo	Evidências de ganho de função	Número de relatos na base IARC	
				Germinativa	Tumores
Deleção E2-4*	-	-	-	-	-
R175H	Não funcional	Sim	Sim	75	1216
I195N	Não funcional	ND	ND	0	21
Y220C	Não funcional	Sim	Sim	38	402
R248W	Não funcional	Sim	Sim	88	739
Deleção E8*	-	-	-	-	-
R337C	Não funcional	Não	ND	8	20
R337H	Parcialmente funcional	ND	ND	127	4

Referência: Base de dados IARC *TP53* R18. Os dados de atividade transcricional foram obtidos por ensaios funcionais de KATO et al. (2003). ND: Não disponível. *Este estudo.

4.3 Descrição clínica dos probandos com mutação do Grupo 1 e suas respectivas famílias

Os dados obtidos por meio das técnicas de sequenciamento de Sanger e MLPA permitiram o diagnóstico molecular de 8/39 (20,5%) dos probandos de famílias com critérios SLF/LFL. A seguir será apresentada a descrição clínica desses probandos e suas famílias.

4.3.1 Probando #12

A família do probando #12 possuía critérios clássicos para a SLF, com cinco indivíduos com câncer ao longo de quatro gerações (Figura 4.1). O probando teve um rabdomiossarcoma e um neurofibroma. Seu tio paterno havia falecido com um tumor cerebral aos 14 anos, e o pai havia desenvolvido osteossarcoma aos 29. Além disso, sua bisavó paterna havia falecido com câncer de mama aos 21 anos. Após o diagnóstico molecular do probando, o pai e um tio do mesmo optaram pela realização do sequenciamento de *TP53*. O pai apresentou a mesma mutação do filho (Y220C, no éxon 6), e o tio, que não possuía história de câncer, não era portador da mutação.

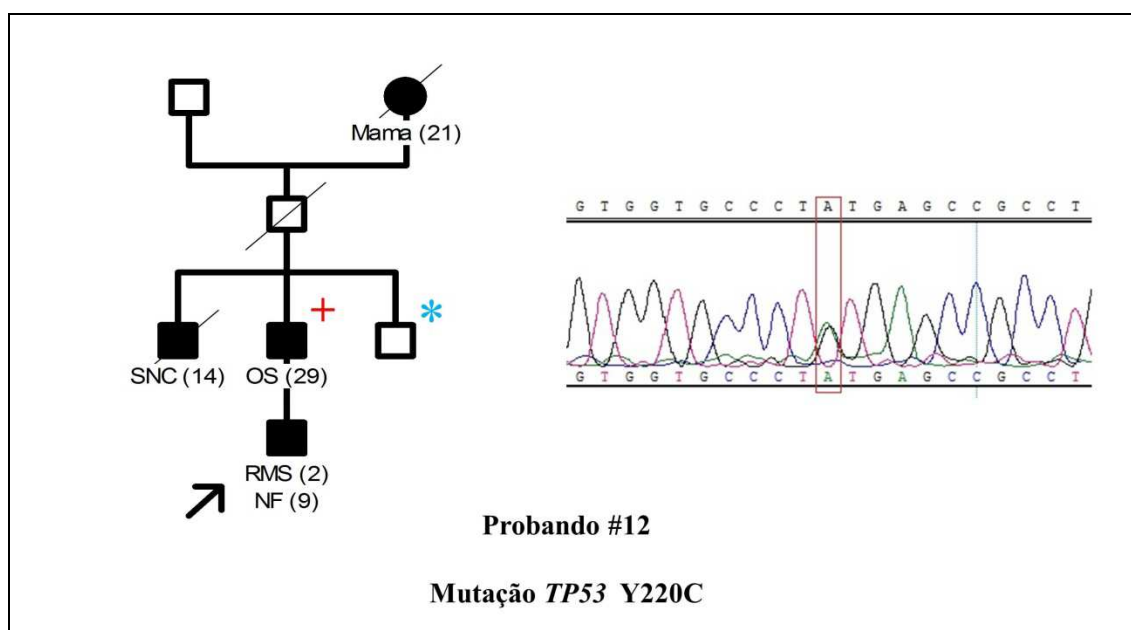


Figura 4.1. Heredograma da família do probando #12. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA do probando. A cruz vermelha indica um indivíduo também portador da mutação; o asterisco azul indica um indivíduo sem a mutação. OS: Osteossarcoma; SNC: tumor de sistema nervoso central; RMS: Rabdomiossarcoma; NF: Neurofibroma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.2 Probando #25

O probando #25 apresentou um carcinoma adrenocortical aos 12 anos de idade, fato que por si só, de acordo com os critérios de Chompret, já estabelece indicação para a realização do sequenciamento de *TP53*, que neste caso revelou a mutação R337H. A mãe então optou pela realização do mesmo teste, porém apresentou apenas alelos selvagens para o

éxon 10 de *TP53* (Figura 4.2). A mãe não possuía contato com o pai da criança, e não tinha informações sobre a história familiar de câncer do mesmo.

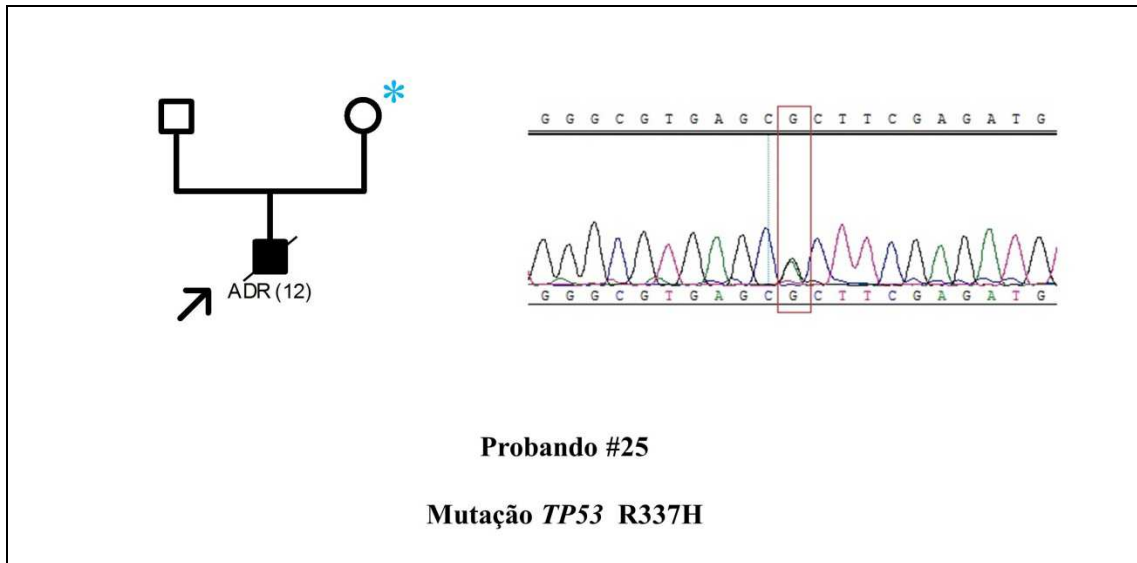


Figura 4.2. Heredograma da família do probando #25. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA do probando. O asterisco azul indica um indivíduo sem a mutação. ADR: Carcinoma adrenocortical. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.3 Probanda #28

A família da probanda #28 apresentou três casos de câncer, sendo dois típicos da síndrome (sarcoma de partes moles aos 3 anos de idade na probanda e câncer de mama aos 34 anos de idade em uma tia paterna), e o terceiro, um câncer de próstata no pai da probanda, aos 58 anos (Figura 4.3). A família tinha todos os critérios LFL da síndrome: Birch, Chompret e Eeles. A probanda apresentou uma mutação no éxon 6 de *TP53* (I195N), que até o momento só havia sido descrita em amostras tumorais.

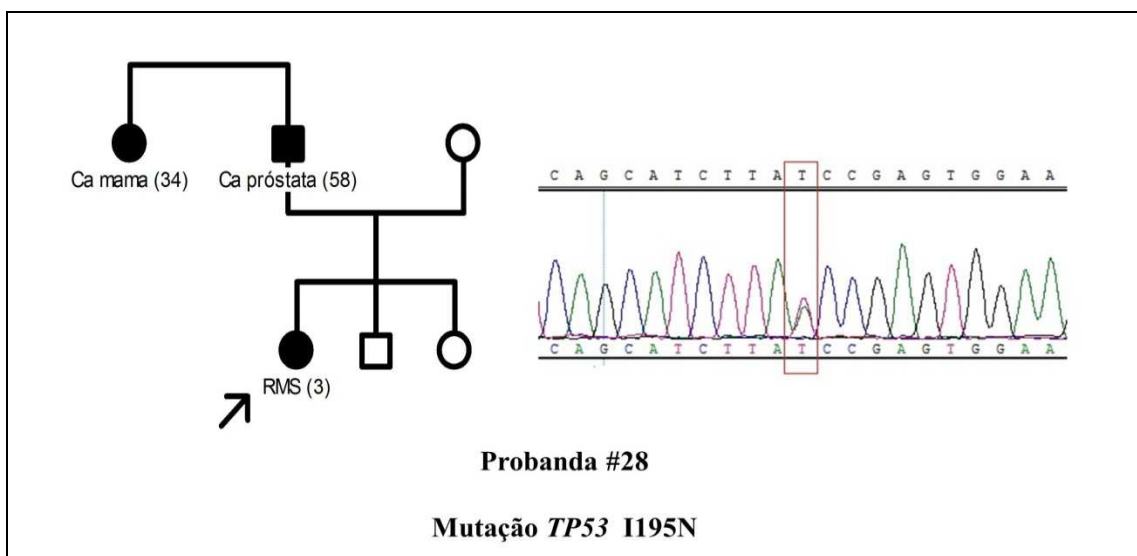


Figura 4.3. Heredograma da família da probanda #28. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA da probanda. Ca: câncer; RMS: Rbdomiossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.4 Probando #35

A amostra do probando #35 foi encaminhada da Santa Casa de Belo Horizonte para realização das investigações moleculares. A família apresentava critérios clínicos clássicos para a síndrome, com três tumores típicos em duas gerações: um osteossarcoma (no probando), um sarcoma de partes moles (na irmã) e um câncer de mama (na mãe) (Figura 4.4). Além desses, o tio materno do probando havia falecido com câncer de pulmão. O probando apresentou a mutação R337C, no éxon 10 de *TP53*.

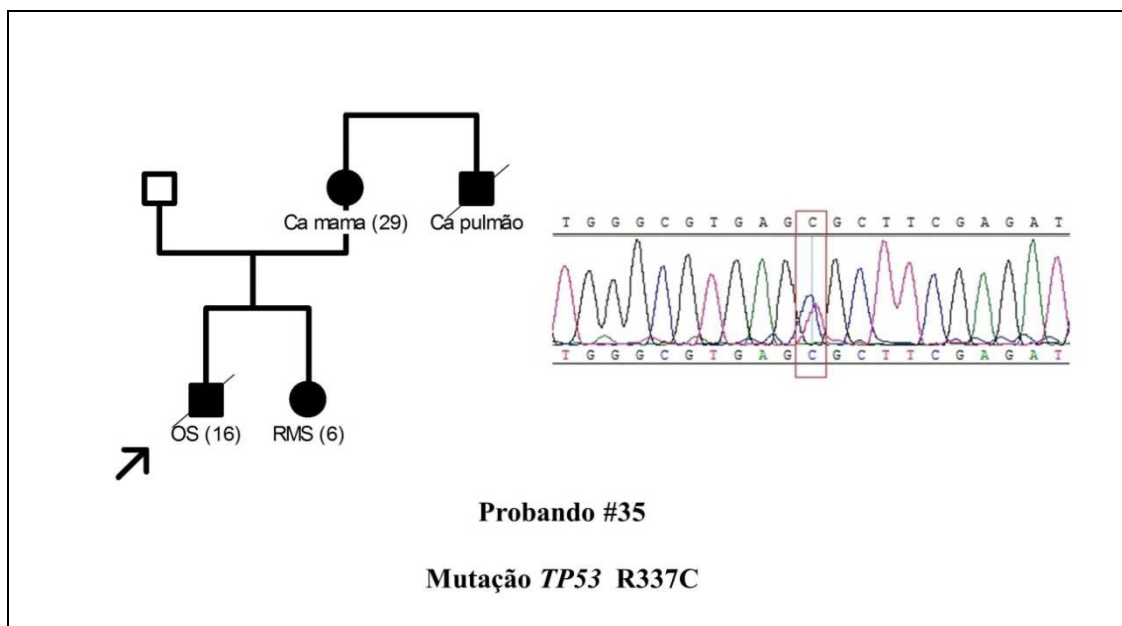


Figura 4.4. Heredograma da família do probando #35. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA do probando. Ca: câncer; OS: Osteossarcoma; RMS: Rabdomiossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.5 Probando #36

A probanda #36 foi incluída neste estudo por sua história pessoal de câncer. Ela teve um tumor adrenocortical antes de completar um ano de idade, e um osteossarcoma aos 11 anos. Não possuía parentes em primeiro ou segundo grau com câncer, mas havia quatro casos de câncer colorretal em idade precoce (antes dos 50 anos) em parentes de terceiro e quarto grau (Figura 4.5). A probanda apresentou a mutação R248W de *TP53*.

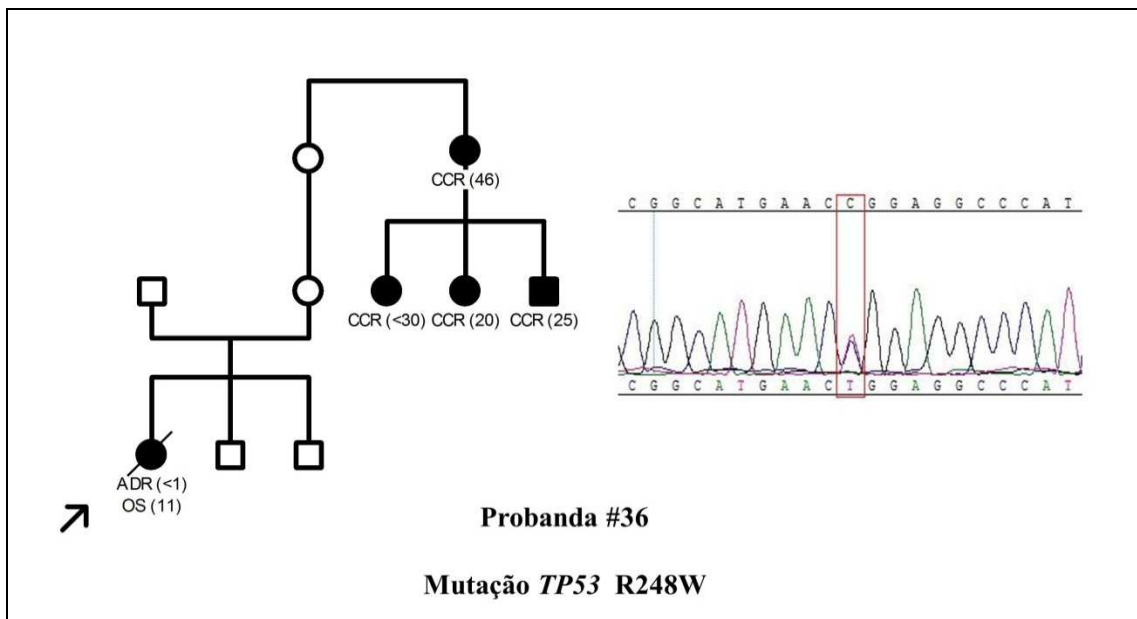


Figura 4.5. Heredograma da família da probanda #36. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA da probanda. ADR: Tumor adrenocortical (adenoma); OS: Osteossarcoma; CCR: Câncer colorretal. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.6 Probando #49

O probando #49 apresentou cinco tumores primários até os 33 anos de idade, sendo que quatro deles eram tumores típicos da síndrome. Dessa forma, ele foi incluído pela história pessoal de câncer, de acordo com os critérios de Chompret. O MLPA nesse paciente revelou deleções em heterozigose em sondas referentes aos éxons 2 e 4 de *TP53*. Não havia sondas para o éxon 3 de *TP53* no kit utilizado. Porém, levando em conta o fato do éxon 3 ser o menor de *TP53*, com apenas 22 pb, e a distância entre os éxons 2 e 4 ser igual a 253 pb, concluiu-se que a deleção abrangia toda a região do éxon 2 a 4. Esse paciente apresentou apenas um familiar com câncer: o pai havia falecido com câncer colorretal aos 31 anos (Figura 4.6).

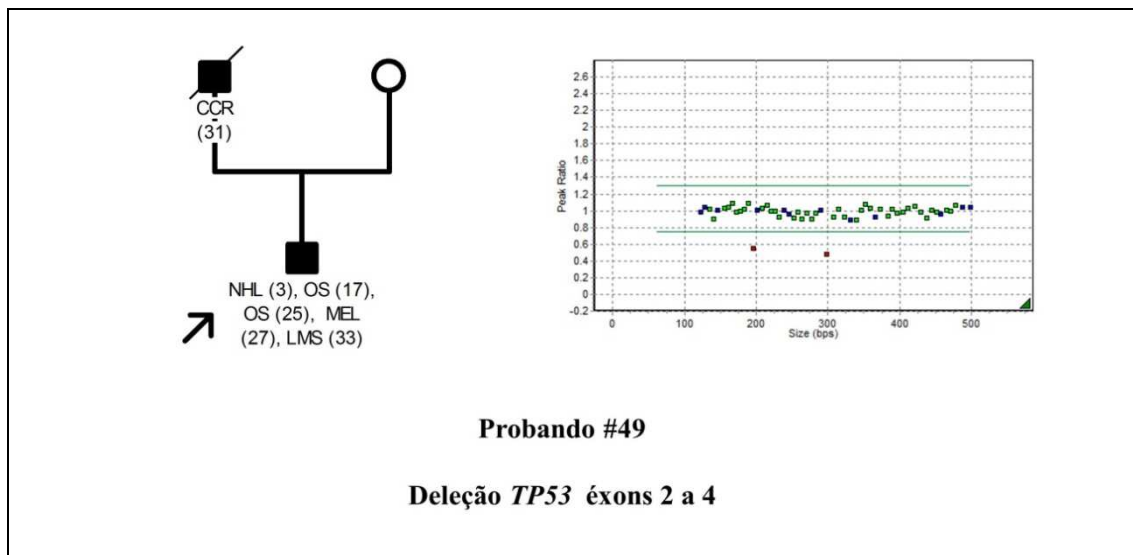


Figura 4.6. Heredograma da família do probando #49. À direita está apresentada a análise de MLPA da amostra de DNA do probando. Os pontos vermelhos no gráfico representam sondas para os éxons 2 e 4 do gene *TP53*, evidenciando uma deleção em heterozigose nessa região. NHL: Linfoma não Hodgkin; OS: Osteossarcoma; MEL: melanoma; LMS: Leiomiossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.7 Probando #50

A família do probando #50 apresentava apenas critérios LFL de Eeles para inclusão no estudo. O paciente teve um osteossarcoma aos 14 anos de idade, e seu avô materno havia falecido com câncer de próstata aos 65 anos (Figura 4.7). O paciente apresentou a mutação R157H, no éxon 5 de *TP53*.

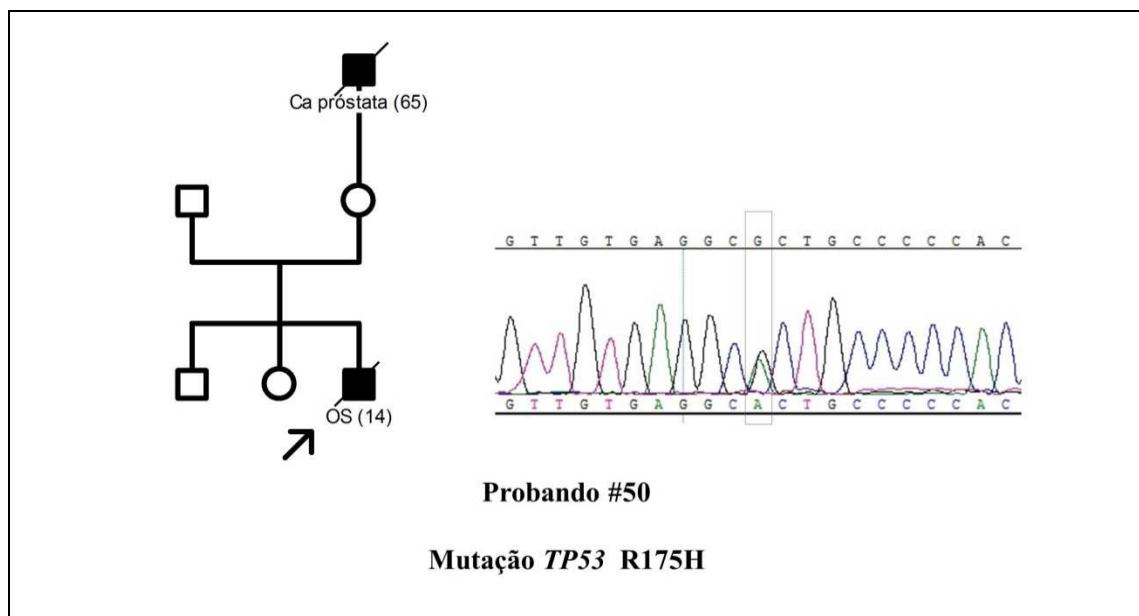


Figura 4.7. Heredograma da família do probando #50. À direita está apresentado o eletroferograma da mutação detectada na amostra de DNA do probando. Ca: câncer; OS: Osteossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.3.8 Probando #53

A família da probanda #53 apresentou apenas critérios LFL de Eeles para inclusão: dois familiares, um com leucemia e outro com câncer de próstata, relacionados em segundo grau (Figura 4.8). A probanda não possuía familiares em primeiro e segundo grau com câncer, apenas em terceiro e quarto grau, e havia desenvolvido um osteossarcoma aos 14 anos. A paciente apresentou uma deleção em heterozigose no éxon 8 de *TP53*. O sequenciamento do éxon 8 de *TP53* nessa probanda não revelou nenhum polimorfismo ou outra alteração que pudesse alterar a afinidade da sonda de MLPA nessa região.

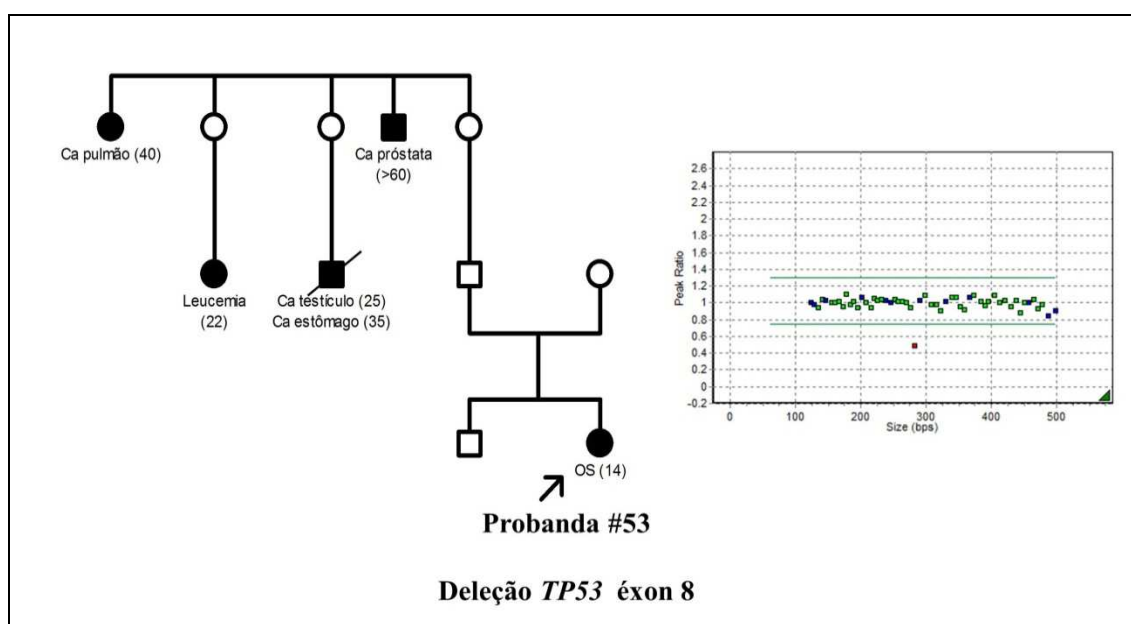


Figura 4.8. Heredograma da família da probanda #53. À direita está apresentada a análise de MLPA da amostra de DNA da probanda. O ponto vermelho no gráfico representa uma sonda para o éxon 8 do gene *TP53*, evidenciando uma deleção em heterozigose. Ca: câncer; OS: Osteossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.4 Análise dos critérios clínicos em relação aos achados moleculares em *TP53*

Diante dos achados clínicos e moleculares no Grupo 1, foram avaliados os critérios clínicos da SLF/LFL com o intuito de averiguar sua sensibilidade, especificidade, e valores preditivos positivo e negativo em relação à detecção de alterações em *TP53*.

Entre os quatro critérios clínicos utilizados para classificação desses pacientes, o critério de Chompret mostrou-se o mais sensível na detecção de portadores de mutação em *TP53*, já que seis dos oito pacientes que apresentavam mutação (75%) preenchiam este critério. Dentre estes seis pacientes, três foram incluídos apenas por sua história individual de câncer (pacientes #25, #36 e #49). Os pacientes #25 e #36 apresentavam tumor adrenocortical, e o paciente #49 apresentou múltiplos tumores primários, incluindo tumores

típicos da SLF. Já o critério clássico para a SLF mostrou-se o mais específico, pois entre 31 pacientes sem mutação detectada, 30 (97%) não preenchiam esse critério (Tabela 4.6).

Tabela 4.6. Pacientes do Grupo 1 com e sem mutação detectável em TP53, em relação aos critérios clínicos da síndrome de Li-Fraumeni.

	Diagnóstico clínico (n=39)*			
	SLF (n=3)	LFL-B (n=11)	LFL-C (n=23)	LFL-E (n=33)
Pacientes com mutação (n=8)	2	3	6	5
Pacientes sem mutação (n=31)	1	7	17	28
Sensibilidade	25%	38%	75%	63%
Especificidade	97%	77%	45%	10%
Valor preditivo positivo	67%	27%	26%	15%
Valor preditivo negativo	83%	82%	88%	50%

*19 probandos pertenciam a famílias que preenchiam mais de um dos 4 critérios. SLF: Critérios clássicos para a síndrome de Li-Fraumeni; LFL-C: Li-Fraumeni *like* - critérios de Chompret; LFL-B: Li-Fraumeni *like* - critérios de Birch; LFL-E: Li-Fraumeni *like* - critérios de Eeles.

Ao somarmos os tumores presentes nos probandos com mutação detectada aos tumores de seus familiares, temos um total de 33 tumores. O mais comum deles foi o osteossarcoma (21,2%), seguido por câncer colorretal (15,2%) e sarcoma de partes moles (12,1%). Câncer de mama e próstata representaram, cada um, 9,1% destes tumores, e os cânceres hematológicos (leucemias/linfomas), de pulmão, e adrenocorticais representaram, cada um, 6,1%. Já os tumores de sistema nervoso central, estômago, melanoma, testículo e neurofibroma representaram, cada um, 3,0% (um caso de cada).

A Figura 4.9 mostra uma comparação entre as porcentagens dos diferentes tumores nas famílias de probandos com mutação e sem mutação. Houve um excesso de osteossarcomas nas famílias de probandos com mutação em relação às famílias sem mutação (21,2% *versus* 1,6%, $p=0,00008$). O mesmo foi observado para sarcomas de partes moles (12,1% *versus* 2,2%, $p=0,019$), e tumores adrenocorticais (6,1% *versus* 0%, $p=0,0219$). A ocorrência de câncer colorretal, de mama, próstata, leucemias/linfomas, câncer de pulmão, de estômago, testículo, de sistema nervoso central e de neurofibroma não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A Tabela 4.7 mostra a caracterização clínica dos 31 probandos que não tiveram mutação detectada em TP53, embora a análise por MLPA não tenha sido obtida para três deles.

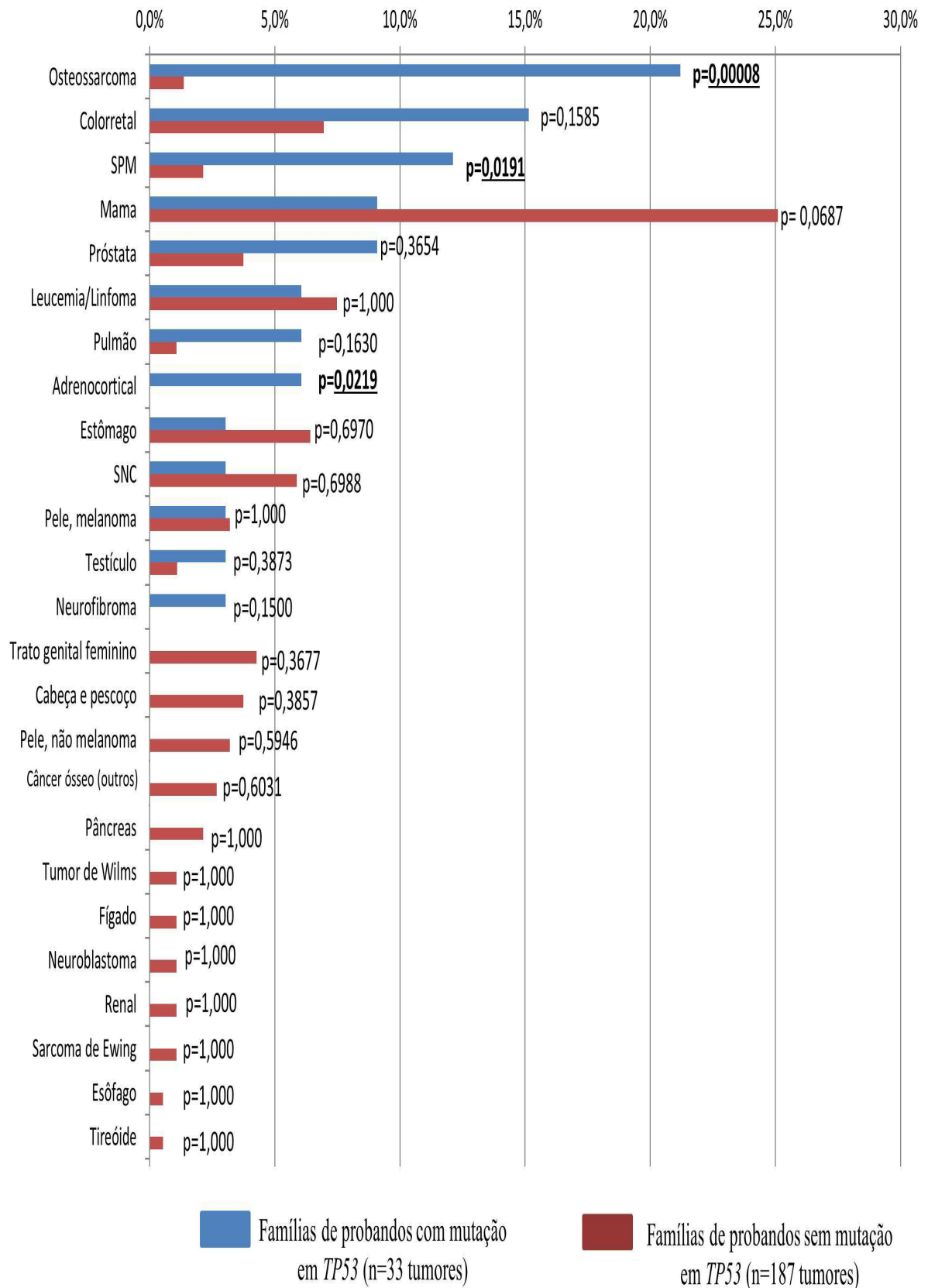


Figura 4.9. Porcentagens de diferentes tipos de tumores entre famílias de probandos com mutação e sem mutação detectada em TP53. Os valores de p são referentes ao teste exato de Fisher, para determinar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

Tabela 4.7. Características clínicas dos 31 probandos do Grupo 1 (SLF/LFL) sem mutação patogênica detectada em TP53.

Probando	Sexo	Tumores no probando (Dx)	Tumores nos familiares (Sexo – Dx)	LFS	Critério clínico		
					LFL-B	LFL-C	LFL-E
#01	F	Sinoviossarcoma (15)	Mama (F-36, F-38)			✓	✓
#02	M	Renal (54)	Laringe (M-63), Mama (F-<50, F-<50), Ósseo (M->70)				✓
#05	M	NB (21)	Mama (F-51, F->60), Colorretal (M-55), Pulmão (M-90)				✓
#06	F	Meduloblastoma (9), OS (15)	Estômago (M-39), Abdominal (F-<50)			✓	
#09	F	Mama (47)	SNC (F-25), Mieloma (M-59), Mama (F-30, F-30, F-44, F-50), Tuba uterina (F-44), Próstata (M-50), Ósseo (F-<50), Abdominal (F-ND, F-N/A, F-ND, F-ND)		✓	✓	✓
#10	M	OS (18)	Mama (F-40)			✓	✓
#15	F	Mama (62), Renal (62)	SNC (F-33), Mama (F-61, F-89, F-45, F->70), Colorretal (F-57), Garganta (M-60, M->70), Estômago (M-55, F-65, M-60), Ósseo (F->90), Pele (F-50), Sarcoma (M-40)		✓	✓	✓
#17	F	Lipossarcoma (47), Ependimoma (49)	Mama (F<35), Câncer não especificado (M-ND)			✓	✓
#18*	F	Colorretal (45)	Estômago (F-65, M-62), Pele (F->70), Esôfago (M-53), Câncer não especificado (M-54, M-ND) Colorretal (F-63, M-22), Linfoma de Hodgkin (M-40), Melanoma (M-23), Leucemia (F->70, M-12), SNC (M-47)		✓	✓	✓
#19	F	EWS (10)	Leucemia (F-72), Mama (F-27)				✓
#20	F	Mama (39)	Condrossarcoma (F-35), Próstata (M->60)			✓	✓
#21	M	EWS (3)	Mama (F-50), Pulmão (M-28)			✓	✓
#22	F	Mama (54), Melanoma (54)	Próstata (M-60), Mama (F-67), Útero (F-26)				✓
#23	F	Colorretal (69)	Cervical (F-30), Mama (F-46, F-40, F-ND), Pele (F-51), Leucemia (F-66), Garganta (M-ND)				✓
#26	F	TW (4)	Pâncreas (F-82), SNC (F-14)				✓
#29	M	Próstata (63), Colorretal (68), CEC (71, 73, 74, 75), CCB (76, 77)	Melanoma (M-65), Laringe (F-40), Útero (F-47), Pele (M-ND), Fígado (M-50)				✓

Probando	Sexo	Tumores no probando (Dx)	Tumores nos familiares (Sexo – Dx)	LFS	Critério clínico		
					LFL-B	LFL-C	LFL-E
#33	F	Mama (45), DMSP (48)	Melanoma (F-63) Colorretal (F-60), Pâncreas (M-ND), Mama (F-38, F-60, F-92, F-59)			✓	✓
#41	F	Mama (42)	Leucemia (F-10), Mama (F-48)		✓	✓	✓
#46	F	Mama (22)	Mama (F-37), Pele (M-50), Estômago (M-50)				✓
#47	F	CHC (17)	Teratoma imaturo (M-26), Garganta (F-ND), Mama (F-ND), Câncer não especificado (F-ND)		✓		
#51	F	Oligodendroglioma (9)	Mama (F-<40)			✓	✓
#54	M	LLA (1)	Tireóide (M-42), Próstata (M-60, M-ND), Útero (F>60), Câncer não especificado (F-ND)				✓
#60	M	Neuroblastoma (2)	Mama (F-36), Pâncreas (F-<60), Ósseo (M-<10)				✓
#61	M	Colorretal (34)	Testículo (M-25), Mama (F-37, F->60), Útero (F-37), Ovário (F-35, F-30), Pele (F-55), Estômago (F-40, M->50, M-30), Pâncreas (F-<40), Leucemia (F-40)			✓	✓
#62	M	TW (5)	SNC (F-2, M-3), Estômago (M-42), Câncer não especificado (F-50)		✓		
#64	F	Colorretal (60)	Linfoma (M-29, M-15), Próstata (M-ND), Mama (F-82, F-82, F-30), Estômago (M-<40)				✓
#65	M	RMS (15)	Mama (F-28), SNC (M-6), Pulmão (F->50)	✓	✓	✓	✓
#68	F	Melanoma (76)	Melanoma (F-20, M-40), Colorretal (F-83), Garganta (M-60), Pele (M-60)				✓
#69	F	Colorretal (68)	Leucemia (F-17), Mama (F-55)			✓	✓
#70*	F	Osteossarcoma (12)	Mama (F-31, F-50)			✓	✓
#71*	M	LNH (25)	SNC (M-<18), Leucemia (M-6), Colorretal (F-ND), Ca não especificado (M-ND, M-ND, F-ND)		✓	✓	✓

Dx: Idade ao diagnóstico. M: Masculino; F: Feminino; SLF: Critérios clássicos para a síndrome de Li-Fraumeni; LFL-C: Li-Fraumeni *like* - critérios de Chompret; LFL-B: Li-Fraumeni *like* - critérios de Birch; LFL-E: Li-Fraumeni *like* - critérios de Eeles. ND: Não disponível.

LLA: Leucemia linfóide aguda; CCB: Carcinoma de células basais; SNC: Sistema nervoso central; DFSP: Dermatofibrossarcoma protuberans; EWS: Sarcoma de Ewing; CHC: Carcinoma hepatocelular; LNH: Linfoma não-Hodgkin; OS: Osteossarcoma; RMS: Rabdmiossarcoma; CEC: Carcinoma de células escamosas; TW: Tumor de Wilms.

Tumores em negrito ocorreram no mesmo indivíduo. *Pacientes para os quais não foi possível a obtenção de resultados por MLPA.

4.5 Sobrevida global em 60 meses dos probandos do Grupo 1

Para avaliar o impacto das mutações em *TP53* na sobrevida em 60 meses dos pacientes, foram comparadas as curvas de sobrevida dos probandos com e sem mutação patogênica em *TP53* do Grupo 1, pelo teste *log-rank*, utilizando o estimador de *Kaplan-Meier*. A sobrevida dos probandos sem mutação detectada (n=31) foi de 85,7% versus 50,0% nos pacientes com mutação em *TP53* (n=8), diferença estatisticamente significativa (p=0,0196) (Figura 4.10).

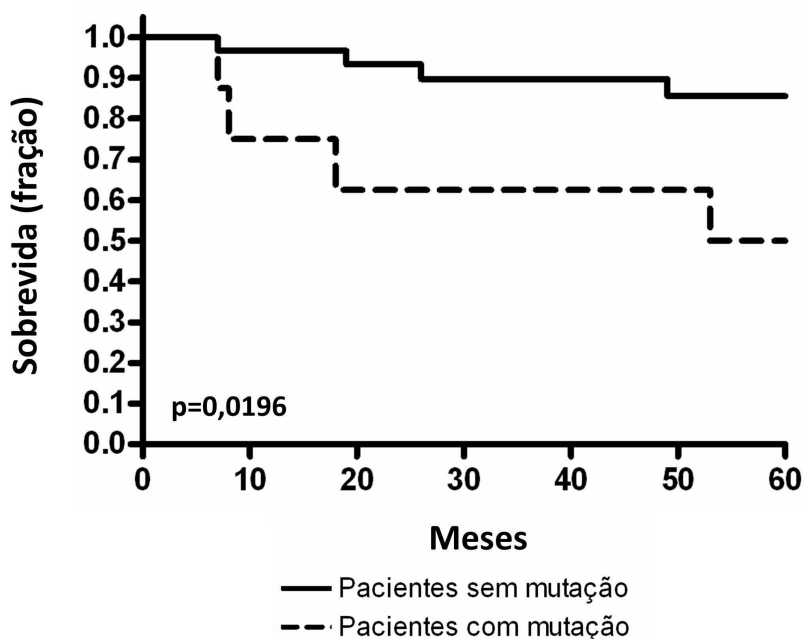


Figura 4.10. Sobrevida global em 60 meses de pacientes do grupo 1 (SLF/LFL) com e sem mutação em *TP53*.

4.6 Caracterização clínica do Grupo 2 (suspeita de SLF/LFL)

Dezenove probandos foram incluídos no estudo por suspeita clínica de SLF/LFL, entretanto não preenchiam os critérios usuais para a síndrome. Todos os probandos nesse grupo apresentaram o primeiro tumor antes dos 45 anos de idade. Catorze desses indivíduos possuíam tumores típicos da síndrome; os outros cinco apresentavam algum familiar com tumor típico. Neste grupo, foram relatados 22 tumores em 19 probandos, e 48 tumores em 47 familiares. Os tumores mais comuns foram os sarcomas de partes moles (8/70; 11,4%) especialmente até os 17 anos (5/70; 7,1%), e câncer de mama (8/70; 11,4%), seguidos por câncer colorretal, de estômago e leucemias/linfomas, cada um correspondendo a 8,6% (6/70) do total.

Entre os probandos com tumores infanto-juvenis, a média de idade ao diagnóstico do primeiro tumor foi de 11,8 anos, e entre os adultos foi de 32,3 anos. A caracterização

epidemiológica e espectro tumoral dos probandos deste grupo e de suas famílias encontram-se nas Tabelas 4.8 e 4.9. Já a Tabela 4.10 detalha a história individual e familiar de câncer de cada um dos 19 probandos.

Quinze probandos desse grupo tinham uma característica em comum: ao menos um caso na família de câncer típico da síndrome até os 45 anos de idade, e ao menos um outro caso de câncer (de qualquer tipo) até os 45 anos de idade. Entretanto, os indivíduos afetados não necessariamente eram relacionados em primeiro ou segundo grau, como determinam os critérios LFS/LFL.

Dois dos probandos neste grupo possuíam informações restritas sobre a história familiar de câncer: a mãe do paciente #07 era adotada e a mãe da paciente #27 não conhecia a história familiar do pai da probanda. Esses dois probandos desenvolveram sarcomas na infância. Outros dois probandos (#24 e #59) foram indicados a participar do estudo por terem desenvolvido múltiplos tumores primários, porém sem preencher os critérios de Chompret.

Assim como no Grupo 1, não foram relatadas uniões consanguíneas nessas famílias.

Tabela 4.8. Caracterização epidemiológica dos probandos do Grupo 2 e suas famílias.

	Probandos	Familiares com câncer
Pacientes (n=66)	19 (100%)	47 (100%)
Sexo		
Masculino	11 (57,9%)	22 (46,8%)
Feminino	8 (42,1%)	25 (53,2%)
Indivíduos com mais de um tumor primário	2 (10,5%)	1 (2,1%)
Estado de Residência		
Rio de Janeiro	19 (100%)	ND
Tumores (n=70)	22 (100%)	48 (100%)
Homens	11 (50,0%)	22 (45,8 %)
Mulheres	11 (50,0%)	26 (54,2%)
Infanto-juvenis*	11 (50,0%)	2 (4,2%)
Adultos	11 (50,0%)	46 (95,8%)

ND: Não disponível. *Até os 18 anos de idade.

Tabela 4.9. Espectro tumoral das famílias do Grupo 2, incluindo os tumores dos probandos e de seus familiares.

Tumores	Faixa etária de aparecimento dos tumores				Idade indeterminada	Total
	0-18 anos	19-30 anos	31-50 anos	A partir de 51		
SPM	5 (7,1%)	2 (2,9%)	1 (1,4%)	0	0	8 (11,4%)
Mama	0	3 (4,3%)	2 (2,9%)	3 (4,3%)	0	8 (11,4%)
Colorretal	0	1 (1,4%)	3 (4,3%)	2 (2,9%)	0	6 (8,6%)
Estômago	0	1 (1,4%)	3 (4,3%)	2 (2,9%)	0	6 (8,6%)
Leucemia/Linfoma	0	3 (4,3%)	0	2 (2,9%)	1 (1,4%)	6 (8,6%)
Osteossarcoma	4 (5,7%)	1 (1,4%)	0	0	0	5 (7,1%)
Cabeça e pescoço	0	0	3 (4,3%)	1 (1,4%)	0	4 (5,7%)
Trato urinário	0	0	1 (1,4%)	2 (2,9%)	0	3 (4,3%)
SNC	2 (2,9%)	0	0	1 (1,4%)	0	3 (4,3%)
Trato genital feminino	0	1 (1,4%)	2 (2,9%)	0	0	3 (4,3%)
Esôfago	0	0	2 (2,9%)	0	0	2 (2,9%)
Fígado	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)	0	0	2 (2,9%)
Pulmão	0	0	2 (2,9%)	0	0	2 (2,9%)
Pele, não melanoma	0	0	0	1 (1,4%)	0	1 (1,4%)
Tireóide	0	0	1 (1,4%)	0	0	1 (1,4%)
Neuroblastoma	1 (1,4%)	0	0	0	0	1 (1,4%)
Câncer não especificado	0	1 (1,4%)	2 (2,9%)	3 (4,3%)	3 (4,3%)	9 (12,9%)
Total	13 (18,6%)	13 (18,6%)	23 (32,9%)	17 (24,3%)	4 (5,7%)	70 (100%)

SPM: Sarcomas de partes moles; SNC: Sistema nervoso central.

Tabela 4.10. Características clínicas dos probandos do Grupo 2.

Probando	Sexo	Tumores no probando (Dx)	Tumores nos familiares (Sexo – Dx)
#03	M	Renal (32)	Leucemia (F-19, F-82), Linfoma não Hodgkin (M-ND), Bexiga (M-52), Pulmão (F-50)
#07	M	Rabdomiossarcoma (15)	ND
#08	F	Condrossarcoma (27)	Leucemia (M-27), Linfoma (F->80), Câncer não especificado (M->80)
#11	F	Carcinoma fibrolamelar (14)	Osteossarcoma (F-10)
#14	F	DFSP (4)	Esôfago (M-48, M-42), Mama (F-<70)
#24	M	Laringe (44), Carcinoma de células basais (53)	Cabeça e pescoço (M-41), Mama (F-52), Colorretal (F-42)
#27	F	Osteossarcoma (14)	ND
#31	F	Fibrohistiocitoma (10)	Ovário (F-27), Útero (F-46), Garganta (M-67), Câncer não especificado (F-60)
#38	M	Osteossarcoma (14)	Colorretal (M-37, F-<60)
#39	M	RMS (44)	Estômago (M-45, F-46, F-45, M-73)
#45	F	Ependimoma (6)	Mama (F-50), Pulmão (F-50), Fígado (M-50), Câncer não especificado (M-40)
#48	M	Osteossarcoma (15)	Garganta (M-37)
#52	M	Neuroblastoma (0)	Mama (F-<30)
#56	F	Sarcoma de células fusiformes (16)	Câncer não especificado (F-39)
#57	M	Sinoviossarcoma (12)	SNC (F-15), Colorretal (F-<60), Câncer não especificado (M-60, M-ND)
#58	M	Colorretal (20)	Mama (F-42)
#59	F	Linfoma de Hodgkin (30), Tireóide (45), Mama (52)	Bexiga (M-70), SNC (F-53)
#66	M	Osteossarcoma (18)	Colorretal (M-43)
#67	M	Sinoviossarcoma (29)	Ovário (F-32), Mama (F-30, F-30), Estômago (F-30, M-70), Câncer não especificado (M-25, M-ND, M-ND)

Dx: Idade ao diagnóstico. M: Masculino; F: Feminino; ND: Não disponível.

SNC: Sistema nervoso central; DFSP: Dermatofibrossarcoma protuberans; RMS: Rabdomiossarcoma.

Tumores em negrito ocorreram no mesmo indivíduo.

4.7 Detecção de mutações germinativas no Grupo 2

4.7.1 Sequenciamento de *TP53*

Apenas uma probanda neste grupo apresentou mutação em *TP53* (1/19; 5,3%). Essa paciente (#11) foi diagnosticada com um tumor maligno no fígado aos 14 anos de idade. As sorologias para HBV, HCV, HTLV-I/II, HIV1/2, CMV, EBV, toxoplasmose, sífilis e doença de Chagas apresentaram resultado negativo, e seus níveis de alfa-fetoproteína eram normais. A análise histopatológica do tumor revelou um carcinoma do subtipo fibrolamelar (Figura 4.11), que acomete essencialmente indivíduos jovens sem doença hepática prévia.

Essa paciente foi convidada a fazer parte deste estudo por apresentar uma prima de segundo grau com um osteossarcoma aos 10 anos de idade (Figura 4.12). O sequenciamento de *TP53* na amostra de DNA de sangue da probanda revelou duas mutações: c.467G>A (R156H), no éxon 5, e a mutação silenciosa c.582T>C (L194L), no éxon 6, ambas em heterozigose. Por ser um tipo de câncer não associado à SFL/LFL, buscamos investigar o *status* mutacional desse gene na amostra tumoral da paciente, disponibilizada pelo Banco Nacional de Tumores (BNT) do INCA. O sequenciamento dos éxons 5 e 6 no DNA tumoral também evidenciou a presença das mutações R156H e L194L, e revelou uma mutação somática adicional, c.461G>A (G154D), também em heterozigose (Figura 4.13).

Os pais da paciente também foram convidados a participar do estudo. O sequenciamento dos éxons 5 e 6 de *TP53* em suas amostras revelou que apenas a mãe era portadora das mutações R156H e L194L.

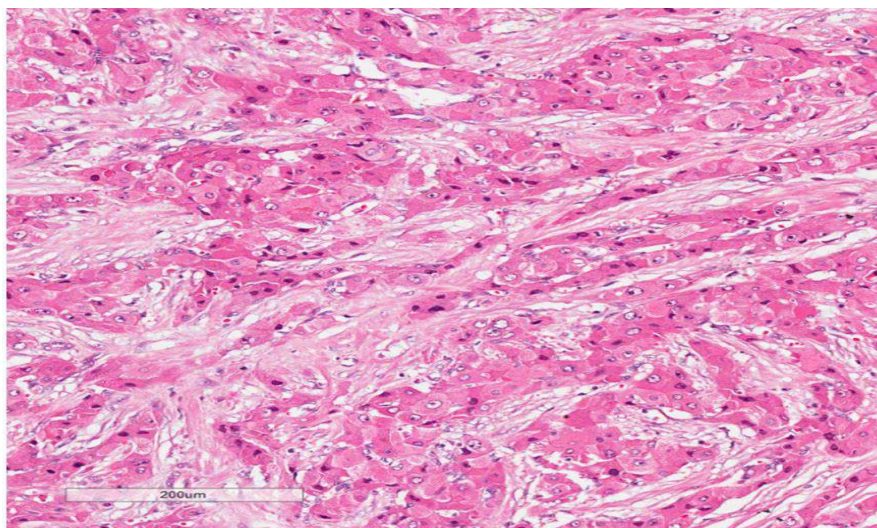
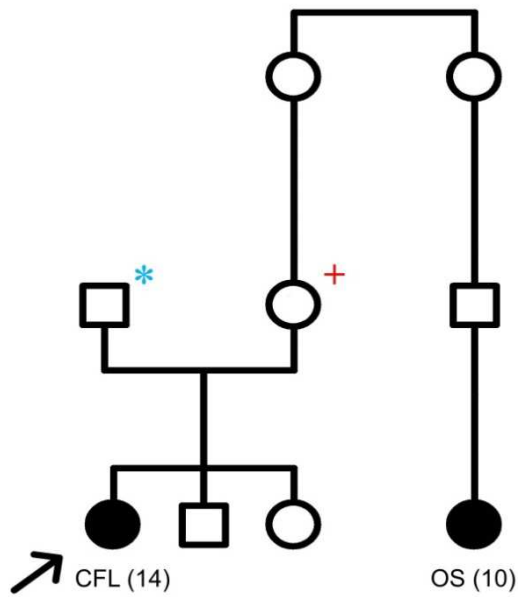


Figura 4.11. Coloração com hematoxilina e eosina do tumor da paciente #11. As células tumorais estão rodeadas por um padrão de fibrose lamelar característico do carcinoma fibrolamelar. Magnificação original de 20X.



Probanda #11

Mutação *TP53* R156H

Figura 4.12. Heredograma da família da probanda #11, portadora da mutação R156H. A cruz vermelha indica um indivíduo portador assintomático da mutação. O asterisco azul indica um indivíduo não portador da mutação. CFL: Carcinoma fibrolamelar; OS: Osteossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

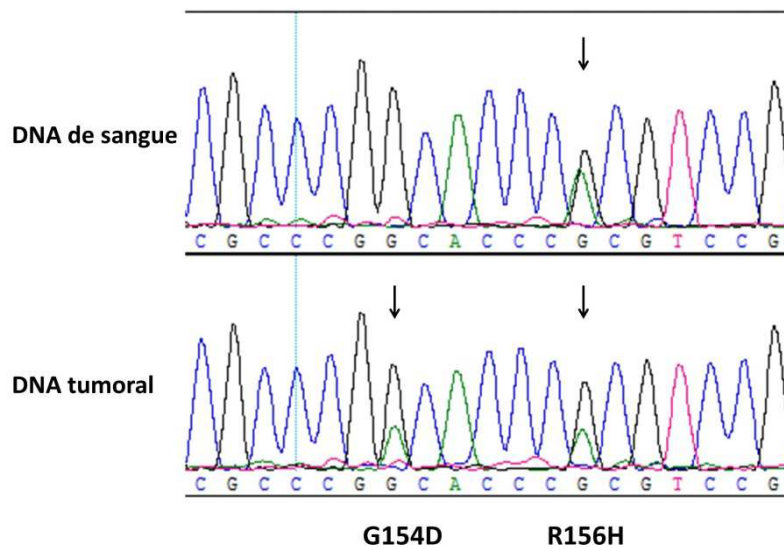


Figura 4.13. Eletroferogramas da probanda #11, em DNA de sangue e tumoral. A imagem mostra a mutação germinativa em *TP53* R156H e a mutação somática adicional G154D, ambas no éxon 5.

4.7.2 Sequenciamento de *CDKN1A*

Assim como no Grupo 1, nenhum dos pacientes no Grupo 2 apresentou mutação patogênica nas regiões investigadas do gene *CDKN1A*.

4.7.3 Análise por MLPA

Entre os probandos com resultado normal no sequenciamento (n=18), a análise por MLPA revelou resultados conclusivos para 13 deles. Para os cinco restantes, as análises foram impossibilitadas devido à qualidade da reação. Nenhuma alteração foi observada em *TP53* ou nas sondas correspondentes aos outros genes contidos no *kit* de MLPA (*EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A*, *PDGFRA*, *NFKB1A*, *CDK4*, *MIR26A2* e *MDM2*).

4.8 Análise conjunta dos Grupos 1 (SLF/LFL) e 2 (LFL-suspeita)

Entre os 56 probandos com história familiar de câncer disponível (somando os do Grupo 1 aos do Grupo 2), a utilização conjunta dos 4 critérios clínicos SLF/LFL resultou numa sensibilidade de 89%, especificidade de 34% e valor preditivo positivo de 21% para mutações em *TP53*. Excluindo-se o critério LFL de Eeles, a sensibilidade ficou em 67%, especificidade de 63%, e o valor preditivo positivo foi de 24%. A inclusão de pacientes sem critérios SLF/LFL identificou apenas uma mutação adicional. Os resultados encontram-se na Tabela 4.11. O espectro tumoral das famílias dos nove probandos com mutação em *TP53* detectada está disposto na Tabela 4.12. Não foram encontradas mutações patogênicas no gene *CDKN1A* em nenhum dos probandos.

Tabela 4.11. Eficiência dos critérios clínicos utilizados neste estudo em relação à detecção de mutações em *TP53*.

Critérios	Probandos (individualmente)			Probandos (cumulativo)*				
	N.	<i>TP53</i> (+)		N.	<i>TP53</i> (+)		Sensibilidade	Especificidade
		N.	VPP		N.	VPP		
Clássico (SLF)	3 [‡]	2	67%	3	2	67%	22%	98%
LFL – Birch	11 [‡]	3	27%	11	3	27%	33%	83%
LFL – Chompret	23 [‡]	6	26%	25	6	24%	67%	63%
LFL – Eeles	33 [‡]	5	15%	39	8	21%	89%	34%
Sem critérios	17	1	6%	56	9	16%	100%	0

* Nesta coluna, cada linha inclui também os probandos das linhas anteriores.

[‡]Existe uma sobreposição de 19 famílias que preenchem mais de um dos 4 critérios.

TP53 (+): Positivo para mutação em *TP53*.

VPP: Valor preditivo positivo (probabilidade de encontrar uma mutação em *TP53* caso a família do probando preencha o critério clínico em questão).

Tabela 4.12. Espectro tumoral dos probandos com mutação em *TP53* detectada e suas respectivas famílias.

Tumores	Probandos	Familiares de 1º e 2º grau	Outros familiares	Dx média	Total	%
Sarcoma ósseo (OS)	6	1	1	17	8	22,9%
Colorretal	0	1	4	31	5	14,3%
SPM	3	1	0	11	4	11,4%
Mama	0	2	1	28	3	8,6%
Próstata	0	2	1	62	3	8,6%
Leucemia/Linfoma	1	0	1	13	2	5,7%
Adrenocortical	2	0	0	6	2	5,7%
Pulmão	0	1	1	40	2	5,7%
SNC	0	1	0	14	1	2,9%
Gástrico	0	0	1	35	1	2,9%
Hepático (CFL)	1	0	0	14	1	2,9%
Neurofibroma	1	0	0	9	1	2,9%
Melanoma	1	0	0	27	1	2,9%
Testículo	0	0	1	25	1	2,9%
Total	15	9	11		35	100%

Dx: Idade ao diagnóstico (em anos). OS: Osteossarcoma. SPM: Sarcoma de partes moles. SNC: Sistema nervoso central. CFL: Carcinoma fibrolamelar.

4.9 Polimorfismos relacionados à via de p53

O sequenciamento dos genes *TP53* e *CDKN1A* evidenciou cinco polimorfismos: PIN2 (rs1642785), PIN3 (rs17878362) e PEX4 (rs1042522) de *TP53*; rs1801270 e rs1059234 de *CDKN1A*. Por estes polimorfismos já terem tido associações reportadas com um risco aumentado de desenvolvimento de câncer, as frequências genotípicas dos pacientes foram comparadas às de diferentes grupos controle de indivíduos do Sul e Sudeste do Brasil, cujos dados encontram-se publicados (ACHATZ, 2008; CARVALHO et al., 2013; VARGAS-TORRES et al., 2014). O SNP 309 de *MDM2* (rs2279744), relatado como um modificador da idade de desenvolvimento tumoral em portadores de mutação em *TP53* (MCBRIDE et al., 2014), também foi investigado e os resultados foram comparados aos de um grupo controle do Rio de Janeiro.

O genótipo homocigoto do alelo mais frequente para cada polimorfismo foi considerado o genótipo referência. Para minimizar o viés dessa análise, os nove indivíduos com mutação patogênica em *TP53* detectada neste estudo não foram considerados dentro do grupo de pacientes, já que possuíam um fator de risco sobressalente para o desenvolvimento de câncer. Todos os seis polimorfismos analisados encontravam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$), tanto no grupo de pacientes quanto nos grupos controles. O teste de homogeneidade por meio do qui-quadrado mostrou uma distribuição de genótipos homogênea entre pacientes e controles ($p > 0,05$). A análise da *odds ratio* não revelou nenhum dos polimorfismos como fator de risco ou proteção, já que não houve diferenças estatisticamente

significativas nas frequências genóticas entre os grupos. Os resultados encontram-se a Tabela 4.13.

Tabela 4.13. Distribuição genotípica de polimorfismos da via de p53 em pacientes e controles.

Polimorfismo	Probandos	%	Controles	%	OR	IC 95%		
TP53 PIN2 (rs1642785)	n=49*		n=300[‡]					
GG	26	53,1%	166	55,3%	1,00 (Referência)			
GC	18	36,7%	112	37,3%	1,03	0,54	a	1,96
CC	5	10,2%	22	7,3%	1,45	0,51	a	4,17
GC + CC	23	46,9%	134	44,7%	1,10	0,60	a	2,01
TP53 PIN3 (rs17878362)	n=49*		n=300[‡]					
NN	35	71,4%	222	74,0%	1,00 (Referência)			
ND	14	28,6%	70	23,3%	1,27	0,65	a	2,50
DD	0	0,0%	8	2,7%	0,37	0,02	a	6,53
ND + DD	14	28,6%	78	26,0%	1,14	0,58	a	2,23
TP53 PEX4 (rs1042522)	n=49*		n=300[‡]					
GG	23	46,9%	158	52,7%	1,00 (Referência)			
GC	21	42,9%	114	38,0%	1,27	0,67	a	2,40
CC	5	10,2%	28	9,3%	1,23	0,43	a	3,50
GC + CC	26	53,1%	142	47,3%	1,26	0,69	a	2,30
CDKN1A rs1801270	n=49*		n=120^{††}					
CC	36	73,5%	90	75,0%	1,00 (Referência)			
CA	10	20,4%	27	22,5%	0,93	0,41	a	2,11
AA	3	6,1%	3	2,5%	2,50	0,48	a	12,97
CA + AA	13	26,5%	30	25,0%	1,08	0,51	a	2,31
CDKN1A rs1059234	n=49*		n=120^{††}					
CC	36	73,5%	95	79,2%	1,00 (Referência)			
CT	12	24,5%	23	19,2%	1,38	0,62	a	3,05
TT	1	2,0%	2	1,7%	1,32	0,12	a	15,00
CT + TT	13	26,5%	25	20,8%	1,37	0,63	a	2,97
MDM2 SNP 309	n=49*		n=184^{†††}					
TT	29	59,2%	102	55,4%	1,00 (Referência)			
TG	14	28,6%	69	37,5%	0,71	0,35	a	1,45
GG	6	12,2%	13	7,1%	1,62	0,57	a	4,65
TG + GG	20	40,8%	82	44,6%	0,86	0,45	a	1,63

*Foram retirados da análise os nove indivíduos com mutação patogênica detectada em *TP53*. [‡]Grupo controle genotipado por ACHATZ (2008), composto por 300 indivíduos do Sul do Brasil. ^{††}Grupo controle genotipado por CARVALHO et al. (2013), composto por 120 indivíduos do Sudeste brasileiro. ^{†††}Grupo controle genotipado por VARGAS-TORRES et al. (2014), composto por 184 indivíduos do Sudeste brasileiro. N: alelo não-duplicado. D: alelo duplicado. OR: *odds ratio*.

4.10 Frequência da mutação *TP53* R337H em coortes de câncer do estado do Rio de Janeiro

Dada a elevada frequência da mutação R337H de *TP53* na população do Sul do Brasil, e sua associação a alguns tumores pouco frequentes na SLF, foi investigada a frequência dessa mutação em coortes de indivíduos com diversos tipos de tumor acompanhados pelo Serviço de Aconselhamento Genético do INCA.

Trata-se de uma abordagem inicial para investigar a representatividade dessa mutação no Sudeste, e contribuir com a caracterização fenotípica de seus portadores. Até o momento, foram analisados os 58 probandos com suspeita clínica da SLF/LFL (Grupos 1 e 2 deste estudo), que foram investigados quanto à presença de mutações em todos os éxons de *TP53*.

Adicionalmente, verificamos a frequência da mutação R337H, no éxon 10 de *TP53*, em três coortes de pacientes acompanhadas pelo aconselhamento genético do INCA. Essas coortes foram: 126 pacientes com câncer de mama, de famílias diferentes; 81 pacientes com retinoblastoma, e 46 pacientes com tumor de Wilms.

Os pacientes com câncer de mama foram encaminhados ao aconselhamento genético por suspeita clínica de síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC), e o sequenciamento dos genes *BRCA1* e *BRCA2* nesses indivíduos não havia evidenciado mutações deletérias. Os pacientes com retinoblastoma não foram selecionados por história familiar de câncer, mas sim encaminhados consecutivamente.

Da mesma forma, os pacientes com tumor de Wilms não foram selecionados por história familiar de câncer, mas sim encaminhados consecutivamente. Os dados de frequência da mutação R337H nesses pacientes são derivados de um estudo realizado por nosso grupo, que envolvia a análise completa do gene *TP53* nesses pacientes. Esses dados encontram-se publicados (Anexo 9) (ANDRADE et al., 2014).

Os dados clínicos dessas três coortes encontram-se na Tabela 4.14. Nenhum paciente desse grupo apresentou a R337H. O único probando com essa mutação até o momento foi o probando #25, do Grupo 1 deste trabalho, que apresentou um carcinoma adrenocortical.

Para a comparação dos achados do Rio de Janeiro com os do restante do Brasil, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre as coortes de pacientes já investigadas em relação à presença da mutação R337H. O Quadro 4.1 mostra um resumo destes dados, com a frequência da mutação R337H em pacientes com tumores relacionados à SLF. Como é possível notar, os tumores mais investigados em relação à presença desta mutação são o carcinoma adrenocortical e o câncer de mama (tanto familiar quanto esporádico). A Figura 4.14 representa um mapa com os dados de frequência da mutação R337H nestes tumores, em estudos conduzidos em diferentes cidades brasileiras. Além disso, o mapa mostra dados

disponíveis da frequência desta mutação em indivíduos saudáveis, de diferentes regiões brasileiras e paraguaias.

Tabela 4.14. Dados clínicos de pacientes acompanhados pelo aconselhamento genético do INCA, rastreados para a mutação R337H de TP53.

Coorte	N	Sexo		Dx média
		Masculino (%)	Feminino (%)	
Câncer de mama	126	6 (4,8%)	120 (95,2%)	45,2*
Retinoblastoma	81	36 (44,4%)	45 (55,6%)	2,1
Tumor de Wilms	46	27 (46,5%)	19 (53,5%)	3,4

Dx: Idade ao diagnóstico (em anos). *A idade ao diagnóstico de duas pacientes não estava disponível.

Quadro 4.1. Frequência da mutação R337H em diferentes coortes de tumores em estudos brasileiros.

Região	Cidade de realização do estudo	Carcinoma adrenocortical pediátrico	Câncer de mama familiar	Câncer de mama (não selecionados por critério familiar)	Outras coortes
Sul	Porto Alegre (RS)	→ 9/11 (81,8%) (GIACOMAZZI et al., 2013c)	→ 2/59 (3,4%) (GIACOMAZZI et al., 2014a)	→ 8/148 ^{1,2} (5,4%) (GIACOMAZZI et al., 2013b) → 17/293 (5,8%) (GIACOMAZZI et al., 2014a)	→ Carcinoma do plexo coróide: 2/2 (100%) (GIACOMAZZI et al., 2013c)
	Curitiba (PR)	→ 35/36* (97,2%) (RIBEIRO et al., 2001) → 40/40** (100%) (FIGUEIREDO et al., 2006)			→ Carcinoma do plexo coróide: 14/22 (63,6%) (CUSTODIO et al., 2011)
Sudeste	São Paulo (SP)	→ 14/18 ¹ (77,8%) (LATRONICO et al., 2001)	→ 3/120 (2,5%) (SILVA et al., 2014a)	→ 50/238 ¹ (21,0%) (GIACOMAZZI et al., 2014a)	→ Carcinoma adrenocortical (adultos) ¹ : 5/37 (13,5%) (LATRONICO et al., 2001) → Probandos de famílias com critérios SLF/LFL ² : 6/45 (13,3%) (ACHATZ et al., 2007)
	Campinas (SP)	→ 65/70 (92,9%) (SEIDINGER et al., 2011)	→ 2/45 (4,4%) (ASSUMPCÃO et al., 2008)	→ 1/78 (1,3%) (ASSUMPCÃO et al., 2008)	→ Carcinoma do plexo coróide: 9/13 (69,2%) (SEIDINGER et al., 2011) → Osteossarcoma: 3/41 (7,3%) (SEIDINGER et al., 2011) → Neuroblastoma: 7/83 (8,4%) (SEIDINGER et al., 2015)
	Ribeirão Preto (SP)	→ 12/16 (75%) (SANDRINI et al., 2005)	→ 2/28 (7,1%) (CURY; FERRAZ; SILVA, 2014)		→ Carcinoma adrenocortical (adultos): 1/5 (20%) (SANDRINI et al., 2005)
	Barretos (SP)			→ 3/284 ¹ (1,1%) (GIACOMAZZI et al., 2014a)	
	Rio de Janeiro (RJ)		→ 0/126 (0%) (Este estudo)	→ 2/390 (0,5%) (GOMES et al., 2012)	→ Probandos de famílias com critérios SLF/LFL: 1/39 (2,6%) (Este estudo)
Nordeste	Salvador (BA)		→ 1/101 ³ (1,0%) (FELIX et al., 2014)		

*de 34 famílias. **de 30 famílias. ¹Considerando DNA de amostras tumorais e/ou não tumorais. ²Tratam-se de estudos multicêntricos. Foram classificados com base na localização do principal centro de recrutamento de pacientes, embora também incluam centros de outras cidades do Brasil. ³Apenas pacientes com câncer de mama.

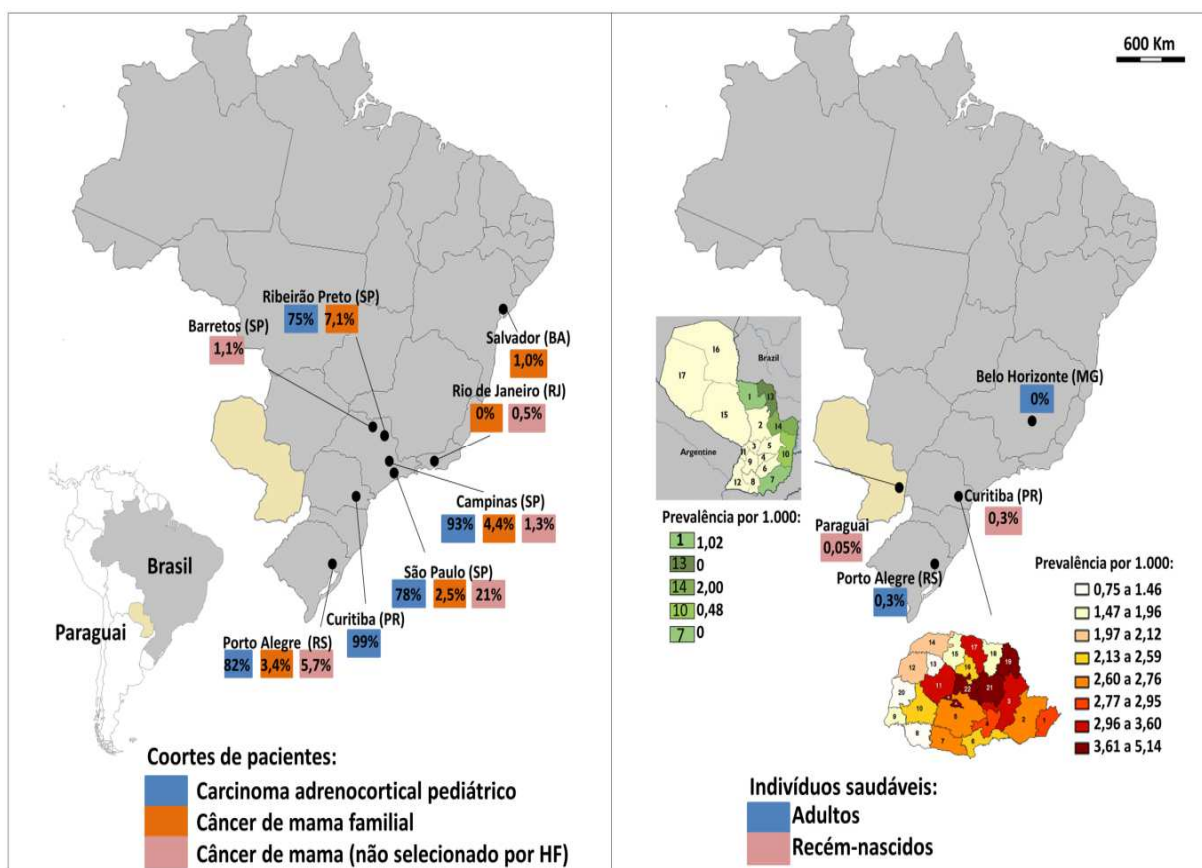


Figura 4.14. Frequência da mutação R373H em diferentes regiões. Mapa elaborado a partir dos dados do quadro 4.1, mostrando a frequência da mutação R373H de *TP53* nos principais tumores associados a ela (à esquerda); e em indivíduos saudáveis (à direita), em diferentes regiões. Os mapas relativos ao Paraguai e ao Estado do Paraná (à direita) foram adaptados de LEGAL et al. (2015) e CUSTÓDIO et al. (2013). HF: história familiar.

4.11 Investigação de mutações por sequenciamento de nova geração

Onze pacientes do Grupo 1 que não tiveram mutação detectável em *TP53* foram selecionados para análise por sequenciamento de nova geração, por meio de um painel de 124 genes associados ao câncer. Para investigar com maior precisão quais mutações poderiam estar mimetizando os efeitos de uma mutação em *TP53*, foram selecionados apenas pacientes que apresentavam pelo menos um tumor típico da síndrome, e que preenchiam pelo menos o critério de Chompret, que se mostra o critério clínico mais sensível da SLF/LFL. Dessa forma, foram selecionados 11 probandos (#01; #06; #09; #10; #15; #17; #20; #33; #41; #51; e #65), nove do sexo feminino (81,8%) e dois do sexo masculino (18,2%). Quatro probandos apresentaram dois tumores primários, totalizando 15 tumores no grupo. Com exceção da paciente #15, todos apresentaram tumores típicos da síndrome antes dos 50 anos de idade. Os tumores apresentados por estes probandos encontram-se na Tabela 4.15.

Tabela 4.15. Tumores no grupo de 11 pacientes submetidos à análise por sequenciamento de nova geração.

Tumores	N (15)	Idade média ao diagnóstico
Câncer de mama	5	47 ($\pm 8,9$)
SPM	4	31,3 ($\pm 18,8$)
SNC	3	22,3 ($\pm 23,1$)
OS	2	16,5 ($\pm 2,1$)
Outros (Renal)	1	62

SPM: Sarcoma de partes moles; SNC: tumor de sistema nervoso central; OS: Osteossarcoma.

A cobertura das bases de interesse em 10 vezes ou mais foi de pelo menos 97% para todos os probandos, considerada eficiente para detecção da maior parte das mutações nas regiões de interesse. Um resumo das estatísticas do sequenciamento encontra-se na Tabela 4.16.

Tabela 4.16. Mensurações e cobertura do sequenciamento de nova geração.

Pacientes	Reads ≥ 45 pb	% dessas reads alinhadas às regiões de interesse	Total de bases nas regiões de interesse	Profundidade mediana de leitura nas regiões de interesse	% de bases cobertas $\geq 10x$	% de bases cobertas $\geq 30x$	Mutações que passaram nos filtros
#01	39555809	88,5	797556	998	97	94	616
#06	35781853	89,6	797556	948	97	95	510
#09	40319701	88,1	797556	955	97	95	528
#10	35770119	89,2	797556	859	98	95	559
#15	16144990	81,6	797556	500	97	94	482
#17	34860446	81,7	797556	797	98	95	568
#20	44065112	89,4	797556	1060	98	96	542
#33	40185551	88	797556	1076	98	96	477
#41	34576789	78,6	797556	775	97	94	512
#51	43641617	86,8	797556	1130	98	96	587
#65	46291360	92,9	797556	1302	97	95	620

Em média, 543 (desvio padrão de ± 49) mutações foram encontradas por paciente. Do total de mutações de cada paciente, aquelas consideradas de interesse, isto é, em regiões exônicas e não sinônimas ou em sítios de *splicing*, representaram entre 7,6% a 10,8% (45 a 62 por paciente). Após filtragem com os critérios de eleição para mutações potencialmente patogênicas, restaram 34 mutações, em um grupo de 21 genes. Trinta e três eram substituições de um único nucleotídeo e uma era uma substituição de dois nucleotídeos adjacentes. Cinco

dessas mutações eram novas. O Quadro 4.2 mostra todas as mutações que apresentaram os critérios de eleição em cada um dos onze pacientes.

Dentre as 34 mutações, oito (23,5%) encontravam-se nos genes *BRCA1*, *BRCA2* ou *ATM*, importantes componentes da via de sinalização de reparo do DNA e associados ao câncer hereditário. Seis dos 11 pacientes (54,5%) apresentaram mutações raras e preditas patogênicas pelos *softwares* em algum destes genes (*BRCA1*, n=1; *BRCA2*, n=4; *ATM*, n=3), sendo que duas probandas apresentaram mutações tanto em *BRCA2* quanto em *ATM*.

A busca nos bancos de dados e artigos revelou que a maioria das mutações encontradas é considerada de significado clínico incerto. A mutação F1761S de *BRCA1*, classificada como de significado clínico incerto nas bases de dados pesquisadas, possui evidências de ensaios funcionais que indicam prejuízo da função da proteína BRCA1, além de não estar descrita em populações de referência. Dessa forma, ela foi classificada como provavelmente patogênica, de acordo com os critérios da *American College of Medical Genetics* (RICHARDS et al., 2015). As quatro mutações encontradas em *BRCA2* (S976I, H2116R, I2944F e A2951T) são classificadas como benignas na base de dados BIC, embora a mutação S976I não seja descrita em populações de referência. As mutações em *ATM* são de significado clínico incerto: S49C e C532Y. Nesse gene também foi identificada a mutação nova E2087A. Os genes *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* e *PTPRC* também apresentaram mutações não descritas na literatura.

Quadro 4.2. Mutações potencialmente patogênicas encontradas em onze pacientes SLF/LFL.

Gene	Cromossomo	Pos GRCh37	dbSNP ID	Frequência populacional da mutação	Mudança no DNA	Mudança de AA	SIFT	Poly Phen2	PhyloP	Phast Cons	Classificação	Probando
<i>ALK</i>	chr2	29940456	rs771593278	-	c.775C>T	p.R259C	D	D	C	C	VSI	#01
<i>ATM</i>	chr11	108188161	-	-	c.6260A>C	p.E2087A	T	D	C	C	VSI	#06
<i>ATM</i>	chr11	108098576	rs1800054	0,0042	c.146C>G	p.S49C	D	D	C	NC	VSI	#33
<i>ATM</i>	chr11	108121787	rs35963548	0,0002	c.1595G>A	p.C532Y	D	D	C	C	VSI	#41
<i>BRCA1</i>	chr17	41203130	rs80356905	-	c.1970T>C	p.F1761S	D	D	C	C	PP	#15
<i>BRCA2</i>	chr13	32953529	rs4987047	0,0090	c.8830A>T	p.I2944F	D	D	NC	C	B	#01
<i>BRCA2</i>	chr13	32914839	rs55953736	0,0068	c.6347A>G	p.H2116R	T	D	C	NC	B	#06
<i>BRCA2</i>	chr13	32953550	rs11571769	0,0100	c.8851G>A	p.A2951T	D	D	C	C	B	#41
<i>BRCA2</i>	chr13	32911418	rs276174831	-	c.2926_2927delTCinsAT	p.S976I	D	D	NC/C	NC/NC	B	#65
<i>CREBBP</i>	chr16	3820879	rs145733598	0,0016	c.2572C>T	p.P858S	-	D	C	C	VSI	#01
<i>CREBBP</i>	chr16	3831230	rs61753381	0,0064	c.1651C>A	p.L551I	T	D	C	C	PB	#20
<i>EP300</i>	chr22	41574638	rs759647202	-	c.6923G>A	p.R2308H	D	D	C	C	VSI	#06
<i>FLT4</i>	chr5	180050951	rs148329571	-	c.1532T>C	p.V511A	D	D	C	C	VSI	#01
<i>FLT4</i>	chr5	180058761	rs113995355	0,0062	c.76T>G	p.S26A	T	D	C	C	VSI	#41
<i>IGF2R</i>	chr6	160482929	rs8191844	0,0080	c.3551C>G	p.T1184S	D	D	C	C	VSI	#01
<i>KDR</i>	chr4	55972946	rs34231037	0,0090	c.1444T>C	p.C482R	T	D	C	C	VSI	#09
<i>NOS1</i>	chr12	117768670	rs777633286	-	c.205G>A	p.G69S	T	D	C	C	VSI	#17
<i>PARP4</i>	chr13	25030481	rs113934879	-	c.2560G>A	p.E854K	D	D	C	C	VSI	#01
<i>PAX5</i>	chr9	36882090	rs35077960	0,0026	c.923C>T	p.A308V	T	D	C	C	VSI	#17
<i>PDGFRA</i>	chr4	55127448	rs36035373	0,0040	c.236G>A	p.G79D	T	D	C	C	PB	#15
<i>PIK3C2A</i>	chr11	17118639	-	-	c.4291A>C	p.T1431P	T	D	C	C	VSI	#51
<i>PTPRC</i>	chr1	198721490	-	-	c.3320G>T	p.R1107I	D	D	C	C	VSI	#01
<i>PTPRC</i>	chr1	198676048	rs762697900	-	c.871C>T	p.P291S	T	D	C	NC	VSI	#41
<i>RET</i>	chr10	43609994	rs148935214	0,0004	c.1946C>T	p.S649L	D	D	C	C	VSI	#06
<i>ROS1</i>	chr6	117642531	rs144529412	0,0006	c.5668A>G	p.K1890E	D	D	C	NC	VSI	#01
<i>ROS1</i>	chr6	117642531	rs144529412	0,0006	c.5668A>G	p.K1890E	D	B	C	NC	VSI	#17
<i>ROS1</i>	chr6	117715381	rs56274823	0,0010	c.1108T>C	p.S370P	T	D	NC	C	VSI	#20
<i>SETD2</i>	chr3	47103828	-	-	c.6118C>G	p.R2040G	D	D	C	C	VSI	#41
<i>SETD2</i>	chr3	47164946	rs368465960	-	c.1180T>C	p.C394R	D	B	C	C	VSI	#65
<i>SMO</i>	chr7	128843395	-	-	c.502C>G	p.R168G	D	B	C	C	VSI	#10
<i>SMO</i>	chr7	128843396	rs61746143	0,0096	c.503G>A	p.R168H	D	D	C	C	VSI	#41
<i>TSHR</i>	chr14	81558901	rs772600260	-	c.494C>T	p.T165M	T	D	C	C	VSI	#06
<i>TSHR</i>	chr14	81610123	rs61742289	0,0012	c.1721C>G	p.T574S	D	D	C	C	VSI	#41
<i>WTX</i>	chrX	63410516	rs201092215	0,0016	c.2651C>T	p.P884L	D	D	C	C	VSI	#09

AA: aminoácido; B: Benigna; D: Deletéria; C: base conservada; NC: base não conservada; T: Tolerada; VSI: variante de significado incerto; PB: provavelmente benigna; PP: provavelmente patogênica. SPM: Sarcoma de partes moles; SNC: tumor de sistema nervoso central; OS: Osteossarcoma. Em negrito as mutações em *BRCA1*, *ATM* e as mutações novas encontradas.

Foram verificadas as vias de sinalização nas quais estes 21 genes estão envolvidos. Considerando as interações destes genes entre si e o número de vezes que cada um apresentou mutação, foram selecionadas as vias mais representadas dentro do grupo de mutações potencialmente patogênicas identificadas. Estes dados foram obtidos através do programa *EnrichR*, base de dados *NCI – Nature 2016* (KULESHOV et al., 2016), e encontram-se na Figura 4.15. Entre estas vias, encontram-se as seguintes vias de reparo de DNA: via do fator de transcrição FOXM1, via da anemia de Fanconi, a via de p53, e a via do fator de transcrição E2.

O Quadro 4.3 mostra as principais funções de cada uma das 21 proteínas codificadas por estes genes, com dados retirados da base *UniProt* (UNIPROT CONSORTIUM, 2015). O quadro também mostra as doenças associadas a mutações germinativas nestes genes.

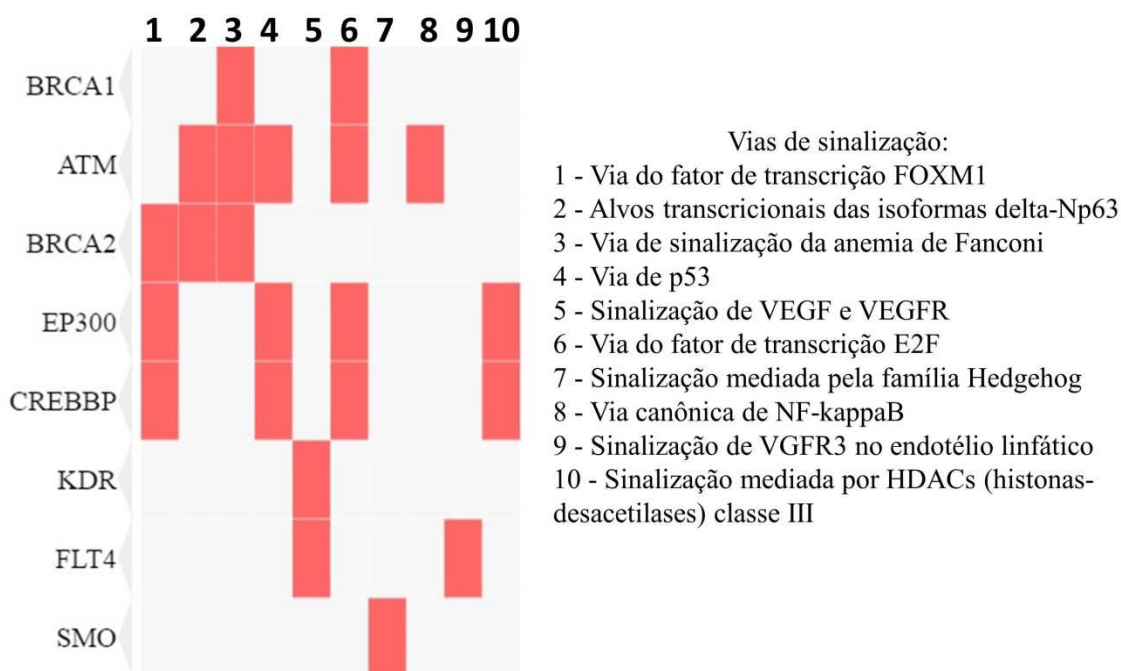


Figura 4.15. Clustergrama demonstrando as principais vias de sinalização representadas dentro do grupo de 21 genes com mutações potencialmente patogênicas. As colunas indicam as vias de sinalização, em ordem decrescente de representatividade. As linhas mostram os genes, e as barras vermelhas mostram quais genes estão associados à cada via. Os dados foram obtidos do programa *EnrichR*, base de dados *NCI – Nature 2016* (KULESHOV et al., 2016).

Quadro 4.3 Genes com mutações potencialmente patogênicas e suas funções.

Gene	Função molecular/processos biológicos principais	Doenças associadas a mutações germinativas
<i>ALK</i>	Receptor tirosina cinase de atuação na gênese e diferenciação do sistema nervoso. Transduz sinais de ligantes na superfície celular, pela ativação da via de MAPK (proteínas-cinases ativadas por mitógenos).	Predisposição a neuroblastoma (MOSSÉ et al., 2008)
<i>ATM</i>	Serina/treonina cinase: ativa a sinalização de ponto de checagem diante de uma quebra de dupla fita do DNA, apoptose e estresse genotóxico.	Ataxia-telangiectasia (SAVITSKY et al., 1995) Predisposição a câncer de mama (BAY et al., 1999)
<i>BRCA1</i>	E3 ubiquitina-proteína ligase, atua no reparo ao dano ao DNA, ubiquitinação e regulação da transcrição para manter a estabilidade genômica.	Câncer de mama e ovário hereditários (CASTILLA et al., 1994)
<i>BRCA2</i>	Proteína de ligação ao DNA que atua no reparo de quebra à dupla fita e na recombinação homóloga. Se liga a RAD51 e potencializa o reparo de DNA por recombinação por meio da ligação de RAD51 à fita simples de DNA.	Câncer de mama e ovário hereditários (WOOSTER et al., 1995) Tumor de Wilms (REID et al., 2005)
<i>CREBBP</i>	Modificação de histonas, coativador de transcrição – acetila histonas para ativação transcricional. Liga-se à proteína CREB fosforilada e eleva sua atividade transcricional direcionada aos genes responsivos à cAMP (AMP cíclico).	Síndrome de Rubinstein-Taybi (PETRIJ et al., 1995)
<i>EP300</i>	Modificação de histonas, coativador transcricional. A acetiltransferase p300 regula a transcrição via remodelamento da cromatina e é importante na proliferação e diferenciação celular.	Síndrome de Rubinstein-Taybi (ROELFSEMA et al., 2005)
<i>FLT4 (VEGFR3)</i>	Tirosina cinase que atua como receptor para VEGFC e VEGFD e tem papel essencial na linfangiogênese e no desenvolvimento da rede vascular e do sistema cardiovascular durante a embriogênese. Promove a proliferação, sobrevivência e migração de células endoteliais e regulação da angiogênese.	Linfedema hereditário IA (GHALAMKARPOUR et al., 2009)
<i>IGF2R</i>	Codifica um receptor para o fator de crescimento IGF-2 e para a manose-6-fosfato. Promove o tráfego intracelular de enzimas lisossomais, ativação do Irf- β e a degradação de IGF-2.	-
<i>KDR (VEGFR2)</i>	Receptor do tipo tirosina cinase para os fatores de crescimento VEGFA, VEGFC e VEGFD. É essencial na regulação da angiogênese, no desenvolvimento vascular, permeabilidade vascular e na hematopoiese embrionária, promovendo a proliferação, sobrevivência, migração e diferenciação de células endoteliais.	Predisposição a hemangioma infantil (JINNIN et al., 2008a)
<i>NOS1</i>	Óxido nítrico sintetase. O óxido nítrico (NO) produzido atua como molécula mensageira com funções diversificadas no organismo. No sistema nervoso, tem função de neurotransmissor.	Acalasia (associação não confirmada) (SHTEYER et al., 2015)
<i>PARP4</i>	Poli-ADP-ribosiltransferase, que catalisa a reação de poli-ADP-ribosilação.	-

PAX5	Fator de transcrição da família <i>paired-box</i> . Codifica a proteína ativadora específica da linhagem de células B que é expressa nos estágios iniciais da diferenciação. Sua expressão também já foi verificada em tecido neuronal em desenvolvimento e em gônada masculina em desenvolvimento.	Susceptibilidade à leucemia linfoblástica aguda (SHAH et al., 2013)
PDGFRA	Receptor do tipo tirosina cinase de superfície celular para PDGFA, PDGFB e PDGFC. Atua na diferenciação das células-tronco mesenquimais de medula óssea, no desenvolvimento do esqueleto, no fechamento cefálico, desenvolvimento do tecido de revestimento da mucosa do trato gastrointestinal.	Tumor estromal gastrointestinal (GIST) familiar (CHOMPRET et al., 2004)
PIK3C2A	Fosfatidilinositol 3-cinase, gera fosfatidil-inositol 3-fosfato e fosfatidil-inositol 3,4-bisfosfato que atuam como segundos mensageiros. Têm papel em diversos eventos de sinalização intracelular. Atua na sinalização e secreção de insulina.	-
PTPRC	Tirosina fosfatase transmembrana requerida para ativação de células mediante a ligação ao antígeno. Atua como um regulador positivo da co-ativação de células T pela ligação com DPP4.	Imunodeficiência combinada severa (KUNG et al., 2000)
RET	Receptor tirosina-cinase envolvido na proliferação celular, migração direcionada e diferenciação neuronal, mediante ligação com moléculas da família de fatores neurotróficos derivados de células gliais. Envolvido no desenvolvimento do sistema nervoso entérico e na organogênese renal.	Carcinoma medular de tireóide Neoplasia endócrina múltipla IIA Neoplasia endócrina múltipla IIB Feocromocitoma Doença de Hirschsprung-1
ROS1	Receptor tirosina cinase que atua na diferenciação epitelial e regionalização do epitélio do epidídimo. Pode ativar inúmeras vias de sinalização relacionadas à diferenciação celular, proliferação, crescimento e sobrevivência, incluindo a via de sinalização PI3 cinase - mTOR.	-
SETD2	Histona metiltransferase: promove a trimetilação da lisina 36 da histona H3.	Síndrome de sobrecrecimento de Luscan-Lumish (LLS) (LUSCAN et al., 2014)
SMO	Receptor acoplado à proteína G que participa da transdução de sinais da via Hedgehog. É constitutivamente inativado pela proteína PTCH. Quando a proteína sonic hedgehog (SHH) se liga à PTCH, SMO torna-se ativado. A via de Hedgehog é essencial para o desenvolvimento embrionário normal e, na vida adulta, atua na manutenção, renovação e regeneração tecidual.	-
TSHR	Receptor acoplado à proteína G que se liga à tirotrópina (TSH). É essencial para o controle do metabolismo celular da tireóide, com sua ativação promovendo a produção dos hormônios tireoidianos.	Hipertireoidismo (FUHRER et al., 2000) Hipotireoidismo (SUNTHORNTHEPVARAKUI et al., 1995)
WTX	Regulador da via canônica de sinalização Wnt. Liga-se ao fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P2), translocando-se para a membrana celular e interagindo com reguladores centrais da via Wnt. Pode atuar nessa via tanto como um regulador positivo (por meio da fosforilação de LRP6) quanto negativo (estabilizando o complexo de degradação da β -catenina). Atua no desenvolvimento renal.	Osteopatia estriada (JENKINS et al., 2009)

Das 34 mutações filtradas, oito foram selecionadas para validação por sequenciamento de Sanger. Foram incluídas para validação todas as mutações em *ATM* e *BRCA1*, por serem genes reconhecidamente associados a síndromes de câncer hereditário e por sua importância na via de p53. As mutações em *BRCA2* não foram consideradas prioritárias pelo fato da base de dados BIC classificá-las como benignas. Além dessas, todas as mutações novas encontradas neste estudo foram selecionadas para validação. A Figura 4.16 mostra os resultados de sequenciamento de Sanger, através do qual foi possível validar todas as oito mutações selecionadas.

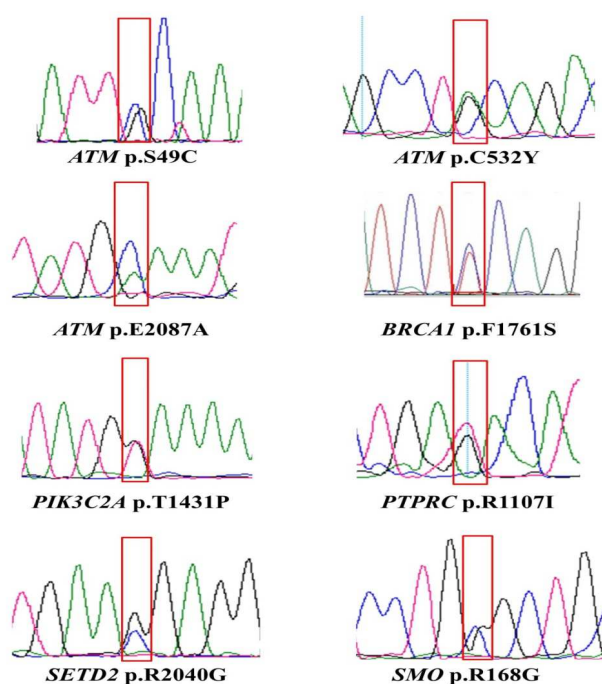


Figura 4.16. Eletroferogramas da validação por sequenciamento de Sanger. A figura mostra a confirmação das oito mutações prioritárias identificadas por NGS.

4.12 Descrição clínica dos probandos investigados por sequenciamento de nova geração e suas respectivas famílias

A técnica de sequenciamento de nova geração possibilitou a identificação de 34 mutações potencialmente patogênicas em 11 probandos de famílias que preenchiam pelo menos o critério Li-Fraumeni *like* de Chompret (associado ou não a outros critérios). A seguir será apresentada a descrição clínica desses probandos e suas famílias.

4.12.1 Probanda #01

A probanda #01 teve um sinoviossarcoma aos 15 anos. A mãe da probanda desenvolveu câncer de mama bilateral e foi relatado que sua avó e tia-avó maternais

possivelmente haviam falecido com leucemia e câncer de mama (Figura 4.17). Entretanto, por não existir certeza quanto a essa afirmação, esses dois casos não foram incluídos para classificação da SLF/LFL. A probanda apresentou a mutação rs4987047 (I2944F) no éxon 22 de *BRCA2*, que o BIC classifica como benigna, baseado na sua frequência alélica na população africana, que se mostra elevada (0,0346). Ensaio funcionais também demonstraram um efeito neutro dessa mutação (FOKKEMA et al., 2011). Não havia dados relacionados à importância clínica das demais mutações nessa probanda.

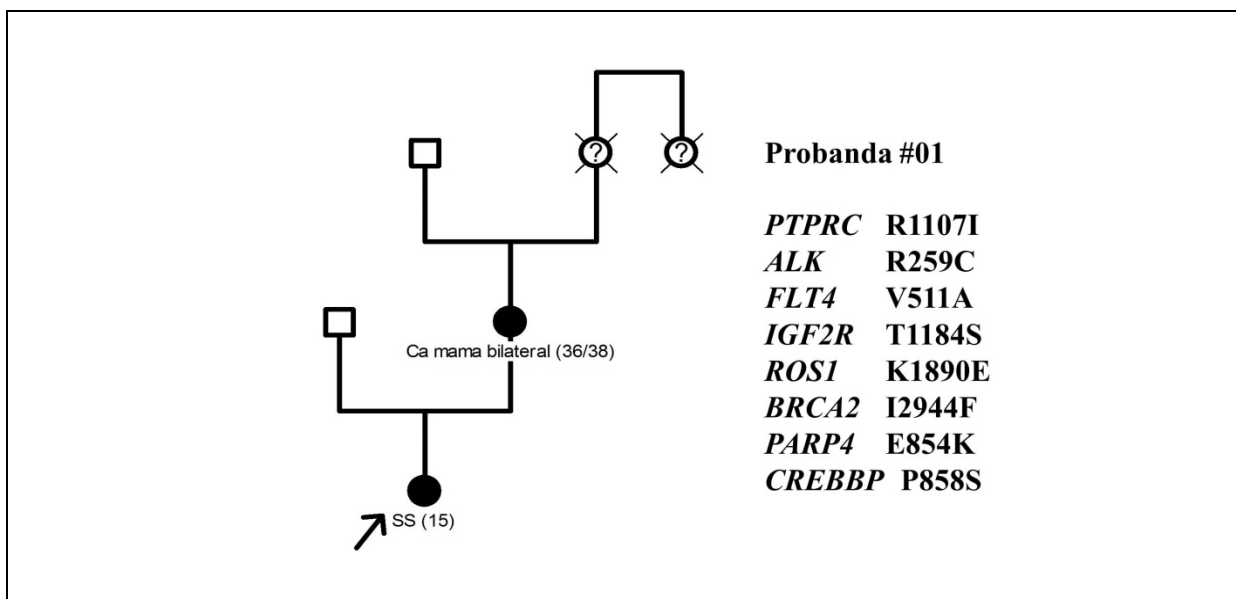


Figura 4.17. Heredograma da família da probanda #01. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. Os indivíduos com ponto de interrogação são possivelmente afetados com câncer. SS: Sinoviossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.2 Probanda #06

A probanda #06 foi incluída pelo critério clínico de Chompret por apresentar dois tumores típicos da síndrome: um meduloblastoma aos 9 anos e um osteossarcoma aos 15 anos. Ela não possuía uma história familiar sugestiva de SLF/LFL (Figura 4.18), embora seu avô e tia-avó maternos tivessem desenvolvido câncer antes dos 50 anos. A probanda apresentou a mutação H2116R, no éxon 11 do gene *BRCA2*, classificada como benigna pela base de dados BIC. A mutação S649L encontrada no gene *RET* nessa paciente já foi associada ao carcinoma medular de tireóide familiar (WIENCH et al., 2001), mas seu significado clínico ainda é considerado incerto. Ela também apresentou uma mutação não descrita previamente (E2087A) no éxon 45 do gene *ATM*. Essa paciente havia recebido radioterapia como parte do tratamento de seu primeiro tumor cerebral, e o osteossarcoma desenvolvido posteriormente ocorreu no crânio, numa região próxima à que recebeu radioterapia.

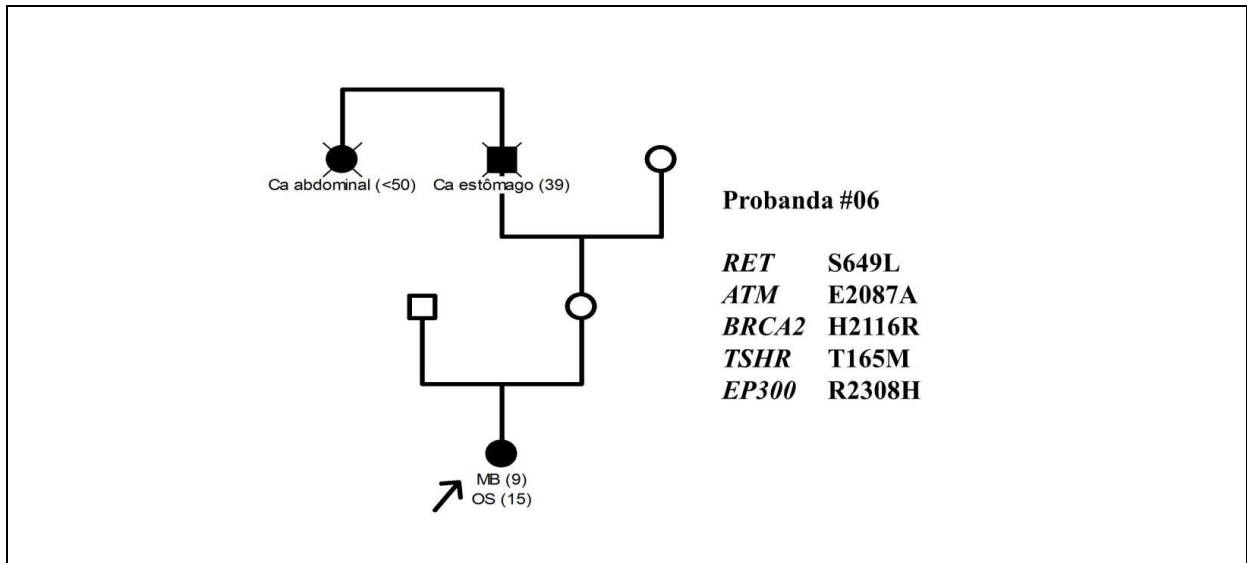


Figura 4.18. Heredograma da família da probanda #06. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. MB: Meduloblastoma; OS: Osteossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.3 Probanda #09

A probanda #09 apresentou uma extensa história familiar de câncer, com um total de 12 parentes em até 4º grau afetados (Figura 4.19). Dos tumores típicos da SLF foram relatados o câncer de mama (n=5, incluindo a probanda) e de sistema nervoso central (n=1), todos até os 50 anos. As únicas mutações potencialmente patogênicas apresentadas pela probanda foram nos genes *KDR* e *WTX*. A mutação C482R de *KDR* foi relatada como um possível fator de risco em pacientes com hemangioma infantil (JINNIN et al., 2008b), e não existem estudos sobre o significado clínico da mutação P884L no gene supressor tumoral *WTX*.

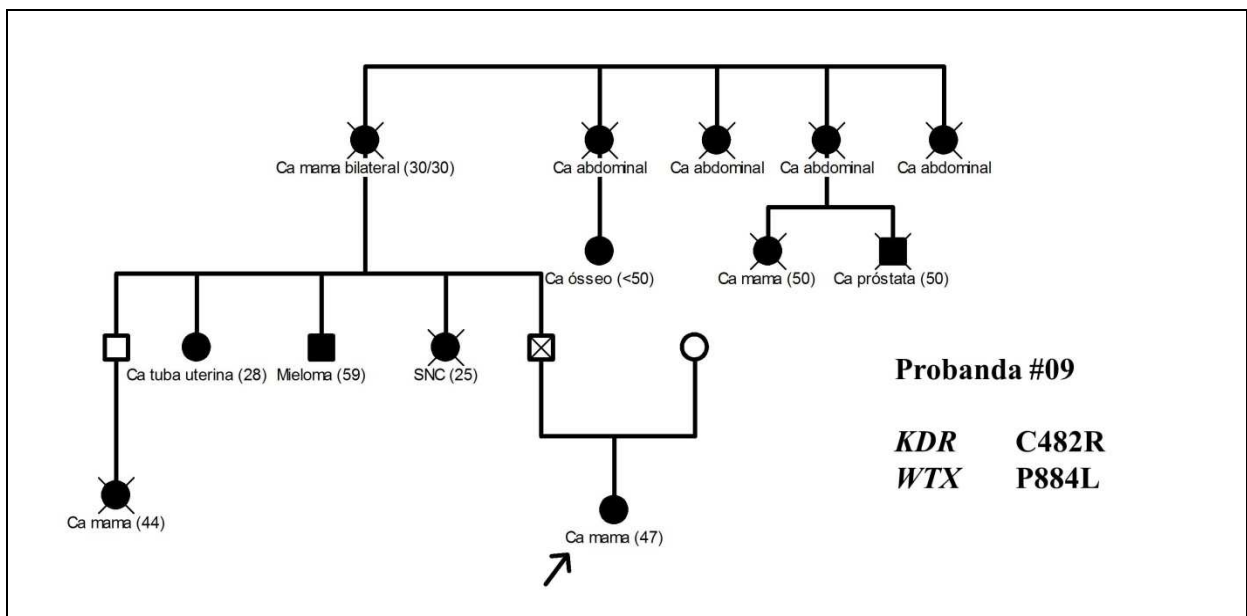


Figura 4.19. Heredograma da família da probanda #09. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. SNC: Tumor de sistema nervoso central. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.4 Probando #10

O probando #10 apresentou um osteossarcoma aos 18 anos e uma tia paterna que faleceu com câncer de mama antes dos 45 anos (Fig. 4.20), sendo a família incluída, portanto, nos critérios clínicos LFL de Chompret e Eeles. A única mutação indicada como patogênica pelos critérios utilizados neste trabalho foi uma mutação nova no gene *SMO* (c.502C>G; p.R168G).

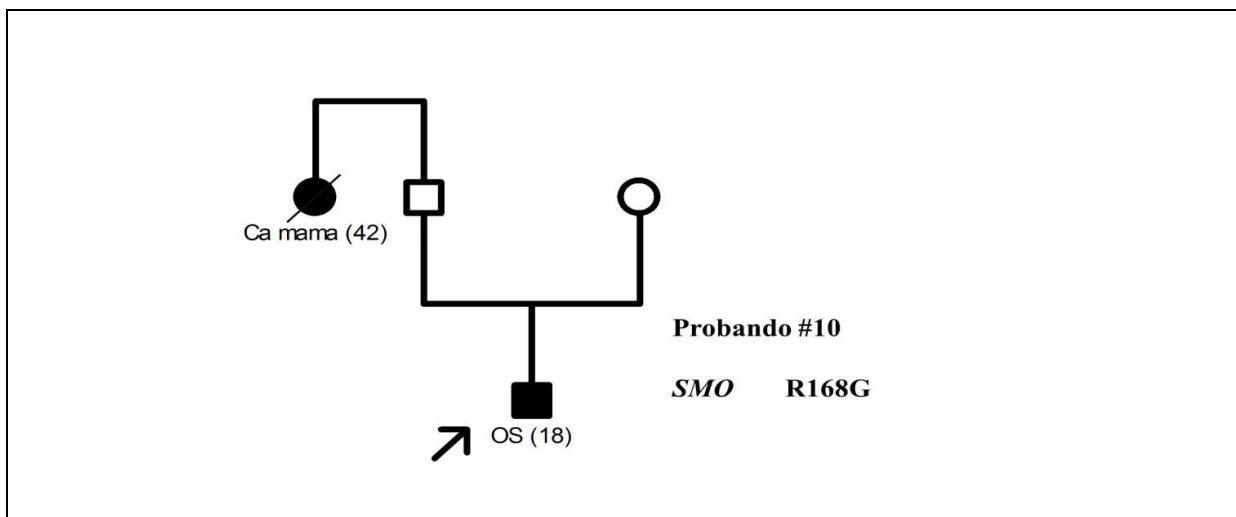


Figura 4.20. Heredograma da família do probando #10. À direita está a mutação potencialmente patogênica detectada na amostra de DNA do probando. OS: Osteossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.5 Probanda #15

A probanda #15 foi a que apresentou o maior número de casos de câncer na família, com um total de 16 tumores em 15 indivíduos (Figura 4.21), distribuídos em quatro gerações. Os tumores típicos da síndrome incluíram um caso de tumor cerebral, um sarcoma e cinco casos de câncer de mama. A probanda apresentou a mutação F1761S em *BRCA1*. Estudos funcionais indicam um impacto negativo dessa mutação na atividade transcricional da proteína (LEE et al., 2010). Além disso, ela não é relatada em populações de referência, critérios indicadores de patogenicidade de acordo com a *American College of Medical Genetics* (RICHARDS et al., 2015). Dessa forma, trata-se de uma mutação provavelmente patogênica. Ela também apresentou a mutação G79D em *PDGFRA*, sem importância clínica conhecida.

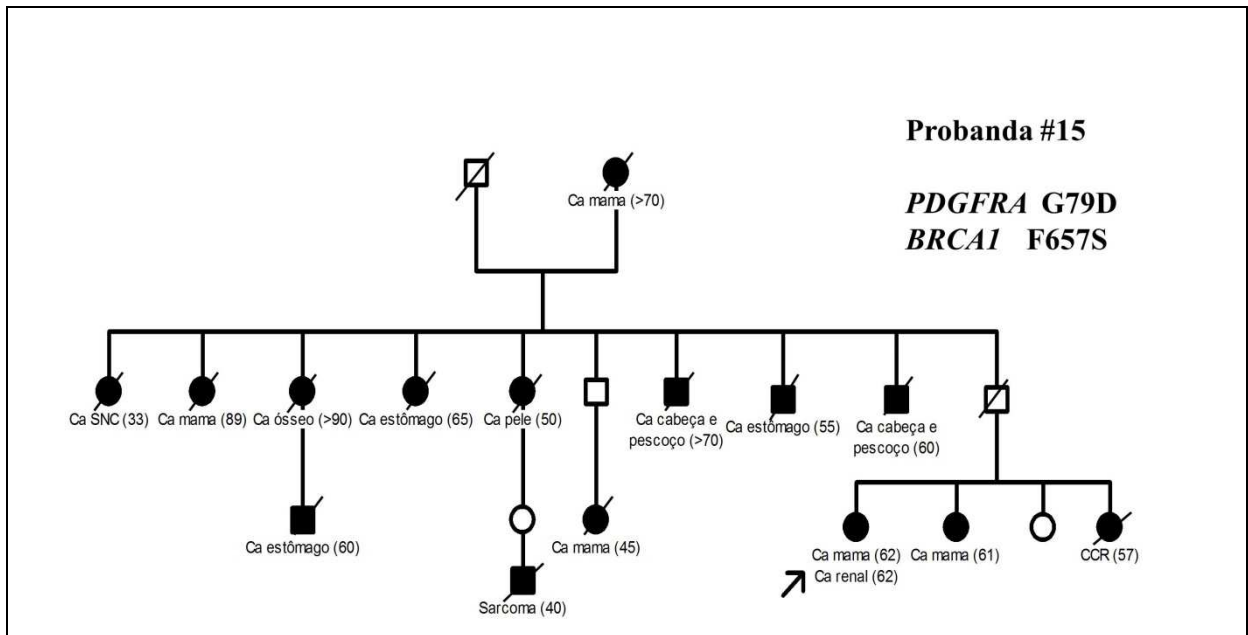


Figura 4.21. Heredograma da família da probanda #15. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. SNC: tumor de sistema nervoso central; CCR: câncer colorretal. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.6 Probanda #17

A probanda #17 apresentou dois tumores típicos da síndrome antes dos 50 anos: um sarcoma de partes moles e um tumor de sistema nervoso central. Além disso, sua irmã havia falecido com câncer de mama antes dos 35 anos de idade, e o pai também havia falecido de câncer (Figura 4.22). Ela apresentou mutações potencialmente patogênicas nos genes *ROS1* (c.5668A>G; K1890E), *PAX5* (c.923C>T; A308V) e *NOS1* (c.205G>A; G69S). Entre estes genes, apenas *PAX5* já teve associação relatada com susceptibilidade ao câncer, mais especificamente, à leucemia linfoblástica aguda (SHAH et al., 2013).

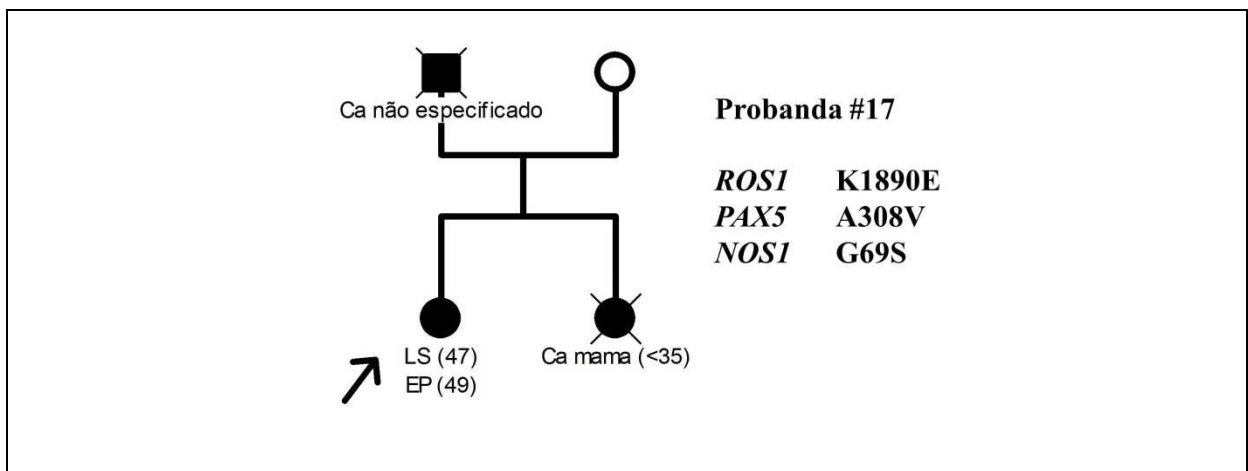


Figura 4.22. Heredograma da família da probanda #17. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. LS: Lipossarcoma; EP: Ependimoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.7 Probanda #20

A probanda #20 apresentou câncer de mama aos 39 anos, e uma irmã com condrossarcoma aos 35 anos, além do pai com câncer de próstata após os 60 anos (Figura 4.23). Essa paciente apresentou mutações potencialmente patogênicas nos genes *ROS1* (c.1108T>C; S370P) e *CREBBP* (c.1651C>A; L551I), ambas de significado clínico desconhecido.

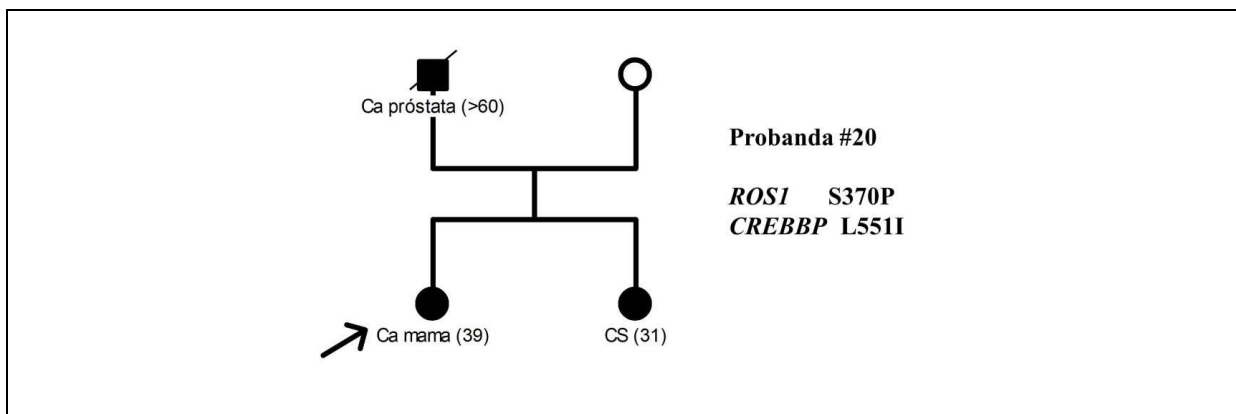


Figura 4.23. Heredograma da família da probanda #20. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. CS: Condrossarcoma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.8 Probanda #33

A probanda #33 apresentou dois tumores típicos da síndrome antes dos 50 anos, por si só preenchendo critérios de inclusão (Figura 4.24). Além disso, sua mãe também havia desenvolvido dois tumores primários, e sua família possuía quatro casos de câncer de mama e um caso de câncer de pâncreas. Ela apresentou a mutação S49C no gene *ATM*, associada à susceptibilidade ao câncer de mama (STREDRICK et al., 2006).

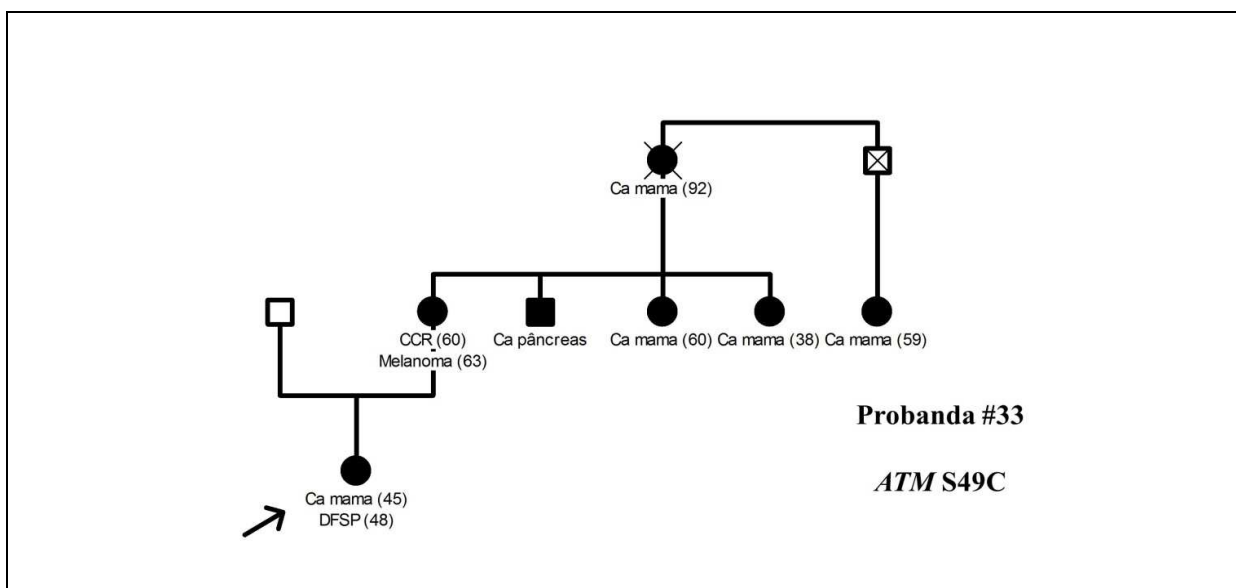


Figura 4.24. Heredograma da família da probanda #33. À direita está a mutação potencialmente patogênica detectada na amostra de DNA da probanda. DFSP: Dermatofibrosarcoma protuberans; CCR: Câncer colorretal. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.9 Probanda #41

A família da probanda #41 apresentou três casos de câncer, todos típicos da SLF: dois cânceres de mama e um caso de leucemia na infância (Figura 4.25). Ela apresentou a mutação A2951T no gene *BRCA2*, descrita como benigna no BIC, por apresentar frequência alélica elevada na população americana (0,0359). Também foi observada uma mutação de significado incerto no gene *ATM* (C532Y). As demais mutações nessa probanda não possuíam importância clínica conhecida. Elas estavam localizadas nos genes *PTPRC* (c.871C>T; P291S), *SETD2* (c.6118C>G; R2040G); *FLT4* (c.76T>G; S26A), *SMO* (c.503G>A; R168H) e *TSHR* (c.1721C>G; T574S).

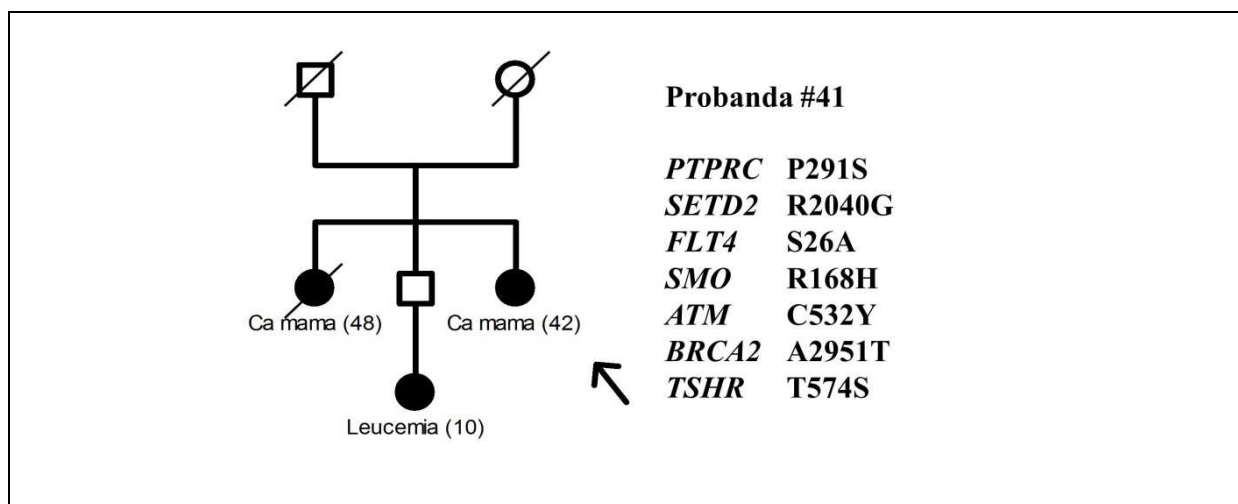


Figura 4.25. Heredograma da família da probanda #41. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA da probanda. Ca: câncer. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.10 Probanda #51

A probanda #51 apresentou apenas um outro caso de câncer na família: a avó paterna havia falecido com câncer de mama antes dos 40 anos, dessa forma preenchendo os critérios de Chompret e Eeles (Figura 4.26). A probanda teve um tumor de sistema nervoso central aos 9 anos de idade, e a única mutação potencialmente patogênica foi encontrada no gene *PIK3C2A* (c.4291A>C; T1431P).

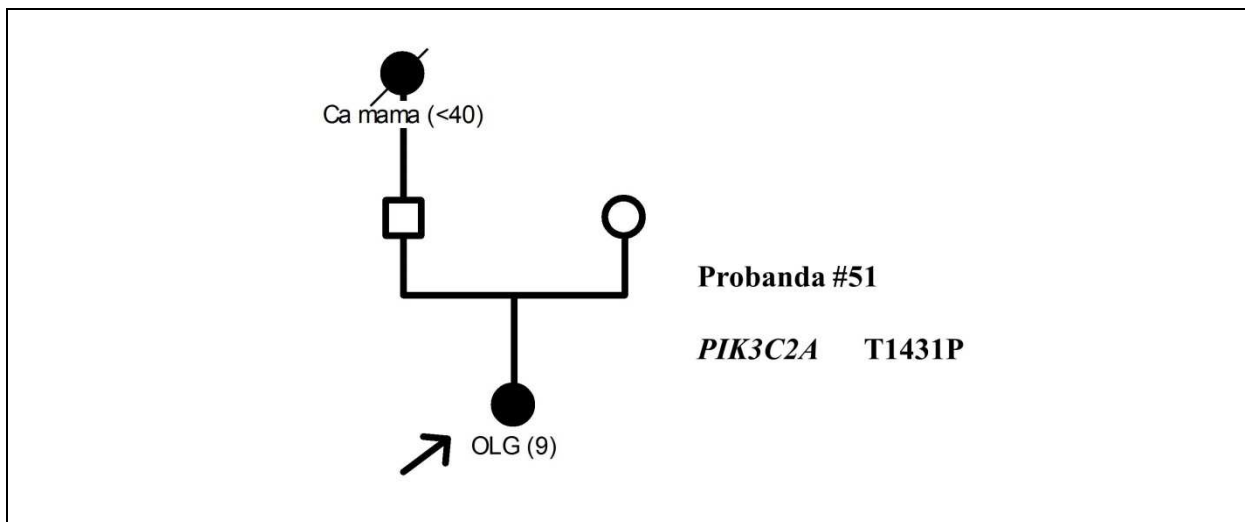


Figura 4.26. Heredograma da família da probanda #51. À direita está a mutação potencialmente patogênica detectada na amostra de DNA da probanda. OLG: Oligodendroglioma. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

4.12.11 Probando #65

O probando #65 foi o único cuja família possuía critérios clássicos para a SLF que não apresentou mutações detectáveis em *TP53* (Figura 4.27). Ele foi o único probando que apresentou uma mutação envolvendo múltiplos nucleotídeos em uma região exônica: a mutação c.2926_2927delTCinsAT, no éxon 11 de *BRCA2*, que resulta na troca de uma serina por uma isoleucina na posição 976 da proteína BRCA2. Essa mutação é classificada como benigna na base de dados BIC. Outra mutação encontrada foi no gene *SETD2* (c.1180T>C; C394R).

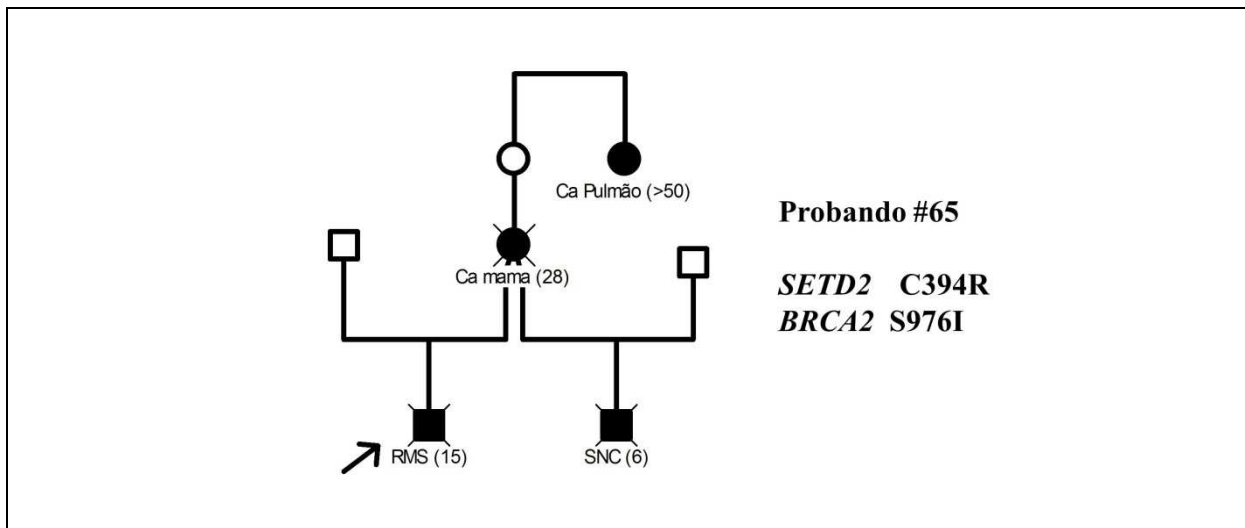


Figura 4.27. Heredograma da família do probando #65. A família apresentou critérios clássicos para a síndrome de Li-Fraumeni. À direita estão as mutações potencialmente patogênicas detectadas na amostra de DNA do probando. RMS: Rbdomiossarcoma. SNC: Sistema nervoso central. Entre parênteses estão as idades ao diagnóstico.

5 Discussão

A Síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome de recente descrição (LI; FRAUMENI, 1969a). Somente em 1990 foi possível relacionar seu fenótipo peculiar a um gene alvo: o supressor tumoral *TP53* (MALKIN et al., 1990). Desde então, a investigação molecular de indivíduos sob risco levantou diversas questões. Entre elas, destaca-se a variabilidade de tumores presentes nas famílias afetadas, que torna um desafio a definição de critérios clínicos objetivos para a escolha de indivíduos a serem testados. Além disso, os indivíduos entre diferentes famílias afetadas não exibem as mesmas chances de desenvolver tumores, e a razão dessa variabilidade ainda é desconhecida (MCBRIDE et al., 2014).

Outro ponto relevante é a incidência da síndrome em diferentes populações, que ainda não está bem determinada, o que é importante para a compreensão do impacto da mesma sobre a morbi-mortalidade associada ao câncer, e para o desenvolvimento de conhecimento para o manejo correto dos indivíduos sob risco. A elevada penetrância de algumas mutações em *TP53*, independente de sua incidência, justifica o desenvolvimento de protocolos experimentais de rastreamento precoce, prevenção e tratamento, minimizando os efeitos nocivos do uso da radiação, por exemplo. Por fim, é necessário investigar que outras alterações genéticas poderiam estar associadas ao desenvolvimento desses tumores, já que um número expressivo de famílias com fenótipo característico da síndrome não apresenta mutações detectáveis em *TP53*, e quais são as implicações disso no aconselhamento genético das mesmas (MAI et al., 2012; MCBRIDE et al., 2014).

O presente estudo buscou identificar o perfil tumoral de famílias com suspeita clínica para a SLF/LFL, majoritariamente do estado do Rio de Janeiro. Buscou-se descrever as características clínicas peculiares em relação aos portadores de mutação, e a investigação de mutações germinativas em outros genes em indivíduos sem mutação detectável em *TP53*.

5.1 Caracterização clínica dos indivíduos incluídos no estudo

Cinquenta e oito pacientes foram incluídos neste estudo por suspeita clínica de SLF/LFL. Esse grupo heterogêneo de probandos, com histórias individuais e/ou familiares de câncer sugestivas da síndrome, foi investigado quanto à presença de mutações em *TP53*. Após a análise de seus prontuários, foi possível identificar 39 indivíduos de famílias que preenchem os critérios clínicos da SLF/LFL estabelecidos na literatura (Grupo 1), e 19 probandos que não preenchem estes critérios (Grupo 2).

No Grupo 1, o espectro tumoral de probandos e suas famílias mostrou-se bastante amplo, consistente com a alta complexidade de fenótipos da SLF/LFL, já observada em diversos estudos (BIRCH et al., 1994; WONG et al., 2006; GONZALEZ et al., 2009). Foram

relatados 220 tumores em 39 famílias, variando de 1 a 16 casos por família, e correspondendo a cerca de 5,6 casos/família. Entretanto, é difícil analisar com maior precisão a porcentagem de membros acometidos na família de cada probando, porque o detalhamento fornecido a respeito da história familiar de câncer variou muito entre os indivíduos entrevistados. Além disso, não temos comprovação de todos os tumores relatados nos familiares.

Entre os tumores mais frequentes no Grupo 1 deste estudo, encontram-se o câncer de mama, câncer colorretal, leucemias e linfomas, câncer estômago e de sistema nervoso central. Essas neoplasias estão entre os 10 tipos mais incidentes em homens e/ou mulheres na população brasileira (INCA, 2015). É importante ressaltar que a elevada incidência desses tumores na população geral pode dificultar o reconhecimento de famílias com critérios para análise molecular, tanto para a SLF/LFL quanto para outras síndromes de câncer hereditário. Isso torna importante a divulgação, para os profissionais da saúde e para a população, de estudos a respeito desse tema. Os diferentes tipos de sarcoma totalizaram 10% do total de tumores no Grupo 1; um índice bastante representativo, considerando a baixa frequência desses tumores na população geral.

Já no Grupo 2 (LFL-suspeita), houve 70 tumores relatados em 19 famílias, com uma média de 3,7 tumores por família, e um máximo de 5 casos relatados numa mesma família. Esta diferença deu-se pelo fato dos probandos do Grupo 2 terem características menos destacadas de história familiar de câncer para inclusão no estudo. Entretanto, a presença de tumores mais característicos da síndrome nesses probandos foi uma prioridade para a suspeita clínica, visto que os sarcomas de partes moles foram o tipo mais frequente de tumor neste grupo.

5.2 Detecção de mutações germinativas em *TP53*

5.2.1 Grupo 1

A primeira investigação realizada nas amostras incluídas neste estudo foi o sequenciamento das regiões codificantes e regiões intrônicas flanqueadoras de *TP53*, que é a investigação padrão recomendada quando existe suspeita clínica da SLF/LFL. Estima-se que cerca de 95% das mutações germinativas em *TP53* sejam detectadas por essa técnica (SCHNEIDER et al., 2013).

Entre os 39 pacientes do Grupo 1, seis apresentaram mutações de sentido trocado em heterozigose no gene *TP53*. Entre estas mutações, quatro (80%) estavam presentes entre os éxons 5 a 8 de *TP53*, que correspondem às regiões codificantes do domínio de ligação ao DNA da proteína p53. Sabe-se que essas são as regiões onde se concentra a maior parte das mutações em *TP53*, tanto em tumores quanto na linhagem germinativa (MALKIN, 2011).

Estudos *in vitro* demonstraram que diferentes mutações em *TP53* possuem diferentes graus de perda de atividade transcricional, e algumas podem exibir efeito dominante negativo e/ou ganho de função (BRACHMANN; VIDAL; BOEKE, 1996; LANG et al., 2004; OLIVE et al., 2004). Dessa forma, a determinação de uma correlação genótipo-fenótipo entre portadores de mutações em *TP53* pode contribuir com o acompanhamento clínico dos mesmos.

OLIVIER et al. (2003), através de uma análise feita com a base de dados IARC, buscaram determinar que tipos de tumores seriam mais frequentes dependendo da consequência estrutural da mutação de *TP53* na proteína. Entretanto, as únicas associações estatisticamente significativas foram em relação a tumores cerebrais e carcinomas adrenocorticais. Os tumores cerebrais mostraram-se mais frequentes em famílias cuja mutação de sentido trocado alterava regiões de p53 que se ligam ao sulco menor do DNA (códon 164 a 194 e 237 a 250) ($p=0,01$). Em relação aos tumores adrenocorticais, eles mostraram-se mais frequentes em famílias cuja mutação acarretava em alterações fora do domínio de ligação ao DNA da proteína ($p=0,003$). Em nosso estudo, a mutação associada a tumor cerebral (família #12) e uma das mutações associadas a tumores adrenocorticais (família #36) não seguiram esse padrão. Também no estudo de OLIVIER et al. (2003), não foram encontradas associações entre a consequência estrutural da mutação e o critério clínico preenchido pela família (LFS ou LFL). Isso mostra que existem outros fatores mais relevantes influenciando na variabilidade de fenótipos dessas famílias.

O ganho de função pela proteína p53 mutada também é um fator candidato à associação diferenciada com espectro tumoral e idade de acometimento. XU et al. (2014) investigaram mutações de sentido trocado em *hotspots* de *TP53* que exibiam ganho de função (códon 175, 220, 245, 273, 248, 282), comparando-as a mutações sem sentido (mutações *nonsense*). Foi observado que mutações no códon 282 estavam associadas a uma idade mais precoce de desenvolvimento dos tumores em relação às mutações de perda de função. Além disso, mutações nos códon 175 e 248 foram associadas a tumores cerebrais, enquanto mutações nos códon 282 e 220 foram associadas a tumores ósseos ($p<0,05$). PETITJEAN et al. (2007a) compararam a idade de desenvolvimento de tumores entre portadores de mutações que acarretavam numa p53 parcialmente funcional em relação a mutações com perda total da função da proteína. Eles mostraram que mutantes p53 não funcionais estavam associados a uma idade de desenvolvimento tumoral mais precoce em relação a mutantes p53 parcialmente funcionais, em casos de câncer de mama e colorretal. Dessa forma, fica evidente a complexidade de fatores envolvendo a penetrância das mutações em *TP53*, que ainda precisam ser elucidados para o melhor acompanhamento clínico dos pacientes.

Dos seis pacientes do Grupo 1 (SFL/LFL) com mutação de sentido trocado, apenas um apresentou a mutação fundadora R337H (paciente #25). A investigação de famílias brasileiras com critérios clínicos para a SLF/LFL realizada por ACHATZ et al. (2007) revelou que a R337H estava presente em 6 de 13 famílias com mutações em *TP53*. A maior parte das famílias investigadas foi encaminhada de centros de aconselhamento genético de São Paulo e Rio Grande do Sul (42/45). A investigação do haplótipo associado a esta mutação revelou que o R337H foi originado de um fundador. Esse fundador teria vivido no sul do Brasil, e a disseminação da mutação teria acompanhado o desenvolvimento das cidades e vilas ao longo do caminho entre São Paulo e Rio Grande do Sul, na rota dos tropeiros (GARRITANO et al., 2010). Essa hipótese é compatível com a alta prevalência da mutação nesta área e a sua aparente menor frequência em outros Estados. A mãe do paciente #25 deste estudo não era portadora da R337H. Ela tinha perdido contato com o pai do paciente, e não tinha nenhuma informação sobre sua história familiar de câncer.

Entre as amostras dos pacientes do Grupo 1 sem mutação detectada pelo sequenciamento, a análise por MLPA foi possível para 30 deles. Duas grandes deleções foram detectadas no gene *TP53*. Dessa forma, do total de portadores de mutações no Grupo 1 (n=8), dois (25%) exibiram grandes deleções, contrastando com o que é relatado na base de dados IARC *TP53*, onde este tipo de mutação representa apenas 0,7% das mutações germinativas relatadas neste gene (PETITJEAN et al., 2007b). BOUGEARD et al. (2003) investigaram a presença de deleções ou ampliações em *TP53* em 98 famílias com critérios SLF/LFL sem mutações detectáveis por sequenciamento, e encontraram apenas um caso de deleção no gene em uma família com critério clássico para a síndrome. Acreditamos que o resultado em nossa coorte reforça a importância da investigação de rearranjos, adicionalmente ao sequenciamento direto, para evitar a subestimação de portadores de mutação germinativa em *TP53*.

Em relação aos outros genes incluídos no *kit* de MLPA utilizado (*MDM2*, *CDK4*, *MIR26A2*, *EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A*, *PDGFRA* e *NFKBIA*), nenhum apresentou rearranjos nos pacientes. Esses genes estão envolvidos em vias de sinalização críticas do ciclo celular, alteradas em diversos tipos de câncer. Embora outros genes além de *TP53* não estejam significativamente associados à SLF/LFL, ocasionalmente algumas associações pertinentes são relatadas. Recentemente, foram identificadas 20 CNVs não descritas em quinze pacientes que preenchem os critérios LFL de Chompret (e que não tinham mutações em *TP53*). Entre os 49 genes presentes nas regiões das CNVs, foi encontrada uma elevada ocorrência de genes envolvidos na metilação ou acetilação de histonas (AURY-LANDAS et al., 2013).

5.2.2 Grupo 2

No grupo que não preenchia os critérios para SFL/LFL, o resultado das análises por sequenciamento de *TP53* e MLPA revelou apenas uma mutação: R156H, no éxon 5 de *TP53*, apresentada pela paciente #11. Curiosamente, ela apresentou um tipo de carcinoma hepático que até então nunca havia sido relatado em portadores de mutação em *TP53*: o carcinoma fibrolamelar.

O carcinoma fibrolamelar (CFL) é um subtipo muito raro de carcinoma hepatocelular, com uma taxa de incidência ajustada à idade de 0,2 por 100.000 nos Estados Unidos (EL-SERAG; DAVILA, 2004). Ele é mais frequente em pacientes jovens sem doença hepática prévia, com 80% dos casos ocorrendo entre os 10 e 35 anos de idade (TORBENSON, 2012). Até pouco tempo atrás, não existiam mutações *driver* (promotoras) reconhecidas para o desenvolvimento deste tumor. Ele carrega um padrão molecular muito distinguível do carcinoma hepatocelular típico, não estando associado a mutações somáticas em genes comumente alterados neste último, como *TP53* e *CTNNB1* (WARD; WAXMAN, 2011). Estudos recentes utilizando sequenciamento de nova geração e/ou técnicas de hibridação por *array* confirmaram que o CFL tem uma taxa relativamente baixa de mutações somáticas e alterações cromossômicas. A descoberta mais promissora como mutação *driver* neste tipo de tumor foi a presença de um transcrito quimérico, DNAJB1-PRKACA, que confere um aumento da atividade da proteína cinase dependente de AMP cíclico (PKA) nas células tumorais. Esse transcrito resulta de uma deleção de aproximadamente 400 kb no cromossomo 19, encontrada em todas ou na maioria das amostras analisadas. O transcrito é expresso em CFL, mas não em tecido normal adjacente ao tumor (CORNELLA et al., 2014; HONEYMAN et al., 2014; DARCY et al., 2015; XU et al., 2015).

O gene *TP53*, que tem uma taxa de mutação somática de até 35% no carcinoma hepatocelular típico (OZEN et al., 2013), não exibiu mutações ou metilação da região promotora em amostras de CFL, em diversos estudos realizados com este tipo de tumor (HONDA et al., 1998; VIVEKANANDAN; TORBENSON, 2008; HONEYMAN et al., 2014; XU et al., 2015). MAITRA et al. (2000) relataram um paciente que desenvolveu CFL e tumor de Wilms (TW) anaplásico. Esse paciente foi investigado quanto à presença de mutações germinativas e somáticas em *TP53*, mas o resultado foi negativo. Mutações germinativas em *TP53* só foram relatadas em quatro indivíduos com câncer primário de fígado (dois carcinomas hepatocelulares típicos, um hepatoblastoma, um câncer de fígado não especificado), e aparentemente, nenhum desses pacientes desenvolveu o subtipo fibrolamelar (PETITJEAN et al., 2007b). Dada a importância clínica das mutações em *TP53*, e sua associação com um vasto espectro tumoral, é plausível acreditar que no caso relatado neste

estudo, a mutação germinativa R156H de *TP53* da probanda #11 pode estar envolvida na etiologia do carcinoma fibrolamelar, e a mutação somática detectada, G154D, possivelmente estaria agindo como o segundo evento mutacional.

Como já mencionado, o fenótipo das famílias com mutação em *TP53* pode variar de acordo com a consequência da mutação na atividade transcricional da proteína, (PETITJEAN et al., 2007a). A substituição R156H é uma das mutações que resultam numa proteína parcialmente funcional, assim como a mutação R337H. Já as demais mutações de sentido trocado encontradas neste estudo resultam em proteínas com ausência total da função normal de p53. Esse fato pode explicar o fenótipo mais brando na família da paciente #11, que não apresentou critérios clínicos SLF/LFL, embora a paciente tivesse uma prima de segundo grau com um osteossarcoma aos 10 anos, no mesmo lado da família do qual ela herdou a mutação (Figura 4.12).

De fato, os relatos mostram que a mutação R156H foi confirmada em apenas oito indivíduos com câncer de quatro famílias diferentes, e não representa uma mutação comum em famílias com critérios clínicos SLF/LFL (PETITJEAN et al., 2007b), podendo estar associada a fenótipos mais brandos da síndrome. A ocorrência desse tumor nessa paciente chama a atenção para duas considerações sobre o teste genético de *TP53*: o contínuo crescimento do espectro de tumores relacionados a mutações neste gene, e a influência de fatores ainda pouco compreendidos na penetrância de mutações do gene *TP53*, gerando diferentes fenótipos de LFS/LFL.

5.3 Investigação de mutações em *CDKN1A*

A proteína p21, codificada por *CDKN1A*, é o principal mediador de p53 na parada do ciclo celular em resposta a danos ao DNA. Camundongos nocaute para *CDKN1A* exibem um desenvolvimento precoce de tumores. Entre esses tumores, estão alguns tipos de sarcomas, os tumores mais característicos da SLF (MARTÍN-CABALLERO et al., 2001). Dessa forma, é plausível que mutações nesse gene mimetizassem os efeitos de uma mutação em *TP53*, motivo pelo qual ele foi investigado em nossa coorte. Entretanto, não foram encontradas mutações patogênicas em nenhum dos pacientes investigados. Uma mutação germinativa em *CDKN1A* já foi relatada em um paciente com sinais clínicos da neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (MEN-1) (AGARWAL; MATEO; MARX, 2009). A MEN-1 é uma síndrome de câncer hereditário associada a tumores endócrinos e neuroendócrinos, cujas mutações mais comuns encontram-se no gene *MEN1*. Outra mutação germinativa possivelmente patogênica em *CDKN1A* foi encontrada em um paciente com adenoma esporádico de paratireoide (COSTA-

GUDA et al., 2013), sugerindo uma possível relação de mutações germinativas desse gene com tumores endócrinos.

5.4 Comparação entre famílias com mutação e sem mutação em *TP53*.

Todos os probandos com mutações detectadas em *TP53* neste estudo desenvolveram tumores típicos da síndrome, ou tinham algum familiar com tumor típico da síndrome. Entre os probandos com mutação, os tumores mais comuns foram, nessa ordem, os osteosarcomas, sarcomas de partes moles, tumores adrenocorticais e um caso de cada um dos seguintes tumores: linfoma não Hodgkin, melanoma, neurofibroma e carcinoma fibrolamelar. Ao somarmos os tumores dos probandos e de seus familiares, alguns cânceres pouco comuns em portadores de mutação em *TP53* aparecem entre os mais frequentes: o câncer colorretal (14,3%), câncer de próstata (8,6%) e câncer de pulmão (5,7%), que na base de dados IARC *TP53* representam, respectivamente, 3,1%, 0,24% e 2,5% dos tumores em portadores de mutações em *TP53* (PETITJEAN et al., 2007b). Não podemos descartar a possibilidade de alguns desses tumores em nossa coorte serem fenocópias (ou seja, os parentes afetados não possuem a mesma mutação detectada no probando), dada sua elevada frequência na população em geral. Essa possibilidade é maior nos casos em que o parentesco entre o probando e os familiares afetados era distante (como no exemplo da família #36), o que aumenta as chances da mutação não ser compartilhada entre eles.

Entretanto, esse dado também pode refletir uma subestimação da frequência de mutações em *TP53* em pacientes com tumores “não típicos” da SLF, pois o excesso destes cânceres em uma mesma família não costuma levantar a suspeita clínica que leva à indicação do teste molecular. Um estudo de WONG et al. (2006) evidenciou que 12,5% das famílias com critérios clínicos para SLF e mutação em *TP53* detectada tinham pelo menos um caso de câncer colorretal antes dos 50 anos. ACHATZ (2008) verificou que o câncer colorretal e câncer de estômago eram mais comuns nas famílias SLF/LFL brasileiras que o esperado, e recomendou que fosse introduzida a investigação de CCR e câncer de estômago no manejo clínico dos pacientes SLF/LFL, dependendo do contexto populacional e familiar.

Os tumores de mama, que são os mais frequentes em portadores de mutação em *TP53* (27,8%) (PETITJEAN et al., 2007b), representaram apenas 8,6% dos tumores nas famílias de portadores de mutação neste estudo. Isso pode representar apenas um viés na estrutura das famílias em questão: talvez houvesse poucas mulheres portadoras de mutação em idade de risco para o desenvolvimento desse tipo de tumor. Entretanto, ao menos na família #53, espera-se que pelo menos três mulheres sejam portadoras da deleção no éxon 8 de *TP53*, e nenhuma delas desenvolveu câncer de mama. Vale ressaltar que, no presente

estudo, todos os casos de câncer de mama nas famílias de probandos com mutação ocorreram na faixa etária de 25 a 35 anos, corroborando a idade extremamente precoce associada ao câncer de mama na SLF (LEE et al., 2012). Em nossa coorte, o câncer de mama não se mostrou um bom tumor “sentinela” para detecção de mutações germinativas em *TP53* quando não ocorria antes dos 35 anos e não estava associado a outros tumores típicos da síndrome em idade precoce. Essa proposição já foi feita previamente em outros países (GONZALEZ et al., 2009a), embora estudos no Brasil tenham mostrado que em alguns estados, os casos de câncer de mama têm uma frequência significativa da mutação R337H de *TP53*, independente dos pacientes preencherem ou não os critérios para a SLF/LFL (ASSUMPCÃO et al., 2008; CURY; FERRAZ; SILVA, 2014; GIACOMAZZI et al., 2014a; SILVA et al., 2014a). No Rio de Janeiro, 104 mulheres com forte história familiar de câncer de mama foram testadas para a presença de mutações em *TP53*, incluindo a investigação apenas dos éxons 5 a 8 deste gene, e apenas uma portadora de mutação foi identificada (0,96%) (SOUZA, 2005).

Em nossa coorte, apenas três dos *core cancers* (tumores típicos) da SLF mostraram-se bons tumores “sentinelas” para detecção de mutações em *TP53*: sarcoma de partes moles, osteossarcoma, e tumores adrenocorticais. Isso porque os osteossarcomas, sarcomas de partes moles e tumores adrenocorticais foram mais frequentes em famílias cujo probando era portador de uma mutação, em relação às famílias sem mutação detectada no probando ($p < 0,05$). Os outros três *core cancers* (câncer de mama, leucemias e tumores do sistema nervoso central) não apresentaram o mesmo resultado. Sarcomas são os tumores mais característicos da síndrome. Um estudo desenvolvido por OGNJANOVIC et al. (2012), comparando a incidência de sarcomas entre portadores de mutação em *TP53* e a população geral dos Estados Unidos, mostrou que entre os portadores, 67% dos sarcomas ocorriam antes dos 20 anos de idade, enquanto que na população geral, apenas 11,9% ocorrem nessa faixa etária. Logo, um sarcoma pediátrico tem maiores chances de estar associado a mutações em *TP53* ($P < 0,00001$). O sarcoma mais provável de ser desenvolvido em um portador de mutação em *TP53* é o osteossarcoma, exceto em menores de 5 anos, quando o rabdomiossarcoma é o sarcoma mais provável. Os sarcomas reunidos representam cerca de 25% dos tumores em portadores de mutação em *TP53*.

Em relação aos tumores adrenocorticais, os únicos dois casos presentes em nossa coorte apresentaram mutação em *TP53* (pacientes #25 e #36). Sabe-se que 50% a 80% dos indivíduos com carcinoma adrenocortical pediátrico carregam uma mutação em *TP53*, o que por si só já justifica o teste genético nesses indivíduos (WAGNER et al., 1994; VARLEY et al., 1999). Essa prevalência cai para 5,8% em carcinomas adrenocorticais adultos (RAYMOND et al., 2013).

No caso da probanda #36 (que apresentou um tumor adrenocortical e posteriormente um osteossarcoma), uma revisão do laudo histopatológico de seu primeiro tumor evidenciou que este se tratava de um adenoma, e não de um carcinoma adrenocortical. Um estudo anterior também relatou uma paciente com um adenoma adrenocortical e um osteossarcoma na infância, diagnosticada com a mutação germinativa R282W de *TP53* (PROCHAZKOVA et al., 2009). Lesões benignas são ocasionalmente relatadas em portadores de mutação em *TP53*, como por exemplo: leiomiomatose, (KAZARIN et al., 2013), meningioma (RIESKE et al., 2005), pólipo endometrial (VARLEY et al., 1996), triquilemoma (EELES et al., 1993) e timoma (BOUGEARD et al., 2015). Entretanto, não está determinado se essas lesões benignas são achados incidentais ou se a mutação de *TP53* participa de sua etiologia. Se esse for o caso, é plausível pensar que essas mutações alteram a chance de uma lesão benigna malignizar, e portanto, essa lesão deve ser acompanhada com maior cautela. Dessa forma, apesar de adenomas não fazerem parte espectro tumoral da SLF, crianças com adenomas que venham a desenvolver um tumor típico da SLF (como o osteossarcoma desenvolvido pela probanda #36), deveriam ser consideradas para a investigação do gene *TP53*.

Dois dos tumores relatados neste trabalho chamaram a atenção por não serem usualmente associados a mutações germinativas em *TP53*: o carcinoma fibrolamelar, como já discutido, e o caso de neurofibroma, no paciente #12, que ocorreu sete anos após o tratamento de um rabiomiossarcoma. Na base de dados IARC só consta um caso relatado de neurofibroma em um portador de mutação em *TP53* (BIRCH et al., 1994; PETITJEAN et al., 2007b). Neurofibromas são tumores benignos da bainha de nervo periférico. Esses tumores são frequentes em pacientes com neurofibromatose tipo 1, doença associada a mutações no gene *NF1* (17q11.2). A neurofibromatose também é caracterizada por sinais clínicos como manchas café-com-leite e nódulos de Lisch nos olhos. Sua incidência é de cerca de 1 em cada 2.500 a 3.000 indivíduos (WILLIAMS et al., 2009). RAYMOND et al. (2013) descreveram o caso de uma paciente com mutações germinativas tanto em *NF1* quanto em *TP53*, que acarretaram no aparecimento de sinais clínicos da neurofibromatose e da SLF (desenvolvimento de carcinoma adrenocortical e glioblastoma). O paciente com neurofibroma em nosso estudo não apresentou as demais características clínicas da neurofibromatose tipo 1. Ele apresentou um neurofibroma não plexiforme, que normalmente não causa dor ou prejuízos neurológicos, e em geral não maligniza (WILLIAMS et al., 2009). A influência de uma mutação germinativa em *TP53* no desenvolvimento deste neurofibroma e na sua possível malignização é incerta.

Quanto à sobrevida reduzida dos pacientes do grupo 1 com mutação detectada, alguns fatores devem ser considerados. Essa análise sofreu um importante viés, já que os

probandos apresentavam tumores diferentes, com protocolos de tratamento e prognósticos diferentes, o que seria um fator de confundimento. Entretanto, se as mutações germinativas em *TP53* predisõem preferencialmente a tumores de pior prognóstico, indiretamente elas estariam influenciando na pior sobrevida desses indivíduos. De fato, essas mutações muitas vezes estão associadas a subtipos histológicos mais agressivos de tumores (TALWALKAR et al., 2010; HOLMFELDT et al., 2013), e a respostas menos eficazes ao tratamento (CUDDIHY; BRISTOW, 2004; FAYETTE; BLAY, 2005). Por isso, muitos desses pacientes recebem tratamentos mais agressivos de quimioterapia e/ou radioterapia, o que por si só pode influenciar no desfecho. Além disso, a propensão ao desenvolvimento de tumores secundários após a radioterapia também pode ter impacto na sobrevida dos pacientes (KAMIHARA; RANA; GARBER, 2014). A adequação do tratamento é prejudicada pelo fato desses indivíduos não terem o diagnóstico molecular da síndrome à ocorrência do primeiro câncer. Recomenda-se, sempre que possível, priorizar a realização de cirurgias e evitar radioterapia para os pacientes com mutação em *TP53*, embora o custo-benefício deva ser considerado (KAMIHARA; RANA; GARBER, 2014; KAPPEL et al., 2015).

Foi relatado que mutações germinativas em *TP53* podem induzir um fenômeno denominado cromotripse (RAUSCH et al., 2012). Normalmente, os tumores acumulam rearranjos genômicos graduais ao longo de seu desenvolvimento. Na cromotripse, entretanto, em um único evento ocorre a fragmentação massiva dos cromossomos e o reagrupamento desses fragmentos de forma desordenada (STEPHENS et al., 2011). Como resultado, uma amplificação massiva de oncogenes e/ou perda de alelos de genes supressores tumorais pode ocorrer, fornecendo vantagens seletivas às células tumorais (STEPHENS et al., 2011; RAUSCH et al., 2012). Esse fenômeno pode estar associado a um pior prognóstico. De fato, uma sobrevida reduzida foi relatada em pacientes com leucemia mielóide aguda com cromotripse e mutações em *TP53* (RAUSCH et al., 2012). Curiosamente, duas das mutações germinativas associadas à cromotripse no estudo de RAUSCH e colaboradores (2012) também foram encontradas em pacientes do nosso estudo: na probanda #36 (R248W), e no probando #50 (R175H). Estes dois pacientes desenvolveram osteossarcomas pouco responsivos ao tratamento, vindo a óbito.

Esses fatores demonstram uma relação plausível entre a presença de mutações germinativas em *TP53*, uma pior resposta ao tratamento e pior prognóstico dos pacientes. Entretanto, a literatura carece de dados mais precisos a respeito dessa associação, em parte pelo fato de se tratar de uma síndrome rara e com fenótipos muito heterogêneos (NICHOLS; MALKIN, 2015).

5.5 Critérios clínicos utilizados na investigação de mutações em *TP53*

Como esperado, o critério clássico da síndrome de Li-Fraumeni mostrou-se o mais específico e com o melhor valor preditivo positivo. Este é o critério mais restrigente da síndrome, tanto no espectro tumoral, quanto na idade de acometimento e número de indivíduos afetados na mesma família (LI et al., 1988). Entretanto, o avanço na investigação molecular de *TP53* mostrou que a variabilidade de fenótipos entre os portadores de mutação exigia critérios mais abrangentes. Entre os propostos, o critério de Chompret mostra-se o mais completo, por incluir a ocorrência de determinados fenótipos tumorais num único indivíduo, independente da história familiar, como característica suficiente para a realização do teste genético (CHOMPRET et al., 2001; BOUGEARD et al., 2015).

Estudos anteriores mostraram uma sensibilidade de 82% a 92%, e especificidade entre 53% e 58% para este critério (BOUGEARD et al., 2008; GONZALEZ et al., 2009). Em nossa coorte a história individual de câncer no probando foi um fator importante na sensibilidade deste critério, já que 3/8 (37,5%) portadores de mutação do Grupo 1 foram incluídos unicamente com base no histórico individual de câncer (pacientes #25, #36 e #49). Outros três pacientes (#12, #28 e #35) com mutação nesse grupo também cumpriam os critérios Chompret com base na história individual mais familiar de câncer, totalizando uma sensibilidade de 75% para o critério de Chompret no Grupo 1. É importante lembrar que os cálculos de sensibilidade, especificidade e valores preditivos dos critérios SLF/LFL neste estudo incluíram três pacientes para os quais apenas o sequenciamento de *TP53* foi realizado satisfatoriamente, sem resultados de MLPA. Entretanto, acreditamos que isso não afeta significativamente os resultados.

Quanto ao critério LFL de Eeles, ele demonstrou o menor valor preditivo positivo e foi o menos específico do estudo em questão. Como este se tratou de um estudo inicial, consideramos a adoção de critérios menos restritivos para o teste genético de *TP53* justificável, para a melhor caracterização epidemiológica da síndrome em nossa região. Foi considerada a possibilidade da prevalência de portadores de mutação em *TP53* nessa região ser elevada, assim como ocorre nos estados de São Paulo e do Sul do Brasil, pela ocorrência da mutação R337H. Como essa e outras mutações de *TP53* tem uma penetrância reduzida (PETITJEAN et al., 2007a; ACHATZ, 2008; YAMAGUCHI et al., 2016), algumas famílias com mutações nesse gene podem ter fenótipos menos óbvios da SLF/LFL. Também foi levada em conta uma possível subestimação de casos de câncer em cada família pelo desconhecimento dos probandos entrevistados acerca da própria história familiar. Terceiro, a frequência de mutações germinativas *de novo* em *TP53* já foi estimada em até 20% (GONZALEZ et al., 2009c), o que dificulta a identificação de pacientes baseando-se em

critérios clínicos restritivos de história familiar. Entretanto, tendo em vista os resultados obtidos neste estudo, e o custo material e de recursos humanos associados à realização do teste genético de *TP53*, deve-se avaliar com cautela os critérios de encaminhamento dos pacientes na rotina do aconselhamento genético. Ainda assim, é preciso cautela na análise dos dados aqui apresentados, frente ao pequeno tamanho amostral estudado.

Em relação ao Grupo 2, optamos por apresentar as análises de forma separada do Grupo 1, pelo fato dos critérios de seleção terem sido mais arbitrários, inviabilizando uma comparação precisa com dados da literatura. A inclusão destes pacientes se baseou em uma suspeita clínica, que incluiu famílias com pelo menos um tumor típico da síndrome, mas sem levar em conta o grau de parentesco com outros indivíduos acometidos. A frequência de mutações nesse grupo mostrou-se baixa (1/19; 5,3%).

É um desafio encontrar um ponto adequado na definição de critérios clínicos que sejam sensíveis o suficiente para detectar a maior parte dos indivíduos com mutações, e restritivos o suficiente para deixar de investigar a maior parte das famílias sem mutações. Este problema é especialmente evidente na SLF/LFL, já que a vasta amplitude de tumores associados à síndrome, muitos deles entre os cânceres mais comuns da população global, aumenta as chances de ocorrência de fenocópias. Entretanto, os dados disponíveis da mutação encontrada no grupo 2 (R156H) sugerem que ela não seja tão danosa quanto as demais mutações encontradas em *TP53*. Isso sugere que famílias com mutações em *TP53* sem história compatível com a SFL/LFL podem representar um subgrupo com fenótipos mais brandos e tumores de prognóstico mais favorável.

5.6 Achados de polimorfismos da via de p53

Polimorfismos envolvendo a via de p53 podem atuar como fatores de risco ou modificadores de fenótipo em indivíduos com câncer. Neste estudo, seis polimorfismos nos genes *TP53* (PIN2 - rs1642785, PIN3 - rs17878362 e PEX4 - rs1042522), *CDKN1A* (rs1801270 e rs1059234) e *MDM2* (SNP 309 - rs2279744) tiveram suas frequências genotípicas comparadas às de indivíduos saudáveis do Sul e Sudeste do Brasil. Nenhum deles mostrou associação com um risco aumentado de desenvolvimento de câncer.

Os três SNPs encontrados em *TP53* já foram associados a diversos tipos de câncer (WANG-GOHRKE et al., 1999; GEMIGNANI et al., 2004; SAVAGE et al., 2007; JHA et al., 2011; MALIK et al., 2011). Um efeito interessante de PIN3 foi observado entre indivíduos portadores de mutação em *TP53*, mostrando-se um modificador de idade de desenvolvimento de câncer. Na presença desse polimorfismo, o diagnóstico de câncer ocorreu 17 a 19 anos mais tarde em relação a pacientes que não o apresentavam (MARCEL et al., 2009). Supõe-se

que esse polimorfismo tenha papel importante na regulação do processamento do pré-RNA de *TP53*, modificando as taxas de síntese das diferentes isoformas de p53 (ACHATZ, 2008).

O mais estudado desses SNPs é o PEX4 (P72R), cujos relatos de associação a câncer são contraditórios, mostrando tanto um risco aumentado para o alelo G (BUYRU; TIGLI; DALAY, ; PÉREZ-PÉREZ et al., 2005), quanto para o alelo C (FAN et al., 2000; NOMA et al., 2004; DENSCHLAG et al., 2005). Existem mais de 230 estudos analisando os efeitos de PEX4 na susceptibilidade a diversos cânceres, mas não existem evidências experimentais suficientes que comprovem o efeito de risco ou proteção de nenhum dos dois alelos (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009).

Os SNPs rs1801270 e rs1059234 de *CDKN1A* já demonstraram associação com risco de carcinoma de células basais de cabeça e pescoço (LI et al., 2005). Um trabalho realizado na Divisão de Genética do INCA mostrou uma associação desses dois polimorfismos com o risco aumentado de desenvolvimento de retinoblastoma (CARVALHO et al., 2013).

O SNP 309 de *MDM2* foi relatado como um modificador de penetrância em indivíduos portadores de mutação em *TP53*. Enquanto o polimorfismo PIN3 é responsável por “atrasar” a idade ao diagnóstico nos portadores de mutações em *TP53*, o alelo 309-G de *MDM2* está associado a uma idade ao diagnóstico mais precoce. (BOND et al., 2004; BOUGEARD et al., 2006; RUIJS et al., 2007; FANG et al., 2010). Em nossa coorte, uma análise tentando comparar as idades ao diagnóstico entre portadores de mutações em *TP53* em relação aos genótipos apresentados para esses polimorfismos não foi possível, devido ao pequeno número de pacientes com mutação detectada (n=9).

Entre as limitações envolvendo estudos de associação de polimorfismos estão: números amostrais limitados, vieses por composição étnica, ou presença de mutações em diferentes genes supressores de tumor e oncogenes influenciando nas análises. Estudos com um número robusto de indivíduos são necessários para uma abordagem com poder estatístico maior. Em estudos de associação genômica ampla o valor de significância desejável para um polimorfismo é na grandeza de 10^{-7} (WHIBLEY; PHAROAH; HOLLSTEIN, 2009).

5.7 Frequência da mutação R337H no Rio de Janeiro

Uma questão levantada por nosso grupo acerca da mutação R337H de *TP53* foi qual seria a sua frequência em coortes de pacientes encaminhados ao aconselhamento genético no INCA. Essa mutação é encontrada em 0,3% da população do Sul do Brasil (~1/300 indivíduos). Esse dado foi similar em dois estudos independentes: num grupo controle de 750 mulheres do Rio Grande do Sul (PALMERO et al., 2008), e em 171.649 recém-nascidos no Paraná (CUSTÓDIO et al., 2013). Dessa forma, a frequência alélica estimada da mutação até

o momento em nosso país é de 0,0015. A frequência de mutações germinativas em *TP53* em outros países já foi estimada em 1/10.000 e 1/25.000 indivíduos (GONZALEZ et al., 2009; MAI et al., 2012), o que torna a R337H pelo menos 30 vezes mais frequente que qualquer outra mutação patogênica em *TP53*. Dada sua importância na prática clínica no Brasil, as diferenças entre as regiões geográficas devem ser melhor caracterizadas.

A R337H também foi atribuída a um fenótipo mais brando da síndrome (PALMERO et al., 2008), o que pode em parte ser explicado por resultar numa proteína parcialmente funcional (KATO et al., 2003). As famílias R337H brasileiras apresentaram tumores que são pouco frequentes em portadores de outras mutações em *TP53*, como tumores renais e de tireóide (ACHATZ, 2008). Dessa forma, nossa análise não incluiu apenas os tumores mais característicos da síndrome. O primeiro estudo realizado por nosso grupo foi em pacientes com tumor de Wilms, que já foi relatado como mais frequente em famílias com mutação germinativa em *TP53* (BIRCH et al., 2001). Em um total de 46 pacientes com este tumor, nenhum apresentou a mutação R337H. Posteriormente, a mutação foi investigada em 81 pacientes com retinoblastoma. Apesar desse câncer não ser associado à SFL/LFL, o gene mais comumente mutado nele, *RBI*, divide uma via em comum com *TP53* (KLEINERMAN; SCHONFELD; TUCKER, 2012). Nenhum dos pacientes com retinoblastoma apresentou a mutação R337H.

Cento e vinte e seis probandos com câncer de mama, com suspeita clínica de câncer hereditário de mama e ovário, e sem mutações patogênicas em *BRCA1* e *BRCA2*, também não apresentaram a mutação. Somando a esses dados os dados dos Grupos 1 (SLF/LFL) e 2 (LFL-suspeita), observamos a mutação R337H em apenas um paciente com carcinoma adrenocortical (probando #25).

O carcinoma adrenocortical foi o primeiro a ser associado à mutação R337H. RIBEIRO et al. (2001) relataram a mutação em 35 de 36 crianças (97%) com carcinoma adrenocortical no Paraná, onde este câncer pediátrico é 10 a 15 vezes mais incidente que no resto do mundo. Em dois estudos realizados em São Paulo, 78% (14/18) e 93% (65/70) das crianças com carcinoma adrenocortical apresentaram essa mutação (LATRONICO et al., 2001; SEIDINGER et al., 2011), e 14% (5/37) dos adultos com o mesmo tumor também apresentaram a R337H (LATRONICO et al., 2001). No Rio Grande do Sul, 82% (9/11) das crianças com esse tumor apresentaram a R337H (GIACOMAZZI et al., 2013c).

A elevada associação com carcinoma adrenocortical pode ter relação com o pH do órgão. A R337H ocorre no domínio de oligomerização da proteína p53. Para a ligação entre os monômeros de p53, a arginina no códon 337 doa um próton ao resíduo D352 de um monômero adjacente, formando uma ponte de hidrogênio estável. Essa ligação é fundamental

para a formação do tetrâmero da p53 e sua adequada função. A troca de uma arginina por uma histidina a princípio não altera este contato. Entretanto, como a histidina possui pKa (constante de acidez) inferior ao da arginina, em condições de pH aumentado, ocorre sua desprotonação, tornando-a incapaz de formar uma ponte de hidrogênio. Dessa forma, o pH aumentado seria importante para a atuação patogênica de R337H, levando à hipótese de que a R337H seria tecido-específica. Isso poderia explicar sua elevada frequência em tumores específicos, como o da glândula adrenal (DIGIAMMARINO et al., 2002; ACHATZ, 2008).

Entretanto, apesar da evidente associação com o carcinoma adrenocortical, a R337H também já foi relatada com uma frequência elevada em outras coortes de indivíduos com câncer, como outros cânceres pediátricos. Em casos de carcinoma do plexo coróide a frequência da mutação foi de 69% (9/13) em São Paulo (SEIDINGER et al., 2011), 63% (14/22) no Paraná (CUSTODIO et al., 2011) e 100% no Rio Grande do Sul (2/2) (GIACOMAZZI et al., 2013c). Além disso, 7% dos pacientes com osteossarcoma (3/41) mostraram carregar essa mutação (SEIDINGER et al., 2011). Recentemente, a R337H foi reportada em 8% (7/83) dos pacientes com neuroblastoma em São Paulo. Esse tumor não é característico SLF/LFL (SEIDINGER et al., 2015).

Pelos resultados que se têm até o momento, o câncer mais comum em portadores da mutação R337H é o câncer de mama. Em 815 pacientes com câncer de mama não selecionadas por critério familiar e de diversas regiões do país, 8,5% apresentaram a R337H, que foi encontrada inclusive em pacientes do Norte e Nordeste do país, embora em menor frequência que em estados do Sul e Sudeste (GIACOMAZZI et al., 2014a). No estado de São Paulo, estudos de coortes de pacientes com suspeita clínica de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC) evidenciaram a mutação em 7,1% (2/28) das pacientes em Ribeirão Preto (CURY; FERRAZ; SILVA, 2014), 2,5% (3/120) na capital (SILVA et al., 2014a), e 2,4% (3/123) em Campinas (ASSUMPCÃO et al., 2008).

Em comparação, GOMES et al. (2012) encontraram a mutação em apenas 0,5% (2/390) de pacientes com câncer de mama no Rio de Janeiro, e nenhum portador entre 324 controles testados. Já FERREIRA (2012) encontrou a R337H em 1/25 mulheres (4%) com alto risco para câncer de mama. Embora nosso estudo seja preliminar, o fato da R337H representar 6/13 das mutações detectadas em famílias SLF/LFL descritas previamente (ACHATZ et al., 2007) e apenas 1/8 das mutações nas famílias SLF/LFL deste estudo sugere que a R337H pode não ser a mutação de *TP53* mais frequente fora das áreas entre São Paulo e Rio Grande do Sul. Isso estaria de acordo com a hipótese da propagação da mutação ao longo da rota dos tropeiros.

Entretanto, ainda não se sabe ao certo se essa mutação teria surgido no Brasil, e assim se espalhado pelo país por uma migração interna; ou na Europa, sendo posteriormente trazida para o país (GARRITANO et al., 2010; PASKULIN et al., 2015). Uma análise mais detalhada de marcadores STR (do inglês: *short tandem repeats*) em portadores da R337H mostrou que o haplótipo que carrega a mutação é de origem caucasiana/Ibérica/Portuguesa, e estimou que ele teria sido introduzido há aproximadamente 2.000 anos (cerca de 72 a 84 gerações atrás). Dessa forma, é possível que a R337H tenha surgido 1.500 anos antes da colonização brasileira. Nesse contexto, ela poderia ter sido introduzida no Brasil por diferentes portadores. (PASKULIN et al., 2015). Se considerarmos essa hipótese, a localização geográfica das famílias com essa mutação atualmente estaria associada não só aos padrões de migração inter-regional no Brasil, mas também à distribuição diferencial dos imigrantes portugueses no país desde o início da colonização.

Sabe-se que a população brasileira é majoritariamente composta pela miscigenação de três populações parentais: ameríndios, europeus e africanos, com diferenças inter-regionais importantes. De forma geral, a ancestralidade genética europeia é decrescente no sentido Sul-Norte (SANTOS et al., 2010; SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013), por conta do padrão de dispersão dos contingentes migratórios europeus no país (LEVY, 1974). Entre os quatro estados do Sudeste brasileiro, a população do Rio de Janeiro é a que tem maior distância genética da população parental europeia, seguida pela população de Minas Gerais (SALOUM DE NEVES MANTA et al., 2013). Isso seria coerente com uma menor frequência da R337H nesses estados, caso a mutação tivesse sido introduzida por imigrantes europeus. De fato, uma investigação recente sobre a frequência dessa mutação em Minas Gerais não revelou nenhum portador entre 513 controles e 103 pacientes com câncer de ovário (SCHAYEK et al., 2015). Vale ressaltar, entretanto, que a mutação R337H não é observada com frequência na Europa (GIACOMAZZI et al., 2014b).

Estudos com amostras maiores são necessários para esclarecer as diferenças regionais quanto à frequência da R337H. Tendo em vista que essa é a mutação patogênica mais comum de *TP53* numa mesma população, e o alelo fundador associado a câncer mais prevalente já relatado (GIACOMAZZI et al., 2014a), justifica-se que a primeira investigação molecular de um indivíduo com suspeita clínica de SFL/LFL no Brasil seja no éxon 10 de *TP53*. No entanto, o resultado negativo deve sempre ser procedido da análise dos demais éxons, além da investigação da variação do número de cópias deste gene.

5.8 Investigação por sequenciamento de nova geração

Onze pacientes com critérios clínicos SLF/LFL (Grupo 1) sem mutações detectáveis em *TP53* foram selecionados para investigação de mutações em 124 genes com associação germinativa e/ou somática ao câncer. Eles preenchem no mínimo os critérios clínicos de Chompret, e todos apresentaram pelo menos um tumor típico da síndrome. Mutações potencialmente patogênicas foram encontradas em um grupo heterogêneo de 21 genes.

5.8.1 Mutações detectadas em *BRCA1*, *BRCA2* e *ATM*

As proteínas codificadas por *BRCA1*, *BRCA2* e *ATM* atuam, em conjunto ou isoladamente, em diversas vias de sinalização essenciais para o reparo de DNA e controle do ciclo celular. Entre estas, estão algumas das vias mais representadas dentro do conjunto de mutações encontradas pelo sequenciamento de nova geração, neste trabalho: as vias do fator de transcrição FOXM1, via da anemia de Fanconi, via do fator de transcrição E2F, além da própria via de p53 (DIMOVA; DYSON, 2005; RILEY et al., 2008; MOLDOVAN; D'ANDREA, 2009; ZONA et al., 2014).

A partir da fosforilação de *BRCA1* por *ATM*, *BRCA1* se liga a um complexo com as proteínas *BRCA2*, *BARD1* e *RAD51*. Quando há danos ao DNA, esse complexo é direcionado para as regiões cromossômicas submetidas à replicação do DNA. Quando não há alteração nos genes envolvidos, o dano ao DNA é reparado, e o ciclo celular pode prosseguir normalmente. Quando isso não ocorre, a p53 induzirá preferencialmente a via de apoptose. Se a função de p53 também estiver comprometida na célula, pode haver uma facilitação da proliferação e invasão celular (ARNOLD; GOGGINS, 2004).

BRCA1 e *BRCA2* são os principais genes associados à síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, um dos diagnósticos diferenciais da síndrome de Li-Fraumeni. Mutações germinativas nesses genes estão associadas não só a um risco aumentado de câncer de mama e ovário, mas também de tubas uterinas, próstata e de câncer pancreático (PETRUCCELLI; DALY; FELDMAN, 2010; SCHNEIDER et al., 2013). Mutações em *BRCA2* parecem estar associadas a uma amplitude maior de tumores que as de *BRCA1*, como o câncer de bexiga, estômago e melanoma (LIEDE; KARLAN; NAROD, 2004; PETRUCCELLI; DALY; FELDMAN, 2010). MANOUKIAN et al. (2007) analisaram 23 indivíduos de famílias com pelo menos um caso de sarcoma e um caso de câncer de mama, em busca de mutações nos genes *BRCA1*, *BRCA2* e *TP53*. Eles encontraram a mesma frequência de mutações em *TP53* e *BRCA2* (13%), sendo que um paciente carregava mutação nos dois genes, e sugeriram que o gene *BRCA2* também deve ser investigado em famílias com fenótipo tumoral de câncer de mama/sarcoma. Entretanto, as quatro mutações em *BRCA2* detectadas neste estudo estão

classificadas como benignas na base de dados BIC, que é considerado o banco de dados mais completo de mutações em *BRCA1* e *BRCA2*. Porém, a mutação c.2926_2927delTCinsAT, no éxon 11 de *BRCA2*, não tem frequência alélica determinada em populações referência, e não foram encontrados dados de ensaios funcionais que pudessem elucidar melhor sua classificação.

Já a mutação de *BRCA1*, F1761S (rs80356905) é descrita como de significado clínico incerto. Essa mutação está localizada em um dos domínios BRCT, na porção carboxi-terminal da proteína BRCA1. Esses domínios são fundamentais na interação de BRCA1 com outras proteínas para a transmissão dos sinais gerados pela cromatina danificada. Através dos domínios BRCT, BRCA1 pode se ligar a proteínas ativadoras e repressoras de transcrição, proteínas do ciclo celular e proteínas de reparo do DNA (ROY; CHUN; POWELL, 2012). No projeto 1000 genomas e no projeto *Exome Sequencing*, não constam frequências alélicas dessa mutação em populações referência. Além disso, existem evidências de ensaios funcionais dessa mutação que demonstram graves prejuízos à função da proteína BRCA1 (LEE et al., 2010). De acordo com as recomendações da *American College of Medical Genetics*, esses são indícios fortes de patogenicidade de uma mutação (RICHARDS et al., 2015), portanto nós a classificamos como provavelmente patogênica. A paciente portadora dessa mutação (#15) desenvolveu câncer de mama e câncer renal aos 62 anos, e sua família apresentou o maior número de casos de câncer deste estudo (n=16), entre eles câncer de mama, colorretal, pele, sarcoma, câncer de estômago e de sistema nervoso central.

A proteína ATM é uma serina/treonina cinase responsável por ativar mais de cem proteínas envolvidas na resposta a danos ao DNA, regulação do ciclo celular e outras vias de sinalização. Ela é capaz de fosforilar p53 em resposta a quebras na dupla fita do DNA, diretamente ou por intermédio da proteína ATR. Mutações em homozigose no gene *ATM* estão associadas à Ataxia-Telangiectasia, condição autossômica recessiva que cursa com alterações cutâneas, neurológicas, e elevado risco de câncer, especialmente malignidades hematológicas (SHILOH; ZIV, 2013; CHAUDHARY; AL-BARADIE, 2014). Mutações em heterozigose nesse gene são associadas à susceptibilidade moderada a diversos cânceres, contudo particularmente ao câncer de mama (THOMPSON et al., 2005).

A probanda #06 deste estudo, que era portadora da mutação nova E2087A em *ATM*, tem um histórico pessoal de câncer indicativo para o sequenciamento de *TP53*, com dois tumores típicos da SLF na infância (meduloblastoma e osteossarcoma). Recentemente, foi relatada uma paciente com Ataxia-Telangiectasia, portadora de mutações bialélicas em *ATM*, que tinha dois primos de primeiro grau com meduloblastoma e rabdomiossarcoma, respectivamente. Um dos primos, com amostra disponível para sequenciamento, foi

diagnosticado com a mesma mutação do probando (*ATM* D2708N). Além disso, ensaios utilizando culturas de linfoblastos de dois portadores de mutação nessa família revelaram sensibilidade elevada à radiação ionizante (CLAES et al., 2013).

Outras duas probandas do presente estudo apresentaram mutações em *ATM*, ambas com câncer de mama. A probanda #33, que desenvolveu câncer de mama e sarcoma de partes moles antes dos 50 anos, era portadora da mutação em *ATM* S49C. Embora seja considerado um polimorfismo em determinadas populações (0,2-1,7%), o alelo S49C foi relatado como um alelo de susceptibilidade ao câncer de mama (STREDRICK et al., 2006; FLETCHER et al., 2010). A probanda #41 teve um câncer de mama aos 42 anos, e apresentou a mutação C532Y em *ATM*. Essa substituição tem uma frequência alélica de 0,0002 na base de dados dbSNP. A probanda tinha uma irmã com câncer de mama em idade jovem e uma sobrinha com leucemia na infância, duas neoplasias associadas a mutações em *ATM*.

Vale ressaltar que ambas as probandas #06 e #33 receberam radioterapia como parte do tratamento de seus primeiros tumores, em áreas próximas àquelas nas quais os segundos tumores se desenvolveram. Levando em conta que três dos onze probandos analisados por NGS (27%) tinham mutação em *ATM*, e o fato de sensibilidade à radiação ionizante ser uma característica comum a portadores de mutação tanto em *TP53* quanto em *ATM* (IANNUZZI et al., 2002; MCBRIDE et al., 2014), sugere-se que o rastreio mutacional de *ATM* deva ser considerado em pacientes SLF/LFL nos quais não forem encontradas mutações em *TP53*, pois a detecção dessas mutações pode servir para orientar o tratamento, evitando a radioterapia quando possível.

5.8.2 Mutações novas detectadas: genes *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* e *PTPRC*

Além de genes sabidamente associados ao câncer hereditário, os genes *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* e *PTPRC* revelaram mutações novas neste estudo.

A probanda #41 apresentou a substituição R2040G, no gene *SETD2*. *SETD2* é uma proteína modificadora de histonas, responsável pela trimetilação da lisina 36 da histona 3 (H3K36). *SETD2* interage com a proteína p53, e regula alguns de seus genes-alvos (XIE et al., 2008). Tanto a expressão reduzida de *SETD2* quanto mutações somáticas neste gene já foram observadas em amostras tumorais de mama (AL SARAQBI et al., 2009; TAN et al., 2015). Além disso, mutações germinativas em heterozigose neste gene foram detectadas em dois pacientes com uma síndrome de sobrecrescimento semelhante à síndrome de Sotos, que foi denominada síndrome de Luscan-Lumish (LUSCAN et al., 2014). A síndrome de Sotos (OMIM #117550), assim como diversas síndromes de sobrecrescimento, está associada a uma susceptibilidade aumentada ao câncer em idade precoce, por conta da estimulação da

proliferação celular. Outra mutação encontrada no gene *SETD2* (C394R) foi observada no probando #65 deste estudo. Este fato é digno de nota, já que o probando #65 possuía critério clínico clássico para a SLF, o mais específico dos critérios, e ainda assim não apresentou mutação em *TP53*. Não estavam disponíveis, nos prontuários destes pacientes, informações de exames físicos que pudessem sugerir o diagnóstico de síndromes de sobrecrecimento.

A mutação T1431P, no gene *PIK3C2A*, foi observada na probanda #51, que desenvolveu um oligodendroglioma aos nove anos, e cuja avó havia falecido de câncer de mama antes dos 40 anos. A proteína codificada por esse gene participa da via fosfatidilinositol-3-cinase/AKT/mTor (PIK3C-AKT), frequentemente alterada em câncer de mama (PANDE et al., 2014). Mutações somáticas ativadoras em *PIK3CA*, gene da mesma família de *PIK3C2A*, são responsáveis por um espectro de síndromes de sobrecrecimento segmental como a síndrome de CLOVES (OMIM #612918) (KEPPLER-NOREUIL et al., 2015), também associadas a um risco aumentado de câncer. Além disso, mutações germinativas em *PIK3CA* foram observadas em pacientes com síndrome de Cowden (OMIM #158350), um fenótipo de câncer hereditário que inclui tumores de mama em idade jovem e hamatomas cerebelares (Lhermitte-Duclos), entre outros achados (ORLOFF et al., 2013). Nos prontuários dos pacientes do presente estudo, não estavam disponíveis informações de exames físicos que pudessem sugerir o diagnóstico de síndrome de sobrecrecimento segmental ou Cowden.

A mutação nova R168G, no gene *SMO*, foi observada na probanda #10, que desenvolveu um osteossarcoma na infância. No mesmo códon deste gene, foi observada a mutação R168H, na probanda #41. A R168H é considerada rara, com frequência alélica populacional de 0,0021. O gene *SMO* atua na via de *hedgehog*. Mutações que acarretam na hiperativação dessa via foram observadas em tumores como carcinoma de células basais e meduloblastomas (MACDONALD, 2012). Linhagens celulares de osteossarcoma exibem hiperexpressão dos genes alvos da via de *hedgehog*, e o uso de ciclopamina, um inibidor específico da proteína SMO, impediu o crescimento dessas células *in vitro*. Além disso, a inibição da expressão de *SMO* com RNA de interferência impediu o crescimento *in vivo* e *in vitro* dessas células, sugerindo um novo alvo terapêutico para osteossarcomas (HIROTSU et al., 2010).

A mutação R1107I, no gene *PTPRC*, foi encontrada na probanda #01, que desenvolveu um sinoviossarcoma na infância, e cuja mãe havia desenvolvido câncer de mama bilateral antes dos 40 anos. Este gene codifica a tirosina fosfatase CD45, que regula negativamente a sinalização dos receptores de citocinas, e atua na maturação de células

hematopoiéticas B e T. Mutações de perda de função neste gene estão associadas à leucemia linfoblástica aguda de células T (PORCU et al., 2012).

5.8.3 Demais mutações encontradas neste estudo e interpretação geral dos resultados

Outros genes que já foram associados à susceptibilidade ao câncer, e nos quais foram encontradas mutações raras preditas patogênicas em nosso estudo foram os genes: *ALK*, associado ao neuroblastoma hereditário (MOSSÉ et al., 2008); o gene *PDGFRA*, associado a tumores gastrointestinais estromais (CHOMPRET et al., 2004); e o gene *RET*, associado à síndrome de neoplasia endócrina múltipla (tipos IIA e IIB) (MARGRAF et al., 2009). Esses não são propriamente fenótipos encontrados na SLF/LFL, embora novas associações não possam ser descartadas. Além destes, uma mutação germinativa no gene *PAX5*, que pode estar associado à susceptibilidade à leucemia linfoblástica aguda de células B (SHAH et al., 2013), também foi detectada em nosso estudo.

Alguns dos genes nos quais foram encontradas mutações potencialmente patogênicas têm associação relatada a câncer apenas no contexto de mutações somáticas. Entre eles, estão os genes *KDR* (*VEGFR2*) e *FLT4* (*VEGFR3*), que codificam receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Esta via encontra-se frequentemente hiperativada em tumores malignos. Além de ser necessária para a promoção da angiogênese tumoral, a via de VEGF também atua de forma autócrina nas células tumorais, promovendo a auto-renovação de células-tronco tumorais, pela indução da expressão de oncogenes, e o crescimento tumoral (VARNEY; SINGH, 2015; ZHAO et al., 2015).

Já as proteínas CREBBP e EP300 atuam diretamente na via de p53, promovendo a acetilação desta proteína, modificação pós-traducional necessária para sua atividade transcricional (ITO et al., 2001). Além disso, eles participam como coativadores transcricionais em diversas outras vias de sinalização, interagindo por exemplo, com BRCA1, BRCA2 e ATM, atuando no reparo de DNA, diferenciação celular, apoptose, entre outros. Mutações germinativas nestes genes são responsáveis pela síndrome de Rubinstein-Taybi, uma síndrome de malformação congênita que inclui sinais clínicos como retardo mental, deficiência no crescimento pós-natal, microcefalia, dedos polegar e hálux alargados, e dismorfias faciais. Os portadores dessa síndrome têm uma elevada predisposição a tumores, principalmente os de sistema nervoso central e sarcomas (MILANI et al., 2015).

Estudos adicionais são necessários para esclarecer o impacto das mutações encontradas neste trabalho. Nossas análises focaram na busca de mutações causais (ou seja, de elevada penetrância), levando em consideração os seguintes critérios: mutações raras ou não descritas em populações referências, que fossem não-sinônimas (de sentido trocado, de códon

de parada, de mudança de matriz de leitura, etc.) ou em sítios de *splicing*. No caso de mutações de sentido trocado, elas deveriam envolver nucleotídeos considerados conservados e os *softwares* de predição deveriam classificá-las como patogênicas. Esses são critérios usualmente utilizados para a investigação de mutações causais (STITZIEL; KIEZUN; SUNYAEV, 2011; YANG et al., 2015).

Deve-se salientar que essa abordagem tem limitações. Sabe-se que o câncer é uma doença multifatorial e que múltiplas variantes genéticas, de baixa penetrância, poderiam estar interagindo sinergicamente na predisposição a câncer nessas famílias. Assim como em diversas outras doenças, o efeito aditivo de variantes genéticas raras pode influenciar no risco ou na gravidade de um fenótipo (RICHARDS et al., 2015). JOHNSON et al. (2007) analisaram os efeitos de 25 SNPs não sinônimos em genes associados à susceptibilidade ao câncer de mama (*BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *TP53* e *CHEK2*). Suas análises mostraram que, individualmente, esses SNPs tinham pouco efeito no risco de câncer, mas em conjunto, estavam associados a um risco até 8 vezes maior, em pacientes que possuíam nove ou mais desses SNPs (OR=8,04, IC: 1,89–34,26). O risco era 2,9 vezes maior para pacientes que tivessem três SNPs com frequência alélica populacional menor que 10%. Da mesma forma, mutações sinônimas e em regiões não codificantes também podem estar associadas a doenças, e esse é um campo ainda pouco explorado, pela dificuldade em entender os mecanismos envolvidos nessa associação (SAMUEL et al., 2014; RICHARDS et al., 2015).

Até o momento, nenhum gene além de *TP53* foi conclusivamente associado à SLF/LFL (MALKIN, 2011). Dada a complexa variabilidade desses fenótipos, podemos esperar que diferentes genes carreguem mutações patogênicas nas famílias SLF/LFL, dependendo de padrões específicos de tumores nessas famílias. Por exemplo, AURY-LANDAS e colaboradores relataram uma frequência de 6,3% de CNVs novas (do inglês, *copy number variations*) envolvendo genes de remodelamento de cromatina em famílias com critérios LFL de Chompret com excesso de tumores cerebrais (AURY-LANDAS et al., 2013). Da mesma forma, uma mutação patogênica no gene *POT1*, um regulador de comprimento de telômeros, foi associada à predisposição a câncer em quatro famílias LFL com casos de angiossarcoma (CALVETE et al., 2015).

Tanto no contexto de mutações de elevado impacto clínico, ou de diversas mutações de baixa penetrância atuando aditivamente, as tecnologias de nova geração serão cada vez mais necessárias para identificar o *background* genético associado a fenótipos específicos da SLF/LFL, já que um grande número de genes precisará ser investigado na ausência de mutações em *TP53*.

5.9 Aconselhamento genético no Brasil e acompanhamento clínico de pacientes com suspeita de SLF/LFL

O presente trabalho foi uma abordagem inicial para a identificação e caracterização fenotípica e molecular de pacientes com suspeita clínica de SLF/LFL tratados no Instituto Nacional de Câncer, por meio do Serviço de Aconselhamento Genético dessa Instituição.

O aconselhamento genético (AG) é de extrema importância na SLF/LFL, dada a elevada penetrância de algumas mutações em *TP53*. O desafio inicial para que o AG ocorra está na identificação dos pacientes sob risco. Dessa forma, torna-se necessária a divulgação de informações sobre o câncer hereditário. Um estudo realizado com 135 enfermeiros do Hospital das Clínicas de Porto Alegre a respeito do câncer de mama revelou que 78,5% dos participantes nunca consideraram encaminhar um paciente ou seus familiares a uma avaliação de risco genético, e 96,3% deles mencionaram ter interesse em obter mais informações sobre câncer de mama hereditário e aconselhamento genético (PROLLA et al., 2015). Em outro estudo, realizado no município de São Carlos (SP), a respeito do conhecimento dos médicos de diversas áreas acerca do câncer hereditário, apenas 10 entre 325 médicos convidados optaram por participar. Essa baixa adesão que foi atribuída, entre outros fatores, ao possível desconhecimento dos médicos acerca do tema (MOREIRA; MELO, 2012).

Em Campinas (SP), 48% dos pacientes com câncer colorretal de um hospital universitário não tinham informações de história familiar de câncer coletadas em seus prontuários. Entre os prontuários com história coletada, apenas 6,2% tinham informações sobre as idades ao diagnóstico dos indivíduos, que é um dado necessário para inclusão em muitos dos critérios clínicos de câncer familiar. Neste mesmo estudo, quarenta e cinco pacientes com critérios para síndrome de câncer colorretal hereditário foram identificados através da leitura de prontuários, e não havia registro de encaminhamento desses pacientes ao aconselhamento genético (VIANA et al., 2008). O levantamento da história familiar de câncer é uma ferramenta simples e barata que motiva o encaminhamento dos pacientes para o aconselhamento genético, e deveria ser coletada rotineiramente no atendimento ao paciente. Ainda assim, pouca atenção é dada a esses dados na rotina clínica, mesmo em centros de referência. Esse fato é preocupante pela possibilidade de subregistro de famílias sob risco (PALMERO et al., 2007).

Medidas de treinamento dos profissionais de saúde são uma ferramenta valiosa para corrigir esse quadro. No município de Angra dos Reis (RJ), agentes comunitários de saúde foram treinados para coletar dados de história familiar de câncer dos indivíduos por entrevistas em suas residências (VIEIRA et al., 2015). Cerca de 136 famílias com pelo menos três casos de câncer foram identificadas e indicadas para consultas com especialistas em

aconselhamento genético. Entre as famílias que compareceram às consultas, metade foi classificada por especialistas como tendo risco moderado ou alto para ocorrência de novos cânceres. O nível de detalhamento da história de câncer obtido pelos agentes comunitários foi igual ou superior ao obtido pelos profissionais do aconselhamento em 83,5% dos casos. Um resultado semelhante foi obtido na identificação de mulheres com risco de câncer de mama e ovário hereditários no Rio Grande do Sul, com a aplicação de um questionário por agentes de atenção primária em saúde (ROTH et al., 2009).

Quanto ao conhecimento da população, um estudo realizado com indivíduos atendidos em um ambulatório de aconselhamento genético em Ribeirão Preto (SP) revelou que mais de 60% dos usuários não estavam cientes de sua predisposição aumentada ao câncer, pois consideravam seu risco de desenvolver a doença igual ou menor que o da população em geral. Muitos desses indivíduos (75%) também acreditavam não terem recebido informações suficientes sobre sua doença e formas de prevenção (SILVA et al., 2013). CAMPACCI e colaboradores (2015) desenvolveram um guia informativo a respeito do câncer hereditário, aplicado a pacientes do sexo feminino antes de sua primeira consulta no AG. Embora 46% das mulheres entrevistadas não tenham entendido completamente o guia, todas relataram ter entendido a ideia geral exposta, e manifestaram interesse em buscar mais informações sobre o assunto. As participantes mostraram-se incentivadas a buscar medidas preventivas tanto para si mesmas quanto para seus descendentes após a leitura. O estudo enfatizou a importância do uso de ferramentas educativas que sejam de fácil aplicação pelos profissionais de saúde e que tenham uma linguagem adequada ao público-alvo (CAMPACCI et al., 2015).

Outra dificuldade enfrentada no Brasil é a inclusão do aconselhamento genético na prática clínica por questões financeiras. Os testes genéticos não estão rotineiramente disponíveis na assistência pública, o que torna a pesquisa uma via alternativa para que os pacientes tenham acesso a esse serviço (GIACOMAZZI et al., 2015; GOLDIM; GIBBON, 2015). Em janeiro de 2014, a Agência Nacional de Saúde estabeleceu novas recomendações para a autorização da realização de testes moleculares em usuários de planos de saúde. Foram incluídas três síndromes de câncer hereditário nessas diretrizes: síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, síndrome de Lynch e síndrome de neoplasia endócrina múltipla tipo 2 (Anexo da Nota 876/GGRAS/DIPRO/ANS). Entretanto, essas recomendações são mais restritas que os protocolos utilizados pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN-EUA), adotados em diversas partes do mundo, o que pode prejudicar o acesso de indivíduos que se beneficiariam desses testes (LAJUS, 2015).

A ampliação dos estudos de caracterização epidemiológica e molecular das síndromes de câncer hereditário é necessária para aprimorar os protocolos de rastreamento precoce e de

viabilização dos testes genético no Brasil. A escassez de dados nesse tema dificulta as estimativas de custo/benefício desse tipo de rastreio (PALMERO et al., 2007). Isso é especialmente importante considerando o tamanho e diversidade étnica populacionais do Brasil, que condizem com variações regionais importantes na frequência dessas síndromes. Esse aparenta ser o caso para a SLF (ACHATZ, 2008), melanoma familiar (PUIG et al., 2015), e para polipose adenomatosa familiar (FAP) (MOREIRA-NUNES et al., 2015).

No Rio de Janeiro, o Serviço de Aconselhamento Genético do INCA foi iniciado em meados dos anos 2000, inicialmente só atendendo pacientes com suspeita clínica de câncer de mama e ovário hereditários. Posteriormente, foi implementada a pesquisa de mutações tanto para pacientes com câncer colorretal quanto com retinoblastoma (PALMERO et al., 2007). Mais recentemente, pesquisas envolvendo pacientes com tumor de Wilms e suspeita de SLF/LFL foram iniciadas. Entre as principais dificuldades enfrentadas nesse serviço estão: a demora entre a entrada do paciente e o resultado do teste genético e a falta de conhecimento dos médicos para o adequado encaminhamento de pacientes em risco. Assim como nos outros centros brasileiros de aconselhamento genético, os testes genéticos no INCA estão atrelados à pesquisa, e importantes achados a respeito do câncer hereditário no Brasil já foram obtidos por meio destes estudos (BRAGGIO et al., 2004; DA COSTA et al., 2008; BARBOSA et al., 2009, 2013; EWALD et al., 2011; CARDOSO et al., 2013).

Esperamos que este trabalho possa contribuir com a caracterização epidemiológica da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like* no Brasil, chamando a atenção à importância do aconselhamento genético para as famílias sob risco, e que os pacientes aqui incluídos possam ser inseridos em estudos colaborativos da Rede Brasileira de Câncer Hereditário - REBRACH (anteriormente denominada Rede Nacional de Câncer Familiar) para o desenvolvimento de programas de vigilância em câncer.

O acompanhamento dos indivíduos com mutação germinativa em *TP53* ainda representa um desafio, pela predisposição a tumores tão diversos. Dessa forma, o rastreamento de lesões precoces precisa abranger múltiplos órgãos (MCBRIDE et al., 2014). VILLANI et al. (2011) propuseram um protocolo de vigilância para portadores de mutação em *TP53* assintomáticos, envolvendo ressonâncias magnéticas de corpo inteiro anuais e exames de sangue a cada quatro meses, entre outras especificações que variavam entre crianças e adultos. Dezoito entre 33 indivíduos com mutação optaram por participar do estudo. Em sete anos, dezessete dos 33 indivíduos desenvolveram tumores. A sobrevivência global em 24 meses de acompanhamento entre os pacientes com câncer que aderiram ao protocolo destes pesquisadores foi de 100% *versus* 20% dos pacientes que não aderiram (p=0,0417).

Um estudo semelhante tem sido realizado no Brasil, analisando a eficiência da tomografia computadorizada por emissão de pósitrons com 18 fluordesoxiglicose (FDG-PET/CT) na detecção precoce de lesões. Foram detectadas seis lesões em 30 portadores de mutação em *TP53*, em órgãos diversos, três das quais foram confirmadas como malignas (NOGUEIRA et al., 2015). A implementação de programas de vigilância, prevenção e tratamento para esses indivíduos necessita de esforços interdisciplinares na prática clínica e na pesquisa, para avaliação de custo/benefício de cada um (MCBRIDE et al., 2014).

6 Conclusões

O presente estudo buscou caracterizar pacientes com suspeita clínica da SLF/LFL fenotípica e molecularmente, além de investigar a frequência da mutação fundadora R337H em diferentes coortes de pacientes oncológicos. Cinquenta e oito pacientes com suspeita clínica da SLF/LFL foram investigados quanto à presença de mutações em *TP53* e *CDKN1A*. Adicionalmente, três coortes de pacientes acompanhados pelo aconselhamento genético do INCA foram investigadas quanto à presença da mutação R337H de *TP53*: 46 pacientes com tumor de Wilms, 81 pacientes com retinoblastoma e 126 pacientes com suspeita clínica de câncer de mama e ovário hereditários. Para a investigação de novos genes associados à síndrome, onze pacientes com critérios SLF/LFL e sem mutações detectadas em *TP53* foram submetidos à investigação de 124 genes associados ao câncer por sequenciamento de nova geração. As conclusões obtidas foram:

- Trinta e nove probandos eram de famílias com critérios clínicos estabelecidos na literatura para a SLF/LFL. A frequência de mutações patogênicas em *TP53* nesse grupo foi de 20,5% (8/39). Grandes deleções representaram 25% (2/8) dessas mutações, reforçando a importância da análise de rearranjos adicionalmente ao sequenciamento.
- Entre os critérios clínicos da SLF/LFL, o clássico foi o mais específico, e o critério de Chompret, o mais sensível. Sugere-se que os critérios de encaminhamento para o teste genético de *TP53* sejam analisados com cautela, dados os valores de sensibilidade e especificidade encontrados. Independente dos critérios utilizados, os sarcomas de partes moles, osteossarcomas e tumores adrenocorticais foram os melhores tumores “sentinelas” para a detecção de mutações em *TP53*.
- Uma mutação em *TP53* foi encontrada entre os dezenove probandos que não preenchiam os critérios SLF/LFL. Essa mutação (R156H) foi relacionada a um tumor nunca antes relatado na SLF, o carcinoma fibrolamelar. O segundo evento mutacional encontrado no tumor fortalece a hipótese de que *TP53* esteja associado a este caso de câncer.
- Não foram encontradas mutações em *CDKN1A* em nenhum dos 58 pacientes, sugerindo a ausência de envolvimento desse gene com a SLF/LFL.
- A mutação R337H foi encontrada em apenas um paciente, sugerindo que ela possa ser menos frequente no Rio de Janeiro que em outros estados do Brasil.
- O sequenciamento de nova geração em probandos que não apresentaram mutação em *TP53* detectou mutações em um grupo heterogêneo de genes. Mutações de provável relevância clínica foram encontradas nos genes *ATM* e *BRCA1*, além de mutações novas nos genes *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* e *PTPRC*. Estudos adicionais serão necessários para confirmar a patogenicidade dessas mutações.

7 Referências

ACHATZ, M. **Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni like: impacto dos polimorfismos intragênicos do TP53 e de genes que regulam a atividade da p53**. 2008. 250 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ACHATZ, M. I. W. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer letters**, v. 245, n. 1-2, p. 96–102, 8 jan. 2007.

ACHATZ, M. I. W.; HAINAUT, P.; ASHTON-PROLLA, P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **The Lancet. Oncology**, v. 10, n. 9, p. 920–5, set. 2009.

AGARWAL, S. K.; MATEO, C. M.; MARX, S. J. Rare germline mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes in multiple endocrine neoplasia type 1 and related states. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 94, n. 5, p. 1826–34, maio 2009.

AL SARAKBI, W. et al. The mRNA expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. **BMC cancer**, v. 9, p. 290, jan. 2009.

AMARAL, J. D. et al. The role of p53 in apoptosis. **Discovery medicine**, v. 9, n. 45, p. 145–52, fev. 2010.

ANDRADE, R. C. et al. Association of TP53 polymorphisms on the risk of Wilms tumor. **Pediatric blood & cancer**, v. 61, n. 3, p. 436–41, mar. 2014.

ARIFFIN, H. et al. Whole-genome sequencing analysis of phenotypic heterogeneity and anticipation in Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 43, p. 15497–501, 28 out. 2014.

ARNOLD, M. A.; GOGGINS, M. BRCA2 and predisposition to pancreatic and other cancers. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 3, n. 14, p. 1–10, 12 fev. 2004.

ASSUMPÇÃO, J. G. et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC cancer**, v. 8, p. 357, jan. 2008.

AURY-LANDAS, J. et al. Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with brain tumours. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 21, n. 12, p. 1369–76, dez. 2013.

- BACHINSKI, L. L. et al. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. **Cancer research**, v. 65, n. 2, p. 427–31, 15 jan. 2005.
- BAKER, S. J. et al. p53 gene mutations occur in combination with 17p allelic deletions as late events in colorectal tumorigenesis. **Cancer research**, v. 50, n. 23, p. 7717–22, 1 dez. 1990.
- BANIN, S. et al. Enhanced phosphorylation of p53 by ATM in response to DNA damage. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5383, p. 1674–7, 11 set. 1998.
- BARBOSA, R. H. et al. Constitutive RB1 mutation in a child conceived by in vitro fertilization: implications for genetic counseling. **BMC medical genetics**, v. 10, p. 75, jan. 2009.
- BARBOSA, R. H. et al. Screening of RB1 alterations in Brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma: phenotypic and genotypic associations. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 54, n. 5, p. 3184–94, maio 2013.
- BARTEK, J. et al. Genetic and immunochemical analysis of mutant p53 in human breast cancer cell lines. **Oncogene**, v. 5, n. 6, p. 893–9, jun. 1990.
- BAY, J. O. et al. High incidence of cancer in a family segregating a mutation of the ATM gene: possible role of ATM heterozygosity in cancer. **Human mutation**, v. 14, n. 6, p. 485–92, 1999.
- BELL, D. W. et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 286, n. 5449, p. 2528–31, 24 dez. 1999.
- BIRCH, J. M. et al. Prevalence and Diversity of Constitutional Mutations in the p53 Gene among 21 Li-Fraumeni Families Mutations in the p53 Gene among 21. p. 1298–1304, 1994a.
- BIRCH, J. M. et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer research**, v. 54, n. 5, p. 1298–304, 1 mar. 1994b.
- BIRCH, J. M. et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene**, v. 20, n. 34, p. 4621–8, 2 ago. 2001.
- BOND, G. L. et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. **Cell**, v. 119, n. 5, p. 591–602, 24 nov. 2004.
- BOUGEARD, G. et al. Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. **Oncogene**, v. 22, n. 6, p. 840–6, 13 mar. 2003.
- BOUGEARD, G. et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on

age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 6, p. 531–3, jun. 2006.

BOUGEARD, G. et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **Journal of medical genetics**, v. 45, n. 8, p. 535–8, ago. 2008.

BOUGEARD, G. et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 21, p. 2345–52, 20 jul. 2015.

BOURDON, J.-C. p53 and its isoforms in cancer. **British journal of cancer**, v. 97, n. 3, p. 277–82, 6 ago. 2007.

BRACHMANN, R. K.; VIDAL, M.; BOEKE, J. D. Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 9, p. 4091–5, 30 abr. 1996.

BRAGGIO, E. et al. Identification of three novel RB1 mutations in Brazilian patients with retinoblastoma by “exon by exon” PCR mediated SSCP analysis. **Journal of clinical pathology**, v. 57, n. 6, p. 585–90, jun. 2004.

BROWN, B. W. et al. Generation or birth cohort effect on cancer risk in Li-Fraumeni syndrome. **Human genetics**, v. 118, n. 3-4, p. 489–98, dez. 2005.

BROWN, C. J. et al. Awakening guardian angels: drugging the p53 pathway. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 12, p. 862–73, dez. 2009.

BRUNNER, H. G.; HAMEL, B. C. J.; BOKHOVEN HV, H. VAN. P63 gene mutations and human developmental syndromes. **American journal of medical genetics**, v. 112, n. 3, p. 284–90, 15 out. 2002.

BUYRU, N.; TIGLI, H.; DALAY, N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. **Oncology reports**, v. 10, n. 3, p. 711–4, jan. .

CALVETE, O. et al. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li-Fraumeni-like families. **Nature communications**, v. 6, p. 8383, jan. 2015.

CAMPACCI, N. et al. Knowledge about hereditary cancer of women with family histories of breast, colorectal, or both types of cancer. **Journal of cancer education : the official journal of the American Association for Cancer Education**, v. 30, n. 1, p. 167–72, mar. 2015.

CANMAN, C. E. et al. Activation of the ATM kinase by ionizing radiation and phosphorylation of p53. **Science (New York, N.Y.)**, v. 281, n. 5383, p. 1677–9, 11 set. 1998.

CARDOSO, L. C. A. et al. WT1, WTX and CTNNB1 mutation analysis in 43 patients with

sporadic Wilms' tumor. **Oncology reports**, v. 29, n. 1, p. 315–20, jan. 2013.

CARVALHO, I. N. S. R. et al. Polymorphisms of CDKN1A gene and risk of retinoblastoma. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2774–7, dez. 2013.

CASTILLA, L. H. et al. Mutations in the BRCA1 gene in families with early-onset breast and ovarian cancer. **Nature genetics**, v. 8, n. 4, p. 387–91, dez. 1994.

CHAAR, I. et al. Impact of MDM2 polymorphism: increased risk of developing colorectal cancer and a poor prognosis in the Tunisian population. **European journal of gastroenterology & hepatology**, v. 24, n. 3, p. 320–7, mar. 2012.

CHAUDHARY, M. W.; AL-BARADIE, R. S. Ataxia-telangiectasia: future prospects. **The application of clinical genetics**, v. 7, p. 159–67, 10 jan. 2014.

CHEN, G.-X. et al. Clinical utility of recombinant adenoviral human p53 gene therapy: current perspectives. **OncoTargets and therapy**, v. 7, p. 1901–9, jan. 2014.

CHIPUK, J. E. et al. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5741, p. 1732–5, 9 set. 2005.

CHOMPRET, A. et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. **British journal of cancer**, v. 82, n. 12, p. 1932–7, jun. 2000.

CHOMPRET, A. et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **Journal of medical genetics**, v. 38, n. 1, p. 43–7, jan. 2001.

CHOMPRET, A. et al. PDGFRA germline mutation in a family with multiple cases of gastrointestinal stromal tumor. **Gastroenterology**, v. 126, n. 1, p. 318–21, jan. 2004.

CLAES, K. et al. Variant ataxia telangiectasia: clinical and molecular findings and evaluation of radiosensitive phenotypes in a patient and relatives. **Neuromolecular medicine**, v. 15, n. 3, p. 447–57, set. 2013.

CORNELLA, H. et al. Unique Genomic Profile of Fibrolamellar Hepatocellular Carcinoma. **Gastroenterology**, 31 dez. 2014.

COSTA-GUDA, J. et al. Germline and somatic mutations in cyclin-dependent kinase inhibitor genes CDKN1A, CDKN2B, and CDKN2C in sporadic parathyroid adenomas. **Hormones & cancer**, v. 4, n. 5, p. 301–7, out. 2013.

COURTOIS, S.; CARON DE FROMENTEL, C.; HAINAUT, P. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. **Oncogene**, v. 23, n. 3, p. 631–8, 22 jan. 2004.

CUDDIHY, A. R.; BRISTOW, R. G. The p53 protein family and radiation sensitivity: Yes or no? **Cancer metastasis reviews**, v. 23, n. 3-4, p. 237–57, jan. 2004.

CURY, N. M.; FERRAZ, V. E.; SILVA, W. A. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 12, n. 1, p. 8, jan. 2014.

CUSTODIO, G. et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. **PLoS one**, v. 6, n. 3, p. e18015, jan. 2011.

CUSTÓDIO, G. et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 31, n. 20, p. 2619–26, 10 jul. 2013.

CYBULSKI, C. et al. Effect of CHEK2 missense variant I157T on the risk of breast cancer in carriers of other CHEK2 or BRCA1 mutations. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 2, p. 132–5, mar. 2009.

DA COSTA, E. C. B. et al. Founder effect of the BRCA1 5382insC mutation in Brazilian patients with hereditary breast ovary cancer syndrome. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 184, n. 1, p. 62–6, jul. 2008.

DARCY, D. G. et al. The genomic landscape of fibrolamellar hepatocellular carcinoma: whole genome sequencing of ten patients. **Oncotarget**, v. 6, n. 2, p. 755–70, 20 jan. 2015.

DENSCHLAG, D. et al. Polymorphism of the p53 tumor suppressor gene is associated with susceptibility to uterine leiomyoma. **Fertility and sterility**, v. 84, n. 1, p. 162–6, jul. 2005.

DIGIAMMARINO, E. L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nature structural biology**, v. 9, n. 1, p. 12–6, jan. 2002.

DIMOVA, D. K.; DYSON, N. J. The E2F transcriptional network: old acquaintances with new faces. **Oncogene**, v. 24, n. 17, p. 2810–26, 18 abr. 2005.

DONEHOWER, L. A. et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature**, v. 356, n. 6366, p. 215–21, 19 mar. 1992.

DUMONT, P. et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. **Nature genetics**, v. 33, n. 3, p. 357–65, mar. 2003.

EELLES, R. A. et al. Constitutional mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary tumours: molecular and immunohistochemical findings. **Oncogene**, v. 8, n.

5, p. 1269–76, maio 1993.

EELES, R. A. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer surveys**, v. 25, p. 101–24, jan. 1995.

ELIYAHU, D. et al. Meth A fibrosarcoma cells express two transforming mutant p53 species. **Oncogene**, v. 3, n. 3, p. 313–21, set. 1988.

ELIYAHU, D. et al. Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n. 22, p. 8763–7, nov. 1989.

EL-SERAG, H. B.; DAVILA, J. A. Is fibrolamellar carcinoma different from hepatocellular carcinoma? A US population-based study. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 39, n. 3, p. 798–803, mar. 2004.

EWALD, I. P. et al. Prevalence of the BRCA1 founder mutation c.5266dupin Brazilian individuals at-risk for the hereditary breast and ovarian cancer syndrome. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 9, p. 12, jan. 2011.

FAN, R. et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. **Cancer epidemiology, biomarkers & prevention**, v. 9, n. 10, p. 1037–42, out. 2000.

FANG, S. et al. Effects of MDM2, MDM4 and TP53 codon 72 polymorphisms on cancer risk in a cohort study of carriers of TP53 germline mutations. **PloS one**, v. 5, n. 5, p. e10813, jan. 2010.

FAYETTE, J.; BLAY, J.-Y. Genetic predictors for drug resistance in soft tissue sarcoma: a review of publications in 2004. **Current opinion in oncology**, v. 17, n. 4, p. 370–5, jul. 2005.

FELIX, G. E. et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. **Human genome variation**, v. 1, p. 14012, 2014.

FERREIRA, E. DOS S. **Análise dos genes TP53, BRCA1 e BRCA2 em famílias de risco para câncer de mama e avaliação da mutante p.R337H em linhagem linfoblásticoide**. 2012. Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

FIGUEIREDO, B. C. et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **Journal of medical genetics**, v. 43, n. 1, p. 91–6, jan. 2006.

FINLAY, C. A. et al. Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. **Molecular and cellular biology**,

v. 8, n. 2, p. 531–9, mar. 1988.

FINLAY, C. A.; HINDS, P. W.; LEVINE, A. J. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell**, v. 57, n. 7, p. 1083–93, 30 jun. 1989.

FLETCHER, O. et al. Missense Variants in ATM in 26,101 Breast Cancer Cases and 29,842 Controls. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v. 19, n. 9, p. 2143–2151, 8 set. 2010.

FOKKEMA, I. F. A. C. et al. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. **Human mutation**, v. 32, n. 5, p. 557–63, maio 2011.

FUHRER, D. et al. Novel TSHR germline mutation (Met463Val) masquerading as Graves' disease in a large Welsh kindred with hyperthyroidism. **Thyroid : official journal of the American Thyroid Association**, v. 10, n. 12, p. 1035–41, dez. 2000.

GARBER, J. E. et al. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. **Cancer research**, v. 51, n. 22, p. 6094–7, 15 nov. 1991.

GARRITANO, S. et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Human mutation**, v. 31, n. 2, p. 143–50, mar. 2010.

GEMIGNANI, F. et al. A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. **Oncogene**, v. 23, n. 10, p. 1954–6, 11 mar. 2004.

GHALAMKARPOUR, A. et al. Recessive primary congenital lymphoedema caused by a VEGFR3 mutation. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 6, p. 399–404, jun. 2009.

GIACOMAZZI, C. R. et al. Pediatric cancer and Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-like syndromes: a review for the pediatrician. **Revista da Associação Médica Brasileira (1992)**, v. 61, n. 3, p. 282–9, jan. 2015.

GIACOMAZZI, J. et al. TP53 p.R337H is a conditional cancer-predisposing mutation: further evidence from a homozygous patient. **BMC cancer**, v. 13, p. 187, jan. 2013a.

GIACOMAZZI, J. et al. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. **Virchows Archiv : an international journal of pathology**, v. 463, n. 1, p. 17–22, jul. 2013b.

GIACOMAZZI, J. et al. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. **Cancer**, v. 119, n. 24, p. 4341–9, 15 dez. 2013c.

GIACOMAZZI, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PloS one**, v. 9, n. 6, p. e99893, jan. 2014a.

GIACOMAZZI, J. et al. The Brazilian founder mutation TP53 p.R337H is uncommon in Portuguese women diagnosed with breast cancer. **The breast journal**, v. 20, n. 5, p. 534–6, jan. 2014b.

GIGLIA-MARI, G.; SARASIN, A. TP53 mutations in human skin cancers. **Human mutation**, v. 21, n. 3, p. 217–28, mar. 2003.

GOLDIM, J. R.; GIBBON, S. Between personal and relational privacy: understanding the work of informed consent in cancer genetics in Brazil. **Journal of community genetics**, v. 6, n. 3, p. 287–93, jul. 2015.

GOMES, M. C. et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. **Hereditary cancer in clinical practice**, v. 10, n. 1, p. 3, jan. 2012.

GONZALEZ, K. D. et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1250–6, 10 mar. 2009a.

GONZALEZ, K. D. et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1250–6, 10 mar. 2009b.

GONZALEZ, K. D. et al. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 10, p. 689–93, out. 2009c.

GRAVINA, S. et al. Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population. **Aging**, v. 1, n. 5, p. 470–80, maio 2009.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. **Nature**, v. 458, n. 7242, p. 1127–30, 30 abr. 2009.

HARTLEY, A. L. et al. Adrenal cortical tumours: epidemiological and familial aspects. **Archives of disease in childhood**, v. 62, n. 7, p. 683–9, jul. 1987a.

HARTLEY, A. L. et al. Malignant melanoma in families of children with osteosarcoma, chondrosarcoma, and adrenal cortical carcinoma. **Journal of medical genetics**, v. 24, n. 11, p. 664–8, nov. 1987b.

HEYMANN, S. et al. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. **Radiation oncology (London,**

England), v. 5, p. 104, jan. 2010.

HINDS, P. W. et al. Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the “hot spot” mutant phenotypes. **Cell growth & differentiation : the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 1, n. 12, p. 571–80, dez. 1990.

HIROTSU, M. et al. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma. **Molecular cancer**, v. 9, p. 5, jan. 2010.

HISADA, M. et al. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 8, p. 606–11, 15 abr. 1998.

HOLMFELDT, L. et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. **Nature genetics**, v. 45, n. 3, p. 242–52, mar. 2013.

HONDA, K. et al. p53 mutation is a poor prognostic indicator for survival in patients with hepatocellular carcinoma undergoing surgical tumour ablation. **British journal of cancer**, v. 77, n. 5, p. 776–82, mar. 1998.

HONEYMAN, J. N. et al. Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. **Science (New York, N.Y.)**, v. 343, n. 6174, p. 1010–4, 28 fev. 2014.

HUSSAIN, S. P. et al. TP53 mutations and hepatocellular carcinoma: insights into the etiology and pathogenesis of liver cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2166–76, 2 abr. 2007.

HWANG, S.-J. et al. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. **American journal of human genetics**, v. 72, n. 4, p. 975–83, abr. 2003.

IANNUZZI, C. M. et al. ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. **International journal of radiation oncology, biology, physics**, v. 52, n. 3, p. 606–13, 1 mar. 2002.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância.
Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Inca, 2015.

INOUE, K.; FRY, E. A. Alterations of p63 and p73 in human cancers. **Sub-cellular biochemistry**, v. 85, p. 17–40, jan. 2014.

ITO, A. et al. p300/CBP-mediated p53 acetylation is commonly induced by p53-activating agents and inhibited by MDM2. **The EMBO journal**, v. 20, n. 6, p. 1331–40, 15 mar. 2001.

JAVELAUD, D.; BESANÇON, F. CDKN1A (cyclin-dependent kinase inhibitor 1A). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, v. 5, n. 3, p. 170–171, 2001.

JENKINS, J. R.; RUDGE, K.; CURRIE, G. A. Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. **Nature**, v. 312, n. 5995, p. 651–4, jan. 1984.

JENKINS, Z. A. et al. Germline mutations in WTX cause a sclerosing skeletal dysplasia but do not predispose to tumorigenesis. **Nature genetics**, v. 41, n. 1, p. 95–100, jan. 2009.

JHA, P. et al. TP53 polymorphisms in gliomas from Indian patients: Study of codon 72 genotype, rs1642785, rs1800370 and 16 base pair insertion in intron-3. **Experimental and molecular pathology**, v. 90, n. 2, p. 167–72, abr. 2011.

JINNIN, M. et al. Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. **Nature medicine**, v. 14, n. 11, p. 1236–46, nov. 2008a.

JINNIN, M. et al. Suppressed NFAT-dependent VEGFR1 expression and constitutive VEGFR2 signaling in infantile hemangioma. **Nature medicine**, v. 14, n. 11, p. 1236–46, nov. 2008b.

JOHNSON, N. et al. Counting potentially functional variants in BRCA1, BRCA2 and ATM predicts breast cancer susceptibility. **Human molecular genetics**, v. 16, n. 9, p. 1051–7, 1 maio 2007.

JONES, S. N. et al. Overexpression of Mdm2 in mice reveals a p53-independent role for Mdm2 in tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 26, p. 15608–12, 22 dez. 1998.

KAMIHARA, J.; RANA, H. Q.; GARBER, J. E. Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. **Human mutation**, v. 35, n. 6, p. 654–62, jun. 2014.

KAPPEL, S. et al. TP53 germline mutation may affect response to anticancer treatments: analysis of an intensively treated Li-Fraumeni family. **Breast cancer research and treatment**, v. 151, n. 3, p. 671–8, jun. 2015.

KATO, S. et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8424–9, 8 jul. 2003.

KAZARIN, O. et al. Association between esophageal leiomyomatosis and p53 mutation. **The**

Annals of thoracic surgery, v. 95, n. 4, p. 1429–31, abr. 2013.

KEPPLER-NOREUIL, K. M. et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 167A, n. 2, p. 287–95, fev. 2015.

KLEINERMAN, R. A.; SCHONFELD, S. J.; TUCKER, M. A. Sarcomas in hereditary retinoblastoma. **Clinical sarcoma research**, v. 2, n. 1, p. 15, jan. 2012.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 4, p. 820–3, abr. 1971.

KOCISKO, D. A. et al. Cell-free formation of protease-resistant prion protein. **Nature**, v. 370, n. 6489, p. 471–4, 11 ago. 1994.

KRESS, M. et al. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. **Journal of virology**, v. 31, n. 2, p. 472–83, ago. 1979.

KULESHOV, M. V et al. Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. **Nucleic acids research**, v. 44, n. W1, p. W90–7, 8 jul. 2016.

KUNG, C. et al. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. **Nature medicine**, v. 6, n. 3, p. 343–5, mar. 2000.

LAJUS, T. B. P. The importance to update the guidelines for the use of genetic testing in noncancer patients in Brazil. **Revista de saúde pública**, v. 49, p. 71, jan. 2015.

LAMMENS, C. R. M. et al. Regular surveillance for Li-Fraumeni Syndrome: advice, adherence and perceived benefits. **Familial cancer**, v. 9, n. 4, p. 647–54, dez. 2010.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15–6, 2 jul. 1992.

LANE, D. P.; CRAWFORD, L. V. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature**, v. 278, n. 5701, p. 261–3, 15 mar. 1979.

LANG, G. A. et al. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 861–72, 17 dez. 2004.

LANGERØD, A. et al. TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 9, n. 3, p. R30, jan. 2007.

- LATRONICO, A. C. et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4970–3, out. 2001.
- LEE, D. S. C. et al. Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. **Breast cancer research : BCR**, v. 14, n. 2, p. R66, jan. 2012.
- LEE, M. S. et al. Comprehensive Analysis of Missense Variations in the BRCT Domain of BRCA1 by Structural and Functional Assays. **Cancer Research**, v. 70, n. 12, p. 4880–4890, 1 jun. 2010.
- LEGAL, E. F. et al. Prevalence of an inherited cancer predisposition syndrome associated with the germ line TP53 R337H mutation in Paraguay. **Cancer epidemiology**, v. 39, n. 2, p. 166–9, abr. 2015.
- LEVY, M. S. [The role of international migration on the evolution of the Brazilian population (1872 to 1972)]. **Revista de saúde pública**, v. Suppl, p. 49–90, jun. 1974.
- LI, F. P. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer research**, v. 48, n. 18, p. 5358–62, 15 set. 1988.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Annals of internal medicine**, v. 71, n. 4, p. 747–52, out. 1969a.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6, p. 1365–73, dez. 1969b.
- LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Prospective study of a family cancer syndrome. **JAMA**, v. 247, n. 19, p. 2692–4, 21 maio 1982.
- LI, G. et al. Genetic polymorphisms of p21 are associated with risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. **Carcinogenesis**, v. 26, n. 9, p. 1596–602, 1 set. 2005.
- LI, Y. et al. MDM2 SNP309 is associated with endometrial cancer susceptibility: a meta-analysis. **Human cell**, v. 24, n. 2, p. 57–64, jun. 2011.
- LIEDE, A.; KARLAN, B. Y.; NAROD, S. A. Cancer risks for male carriers of germline mutations in BRCA1 or BRCA2: a review of the literature. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 22, n. 4, p. 735–42, 15

fev. 2004.

LIMACHER, J. M. et al. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. **International journal of cancer. Journal international du cancer**, v. 96, n. 4, p. 238–42, 20 ago. 2001.

LINZER, D. I.; LEVINE, A. J. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cell**, v. 17, n. 1, p. 43–52, maio 1979.

LUSCAN, A. et al. Mutations in SETD2 cause a novel overgrowth condition. **Journal of medical genetics**, v. 51, n. 8, p. 512–7, ago. 2014.

LYNCH, H. T. et al. Genetic and pathologic findings in a kindred with hereditary sarcoma, breast cancer, brain tumors, leukemia, lung, laryngeal, and adrenal cortical carcinoma. **Cancer**, v. 41, n. 5, p. 2055–64, maio 1978.

LYNCH, H. T.; GUIRGIS, H. A. Childhood cancer and the SBLA syndrome. **Medical hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 15–22, jan. 1979.

MACDONALD, T. J. Hedgehog Pathway in Pediatric Cancers: They're Not Just for Brain Tumors Anymore. **American Society of Clinical Oncology educational book / ASCO. American Society of Clinical Oncology. Meeting**, p. 605–9, jan. 2012.

MAI, P. L. et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. **Cancer genetics**, v. 205, n. 10, p. 479–87, out. 2012.

MAITRA, A. et al. Synchronous wilms tumor and fibrolamellar hepatocellular carcinoma: report of a case. **Pediatric and Developmental Pathology: The Official Journal of the Society for Pediatric Pathology and the Paediatric Pathology Society**, v. 3, n. 5, p. 492–496, 2000.

MALIK, M. A. et al. Association of TP53 intron 3, 16 bp duplication polymorphism with esophageal and gastric cancer susceptibility in Kashmir Valley. **Oncology research**, v. 19, n. 3-4, p. 165–9, jan. 2011.

MALKIN, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science (New York, N.Y.)**, v. 250, n. 4985, p. 1233–8, 30 nov. 1990.

MALKIN, D. Li-fraumeni syndrome. **Genes & cancer**, v. 2, n. 4, p. 475–84, abr. 2011.

MANOUKIAN, S. et al. Germline mutations of TP53 and BRCA2 genes in breast cancer/sarcoma families. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 43, n. 3,

p. 601–6, fev. 2007.

MARCEL, V. et al. TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. **Journal of medical genetics**, v. 46, n. 11, p. 766–72, nov. 2009.

MARGRAF, R. L. et al. Multiple endocrine neoplasia type 2 RET protooncogene database: repository of MEN2-associated RET sequence variation and reference for genotype/phenotype correlations. **Human mutation**, v. 30, n. 4, p. 548–56, abr. 2009.

MARIS, J. M.; KNUDSON, A. G. Revisiting tissue specificity of germline cancer predisposing mutations. **Nature reviews. Cancer**, v. 15, n. 2, p. 65–6, fev. 2015.

MARTÍN-CABALLERO, J. et al. Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. **Cancer research**, v. 61, n. 16, p. 6234–8, 15 ago. 2001.

MCBRIDE, K. A et al. Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 11, n. 5, p. 260–71, 2014.

MEEK, D. W. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 714–23, out. 2009.

MEIJERS-HEIJBOER, H. et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nature genetics**, v. 31, n. 1, p. 55–9, maio 2002.

MENENDEZ, D.; INGA, A.; RESNICK, M. A. The expanding universe of p53 targets. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 10, p. 724–37, out. 2009.

MIHARA, M. et al. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. **Molecular cell**, v. 11, n. 3, p. 577–90, mar. 2003.

MILANI, D. et al. Rubinstein-Taybi syndrome: clinical features, genetic basis, diagnosis, and management. **Italian journal of pediatrics**, v. 41, p. 4, 2015.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic acids research**, v. 16, n. 3, p. 1215, 11 fev. 1988.

MOLDOVAN, G.-L.; D'ANDREA, A. D. How the fanconi anemia pathway guards the genome. **Annual review of genetics**, v. 43, p. 223–49, 2009.

MOREIRA, R M M, MELO, D. G. Percepções dos médicos a respeito do aconselhamento genético do câncer: o exemplo do câncer colorretal. **Revista Ciência em Extensão**, v. 8, n. 2, p. 46–65, 2012.

- MOREIRA-NUNES, C. A. et al. Presence of c.3956delC mutation in familial adenomatous polyposis patients from Brazil. **World journal of gastroenterology**, v. 21, n. 31, p. 9413–9, 21 ago. 2015.
- MOSSÉ, Y. P. et al. Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene. **Nature**, v. 455, n. 7215, p. 930–5, 16 out. 2008.
- MULLER, P. A. J.; VOUSDEN, K. H. p53 mutations in cancer. **Nature cell biology**, v. 15, n. 1, p. 2–8, jan. 2013.
- NACCARATI, A. et al. Mutations and polymorphisms in TP53 gene--an overview on the role in colorectal cancer. **Mutagenesis**, v. 27, n. 2, p. 211–8, mar. 2012.
- NICHOLS, K. E.; MALKIN, D. Genotype Versus Phenotype: The Yin and Yang of Germline TP53 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 33, n. 21, p. 2331–3, 20 jul. 2015.
- NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 705–8, 7 dez. 1989.
- NOGUEIRA, S. T. S. et al. (18)F-FDG PET-CT for Surveillance of Brazilian Patients with Li-Fraumeni Syndrome. **Frontiers in oncology**, v. 5, p. 38, jan. 2015.
- NOMA, C. et al. Association of p53 genetic polymorphism (Arg72Pro) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. **Cancer letters**, v. 210, n. 2, p. 197–203, 16 jul. 2004.
- OGNJANOVIC, S. et al. Sarcomas in TP53 germline mutation carriers: a review of the IARC TP53 database. **Cancer**, v. 118, n. 5, p. 1387–96, 1 mar. 2012.
- OLIVE, K. P. et al. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. **Cell**, v. 119, n. 6, p. 847–60, 17 dez. 2004.
- OLIVIER, M. et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer research**, v. 63, n. 20, p. 6643–50, 15 out. 2003.
- OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 1, p. a001008, jan. 2010.
- OREN, M.; ROTTER, V. Mutant p53 gain-of-function in cancer. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 2, p. a001107, fev. 2010.
- ORLOFF, M. S. et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like

- syndromes. **American journal of human genetics**, v. 92, n. 1, p. 76–80, 10 jan. 2013.
- OZEN, C. et al. Genetics and epigenetics of liver cancer. **New biotechnology**, v. 30, n. 4, p. 381–4, 25 maio 2013.
- PALMERO, E. I. et al. Cancer genetic counseling in public health care hospitals: the experience of three Brazilian services. **Community genetics**, v. 10, n. 2, p. 110–9, jan. 2007.
- PALMERO, E. I. et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer letters**, v. 261, n. 1, p. 21–5, 8 mar. 2008.
- PANDE, M. et al. Association between germline single nucleotide polymorphisms in the PI3K-AKT-mTOR pathway, obesity, and breast cancer disease-free survival. **Breast cancer research and treatment**, v. 147, n. 2, p. 381–7, out. 2014.
- PARADA, L. F. et al. Cooperation between gene encoding p53 tumour antigen and ras in cellular transformation. **Nature**, v. 312, n. 5995, p. 649–51, jan. 1984.
- PASKULIN, D. D. et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0143262, jan. 2015.
- PATRIER-SALLEBERT, S. et al. Transmission of germline TP53 mutations from male carriers to female partners. **Journal of medical genetics**, v. 52, n. 3, p. 145–6, mar. 2015.
- PÉREZ-PÉREZ, G. I. et al. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. **Scandinavian journal of gastroenterology**, v. 40, n. 1, p. 56–60, jan. 2005.
- PERFUMO, C. et al. MDM2 SNP309 genotype influences survival of metastatic but not of localized neuroblastoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 53, n. 4, p. 576–83, out. 2009.
- PETITJEAN, A. et al. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**, v. 26, n. 15, p. 2157–65, 2007a.
- PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human mutation**, v. 28, n. 6, p. 622–9, jun. 2007b.
- PETRIJ, F. et al. Rubinstein-Taybi syndrome caused by mutations in the transcriptional co-activator CBP. **Nature**, v. 376, n. 6538, p. 348–51, 27 jul. 1995.
- PETRUCCELLI, N.; DALY, M. B.; FELDMAN, G. L. Hereditary breast and ovarian cancer due to mutations in BRCA1 and BRCA2. **Genetics in medicine : official journal of the**

American College of Medical Genetics, v. 12, n. 5, p. 245–59, maio 2010.

PFEIFER, G. P.; HAINAUT, P. On the origin of G → T transversions in lung cancer. **Mutation research**, v. 526, n. 1-2, p. 39–43, 15 maio 2003.

PFLAUM, J.; SCHLOSSER, S.; MÜLLER, M. p53 Family and Cellular Stress Responses in Cancer. **Frontiers in oncology**, v. 4, p. 285, jan. 2014.

PHILLIPS, C. L. et al. MDM2 polymorphism increases susceptibility to childhood acute myeloid leukemia: a report from the Children's Oncology Group. **Pediatric blood & cancer**, v. 55, n. 2, p. 248–53, ago. 2010.

PORCU, M. et al. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. **Blood**, v. 119, n. 19, p. 4476–9, 10 maio 2012.

PROCHAZKOVA, K. et al. Somatic TP53 mutation mosaicism in a patient with Li-Fraumeni syndrome. **American journal of medical genetics. Part A**, v. 149A, n. 2, p. 206–11, fev. 2009.

PROLLA, C. M. D. et al. Knowledge about breast cancer and hereditary breast cancer among nurses in a public hospital. **Revista latino-americana de enfermagem**, v. 23, n. 1, p. 90–7, jan. .

PRUSINER, S. B. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. **Science (New York, N.Y.)**, v. 216, n. 4542, p. 136–44, 9 abr. 1982.

PUIG, S. et al. Characterization of individuals at high risk of developing melanoma in Latin America: bases for genetic counseling in melanoma. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, 17 dez. 2015.

RANGEL, L. P. et al. The aggregation of mutant p53 produces prion-like properties in cancer. **Prion**, v. 8, n. 1, p. 75–84, jan. 2014.

RAUSCH, T. et al. Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations. **Cell**, v. 148, n. 1-2, p. 59–71, 2012.

RAYMOND, V. M. et al. Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 98, n. 1, p. E119–25, jan. 2013.

REID, S. et al. Biallelic BRCA2 mutations are associated with multiple malignancies in childhood including familial Wilms tumour. **Journal of medical genetics**, v. 42, n. 2, p. 147–51, fev. 2005.

RIBEIRO, R. C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner

to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 16, p. 9330–5, 31 jul. 2001.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 5, p. 405–24, 5 mar. 2015.

RIESKE, P. et al. Atypical molecular background of glioblastoma and meningioma developed in a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Journal of neuro-oncology**, v. 71, n. 1, p. 27–30, jan. 2005.

RILEY, T. et al. Transcriptional control of human p53-regulated genes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 9, n. 5, p. 402–12, maio 2008.

ROELFSEMA, J. H. et al. Genetic heterogeneity in Rubinstein-Taybi syndrome: mutations in both the CBP and EP300 genes cause disease. **American journal of human genetics**, v. 76, n. 4, p. 572–80, abr. 2005.

ROTH, F. L. et al. Consistency of self-reported first-degree family history of cancer in a population-based study. **Familial cancer**, v. 8, n. 3, p. 195–202, jan. 2009.

ROY, R.; CHUN, J.; POWELL, S. N. BRCA1 and BRCA2: different roles in a common pathway of genome protection. **Nature reviews. Cancer**, v. 12, n. 1, p. 68–78, jan. 2012.

RUIJS, M. W. G. et al. The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 15, n. 1, p. 110–4, jan. 2007.

SALOUM DE NEVES MANTA, F. et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e75145, jan. 2013.

SAMUEL, N. et al. Management of familial cancer: sequencing, surveillance and society. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 11, n. 12, p. 723–31, dez. 2014.

SANDRINI, F. et al. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Hormone and metabolic research**, v. 37, n. 4, p. 231–5, abr. 2005.

SANTOS, N. P. C. et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. **Human mutation**, v. 31, n. 2, p. 184–90, mar. 2010.

SAVAGE, S. A. et al. Germ-line genetic variation of TP53 in osteosarcoma. **Pediatric blood & cancer**, v. 49, n. 1, p. 28–33, jul. 2007.

- SAVITSKY, K. et al. A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5218, p. 1749–53, 23 jun. 1995.
- SCHAYEK, H. et al. The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. **Cancer genetics**, 1 dez. 2015.
- SCHNEIDER, K. et al. **Li-Fraumeni Syndrome** University of Washington, Seattle, , 11 abr. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1311/>>. Acesso em: 30 jul. 2015
- SEIDINGER, A. L. et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer**, v. 117, n. 10, p. 2228–35, 15 maio 2011.
- SEIDINGER, A. L. et al. Occurrence of Neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. **PLoS one**, v. 10, n. 10, p. e0140356, jan. 2015.
- SENZER, N. et al. p53 therapy in a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Molecular cancer therapeutics**, v. 6, n. 5, p. 1478–82, maio 2007.
- SHAH, S. et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1226–31, out. 2013.
- SHILOH, Y.; ZIV, Y. The ATM protein kinase: regulating the cellular response to genotoxic stress, and more. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 14, n. 4, p. 197–210, abr. 2013.
- SHLIEN, A. et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11264–9, 12 ago. 2008.
- SHTEYER, E. et al. Truncating mutation in the nitric oxide synthase 1 gene is associated with infantile achalasia. **Gastroenterology**, v. 148, n. 3, p. 533–536.e4, mar. 2015.
- SIDDIQUE, M.; SABAPATHY, K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. **Oncogene**, v. 25, n. 25, p. 3489–500, 15 jun. 2006.
- SILVA, A. G. et al. Number of rare germline CNVs and TP53 mutation types. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 7, p. 101, jan. 2012.
- SILVA, F. C. et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC medical genetics**, v. 15, p. 55, jan. 2014a.
- SILVA, J. L. et al. Prion-like aggregation of mutant p53 in cancer. **Trends in biochemical sciences**, v. 39, n. 6, p. 260–7, jun. 2014b.

- SILVA, T. B. DE C. E. et al. [Perception of cancer causes and risk, family history and preventive behaviors of users in oncogenetic counseling]. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, v. 47, n. 2, p. 377–84, abr. 2013.
- SODHA, N. Screening hCHK2 for Mutations. **Science**, v. 289, n. 5478, p. 359a–359, 21 jul. 2000.
- SOUSSI, T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. **EMBO reports**, v. 11, n. 11, p. 822–6, nov. 2010.
- SOUSSI, T.; LEROY, B.; TASCHNER, P. E. M. Recommendations for analyzing and reporting TP53 gene variants in the high-throughput sequencing era. **Human mutation**, v. 35, n. 6, p. 766–78, jun. 2014.
- SOUSSI, T.; LOZANO, G. p53 mutation heterogeneity in cancer. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 331, n. 3, p. 834–42, 10 jun. 2005.
- SOUZA, S. **Identificação de Mutações Germinativas no Gene TP53 em Mulheres com História Familiar de Câncer de Mama**. 2005. 104 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.
- SPROSTON, A. R. et al. Fibroblasts from Li-Fraumeni patients are resistant to low dose-rate irradiation. **International journal of radiation biology**, v. 70, n. 2, p. 145–50, ago. 1996.
- SRIVASTAVA, S. et al. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. **Nature**, v. 348, n. 6303, p. 747–9, jan. 1990.
- STEPHENS, P. J. et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. **Cell**, v. 144, n. 1, p. 27–40, 7 jan. 2011.
- STITZIEL, N. O.; KIEZUN, A.; SUNYAEV, S. Computational and statistical approaches to analyzing variants identified by exome sequencing. **Genome biology**, v. 12, n. 9, p. 227, jan. 2011.
- STREDRICK, D. L. et al. The ATM missense mutation p.Ser49Cys (c.146C>G) and the risk of breast cancer. **Human mutation**, v. 27, n. 6, p. 538–44, jun. 2006.
- STRONG, L. C.; STINE, M.; NORSTED, T. L. Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 79, n. 6, p. 1213–20, dez. 1987.
- SUNTHORNTHEPVARAKUI, T. et al. Brief report: resistance to thyrotropin caused by mutations in the thyrotropin-receptor gene. **The New England journal of medicine**, v. 332, n. 3, p. 155–60, 19 jan. 1995.

TABORI, U. et al. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer research**, v. 67, n. 4, p. 1415–8, 15 fev. 2007.

TALWALKAR, S. S. et al. Myelodysplastic syndromes arising in patients with germline TP53 mutation and Li-Fraumeni syndrome. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 134, n. 7, p. 1010–5, jul. 2010.

TAN, J. et al. Genomic landscapes of breast fibroepithelial tumors. **Nature genetics**, v. 47, n. 11, p. 1341–5, dez. 2015.

THOMPSON, D. et al. Cancer risks and mortality in heterozygous ATM mutation carriers. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 97, n. 11, p. 813–22, 1 jun. 2005.

TINAT, J. et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 27, n. 26, p. e108–9; author reply e110, 10 set. 2009.

TOLEDO, F.; WAHL, G. M. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. **Nature reviews. Cancer**, v. 6, n. 12, p. 909–23, dez. 2006.

TORBENSON, M. Fibrolamellar Carcinoma: 2012 Update. **Scientifica**, v. 2012, p. 1–15, 2012.

TRKOVA, M. et al. Is there anticipation in the age at onset of cancer in families with Li-Fraumeni syndrome? **Journal of human genetics**, v. 47, n. 8, p. 381–6, jan. 2002.

TRKOVA, M. et al. Telomere length in peripheral blood cells of germline TP53 mutation carriers is shorter than that of normal individuals of corresponding age. **Cancer**, v. 110, n. 3, p. 694–702, 1 ago. 2007.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic acids research**, v. 43, n. Database issue, p. D204–12, jan. 2015.

VAHTERISTO, P. et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. **Cancer research**, v. 61, n. 15, p. 5718–22, 1 ago. 2001.

VARGAS-TORRES, S. L. et al. Effects of MDM2 promoter polymorphisms on the development of cervical neoplasia in a Southeastern Brazilian population. **Biomarkers : biochemical indicators of exposure, response, and susceptibility to chemicals**, v. 19, n. 8, p. 637–45, dez. 2014.

VARLEY, J. M. et al. A novel deletion within exon 6 of TP53 in a family with Li-Fraumeni-like syndrome, and LOH in a benign lesion from a mutation carrier. **Cancer genetics and**

cytogenetics, v. 90, n. 1, p. 14–6, ago. 1996.

VARLEY, J. M. et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer research**, v. 57, n. 15, p. 3245–52, 1 ago. 1997.

VARLEY, J. M. et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. **American journal of human genetics**, v. 65, n. 4, p. 995–1006, out. 1999.

VARLEY, J. M. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Human mutation**, v. 21, n. 3, p. 313–20, mar. 2003.

VARNEY, M. L.; SINGH, R. K. VEGF-C-VEGFR3/Flt4 axis regulates mammary tumor growth and metastasis in an autocrine manner. **American journal of cancer research**, v. 5, n. 2, p. 616–28, 2015.

VIANA, D. V et al. Family history of cancer in Brazil: is it being used? **Familial cancer**, v. 7, n. 3, p. 229–32, jan. 2008.

VIEIRA, D. K. R. et al. Identification of familial clustering for cancer through the family health strategy program in the municipality of Angra dos Reis, Rio de Janeiro, Brazil. **Journal of community genetics**, v. 6, n. 1, p. 9–16, jan. 2015.

VILLANI, A. et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. **The Lancet. Oncology**, v. 12, n. 6, p. 559–67, jun. 2011.

VIVEKANANDAN, P.; TORBENSON, M. Epigenetic instability is rare in fibrolamellar carcinomas but common in viral-associated hepatocellular carcinomas. **Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, v. 21, n. 6, p. 670–5, jun. 2008.

WAGNER, J. et al. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 86, n. 22, p. 1707–10, 16 nov. 1994.

WALDMAN, T.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. **Cancer research**, v. 55, n. 22, p. 5187–90, 15 nov. 1995.

WANG, Y. et al. Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. **Human mutation**, v. 24, n. 1, p. 21–34, jul. 2004.

WANG-GOHRKE, S. et al. Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk

for ovarian cancer but not in carriers of BRCA1 or BRCA2 germline mutations. **British journal of cancer**, v. 81, n. 1, p. 179–83, set. 1999.

WARD, S. C.; WAXMAN, S. Fibrolamellar carcinoma: a review with focus on genetics and comparison to other malignant primary liver tumors. **Seminars in liver disease**, v. 31, n. 1, p. 61–70, fev. 2011.

WEINBERG, R. A. **The Biology of Cancer**. 1^a ed. New York: Garland Science, 2007. 864 p.

WHIBLEY, C.; PHAROAH, P. D. P.; HOLLSTEIN, M. P53 Polymorphisms: Cancer Implications. **Nature reviews. Cancer**, v. 9, n. 2, p. 95–107, fev. 2009.

WIENCH, M. et al. Estimation of risk of inherited medullary thyroid carcinoma in apparent sporadic patients. **Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology**, v. 19, n. 5, p. 1374–80, 1 mar. 2001.

WILLIAMS, V. C. et al. Neurofibromatosis type 1 revisited. **Pediatrics**, v. 123, n. 1, p. 124–33, jan. 2009.

WONG, P. et al. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. **Gastroenterology**, v. 130, n. 1, p. 73–9, jan. 2006.

WOOSTER, R. et al. Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. **Nature**, v. 378, n. 6559, p. 789–92, 1995.

WU, X. et al. The p53-mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes & development**, v. 7, n. 7A, p. 1126–32, jul. 1993.

XIE, P. et al. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes. **Cellular signalling**, v. 20, n. 9, p. 1671–8, out. 2008.

XU, J. et al. Heterogeneity of Li-Fraumeni syndrome links to unequal gain-of-function effects of p53 mutations. **Scientific reports**, v. 4, p. 4223, jan. 2014.

XU, L. et al. Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. **Human molecular genetics**, v. 24, n. 1, p. 50–63, 1 jan. 2015.

YAMAGUCHI, K. et al. Prevalence of low-penetrant germline TP53 D49H mutation in Japanese cancer patients. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, v. 37, n. 4, p. 259–64, 2016.

YANG, X. et al. Identification of a comprehensive spectrum of genetic factors for hereditary breast cancer in a Chinese population by next-generation sequencing. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0125571, jan. 2015.

ZHAO, D. et al. VEGF drives cancer-initiating stem cells through VEGFR-2/Stat3 signaling

to upregulate Myc and Sox2. **Oncogene**, v. 34, n. 24, p. 3107–19, 11 jun. 2015.

ZONA, S. et al. FOXM1: an emerging master regulator of DNA damage response and genotoxic agent resistance. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1839, n. 11, p. 1316–22, nov. 2014.

ANEXOS

Anexo 1 – Termo de consentimento livre e esclarecido para maiores de 18 anos



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para pacientes maiores de 18 anos)

Projeto de Pesquisa: Caracterização clínica e molecular do câncer hereditário: Rede Nacional de Câncer Familiar

Nome de Voluntário: _____

Você está sendo convidado(a) pelos médicos e pesquisadores do **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA)** e de outras Instituições de diferentes Estados do país que tratam de pacientes com câncer a participar de um projeto colaborativo, com apoio do Ministério da Saúde e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

OBJETIVOS DO ESTUDO

Este projeto de pesquisa pretende reunir informações sobre indivíduos e famílias que têm certos tipos de câncer com características hereditárias. Estes tumores ocorrem em pessoas que apresentam um risco maior de desenvolver câncer devido à presença de fatores genéticos transmitidos de geração em geração. As informações obtidas poderão ajudar a compreender melhor este conjunto de doenças, e definir:

- 1- Procedimentos para identificar indivíduos com maior risco de desenvolver tumores;
- 2- Estratégias para identificar precocemente tumores hereditários;
- 3- Procedimentos para estimular a prevenção do câncer em indivíduos em risco;
- 4- Quais são as alterações genéticas que causam tumores hereditários.

Para atingir estes objetivos, estamos convidando-o (a) a participar de forma voluntária neste projeto de pesquisa.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao participar deste projeto e após assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, serão solicitadas informações sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar de câncer. É possível que sejam solicitadas informações adicionais sobre sua família e outros familiares afetados por câncer. Neste caso, será solicitado que você forneça as informações e/ou faça contato com seus familiares e/ou solicite que os mesmos entrem em contato com a equipe de pesquisa. Por fim, ao participar desse projeto de pesquisa você deverá consentir com uma ou mais das seguintes opções de participação:

- a) os dados obtidos a partir da sua história médica e familiar poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;
- b) uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) será


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

- coletada para extração de ácidos nucléicos e armazenamento na Instituição sendo utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto, e
- c) uma amostra de seu tumor e/ou tecido normal próximo, que já tiverem sido retiradas por cirurgia serão armazenadas na Instituição em que o Sr.(a) está sendo atendido e/ou remetidas para armazenamento no INCA. É rotina nos laboratórios de patologia usar parte do tumor retirado por cirurgia para exames laboratoriais que são importantes para o diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado não é utilizado e fica armazenado nas instituições por um período de tempo, sendo posteriormente descartado conforme Legislação Sanitária que regulamenta o assunto.

De acordo as opções de participação no projeto escolhidas por você as informações fornecidas e/ou as amostras armazenadas serão utilizadas em estudos futuros para:

- a) identificar e caracterizar características individuais e familiares do câncer hereditário;
- b) identificar e caracterizar as alterações genéticas que podem estar relacionadas ao tipo de tumor diagnosticado.

Se estudos adicionais, não previstos inicialmente forem propostos, você será chamado (a), informado(a) da possibilidade de participar do estudo e convidado(a) novamente a participar. Dados e materiais biológicos fornecidos somente poderão ser utilizados para estes projetos complementares se isso for autorizado por você.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Você pode optar por uma das alternativas acima para sua participação neste estudo. Não existem outras alternativas para sua participação no estudo, e caso não concorde com nenhuma das alternativas você pode optar por não participar do estudo.

RISCOS

O seu tratamento será exatamente o mesmo caso você participe ou não deste estudo. A coleta de sangue (equivalente a duas colheres de sopa) para isolamento de ácidos nucléicos será feita por punção venosa adicional, além da rotina de tratamento a que você será submetido(a). Esta punção venosa pode resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. A amostra de tumor será obtida a partir do procedimento cirúrgico que você será submetido como parte do tratamento, e não implica em um risco adicional.

BENEFÍCIOS

A análise das informações e o material biológico coletado podem não trazer um benefício direto a você. As informações coletadas a respeito do seu tumor e sua história familiar de câncer poderão ajudar a compreender melhor esta doença em sua família. As informações coletadas também ajudarão a compreender os diferentes tipos de tumores hereditários que ocorrem no Brasil.


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Todo seu acompanhamento, para fins deste estudo, será feito pelos médicos pesquisadores Fernando Regla Vargas ou José Cláudio Casali da Rocha, pesquisadores vinculados a este projeto.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Suas informações serão mantidas sob sigilo, sendo utilizadas apenas pelos pesquisadores participantes do projeto. O material armazenado será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. As informações fornecidas sobre seu histórico pessoal e seu histórico familiar serão utilizadas apenas para publicações científicas ou com fins educacionais, mas sua identidade e seus dados pessoais permanecerão confidenciais, sendo tomados todos os cuidados para manter a sua privacidade.

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. O seu tratamento e o acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Se você concordar em fornecer as informações e/ou material biológico mencionados acima, desejamos esclarecer que você não receberá quaisquer benefícios financeiros por sua participação neste estudo.


BASES DA PARTICIPAÇÃO

Sua participação neste projeto é voluntária. Se você não concordar em participar de deste projeto sua decisão não influenciará, de modo algum, em seu tratamento ou acompanhamento, atuais ou futuros na Instituição.

Você pode retirar este consentimento a qualquer momento, de modo que as informações fornecidas, assim como as amostras biológicas fornecidas, não serão mais utilizadas no presente projeto e serão descartadas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você receberá uma cópia deste documento e o original permanecerá arquivado. Somente assine este Termo se você compreendeu as informações contidas nele. Caso você tenha questões a fazer ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, você pode entrar em contato com a Dra. Adriana Scheliga, Coordenadora da Comissão de Ética e Pesquisa do INCA, pelo telefone (21) 3233-1353, ou com Dr Héctor N. Seunez Abreu Coordenador do Projeto, pelo telefone (21) 3233 1469



Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Opto em participar do projeto de pesquisa proposto fornecendo autorização para uso de:

- () dados obtidos a partir de minha história médica e familiar que poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data

- () uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) para extração de ácidos nucleicos e armazenamento na Instituição que será utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto,

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data

- () amostras de meu tumor e/ou tecido normal próximo, que já tiverem sido retiradas por cirurgia.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



Adicionalmente, declaro:

1. Ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.
2. Estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.
3. Ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.
4. Ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.
5. Que autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização na investigação de síndromes hereditárias do câncer.
6. Que, em caso do desenvolvimento de novas pesquisas na área de câncer hereditário, desejo ser contatado e informado acerca destas pesquisas.
7. Que, caso sejam propostos novos projetos de pesquisa sobre câncer familiar, entendo que informações sobre minha pessoa/família e meu material biológico somente poderão ser utilizados se eu assinar novo consentimento para o estudo específico.
8. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível. Os resultados das análises de dados clínicos e sobre testes de DNA serão disponibilizados em forma publicação científica, de modo a garantir o sigilo sobre minha identidade. Os dados sobre testes de DNA serão informados a mim e/ou a um familiar por mim indicado se eu assim o quiser.
9. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.
10. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo. Telefone () _____.

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do pesquisador

Nome por extenso

Local e Data


Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data

RG ou CPF do Participante


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo 2 - Termo de consentimento livre e esclarecido para responsável por menor de 18 anos



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para responsável por menor de 18 anos)

Projeto de Pesquisa: Caracterização clínica e molecular do câncer hereditário: Rede Nacional de Câncer Familiar

Nome de Voluntário: _____

Nome do Responsável: _____

Você e seu filho(a) estão sendo convidados(as) pelos médicos e pesquisadores do INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) e de outras Instituições de diferentes Estados do país que tratam de pacientes com câncer a participar de um projeto colaborativo, com apoio do Ministério da Saúde e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

OBJETIVOS DO ESTUDO

Este projeto de pesquisa pretende reunir informações sobre indivíduos e famílias que têm certos tipos de câncer com características hereditárias. Estes tumores ocorrem em pessoas que apresentam um risco maior de desenvolver câncer devido à presença de fatores genéticos transmitidos de geração em geração. As informações obtidas poderão ajudar a compreender melhor este conjunto de doenças, e definir:

- 1- Procedimentos para identificar indivíduos com maior risco de desenvolver tumores;
- 2- Estratégias para identificar precocemente tumores hereditários;
- 3- Procedimentos para estimular a prevenção do câncer em indivíduos em risco;
- 4- Quais são as alterações genéticas que causam tumores hereditários.

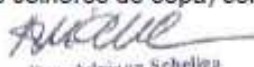
Para atingir estes objetivos, estamos convidando-os a participar de forma voluntária neste projeto de pesquisa.

Ao participar deste projeto e após assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, serão solicitadas informações sobre a história médica de seu filho(a) e sobre a história familiar de câncer. É possível que sejam solicitadas informações adicionais sobre sua família e outros familiares afetados por câncer. Neste caso, será solicitado que você forneça as informações e/ou faça contato com seus familiares e/ou solicite que os mesmos entrem em contato com a equipe de pesquisa.

PROCEDIMENTOS DO ESTUDO

Ao participar desse projeto de pesquisa você deverá consentir com uma ou mais das seguintes opções de participação:

- a) os dados obtidos a partir da história médica e familiar de seu filho(a) poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;
- b) uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) será


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



coletada de seu filho(a) para extração de ácidos nucleicos e armazenamento na Instituição sendo utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto, e

- c) uma amostra do tumor e/ou tecido normal próximo ao tumor de seu filho(a), que já tiverem sido retiradas por cirurgia serão armazenadas na Instituição em que ele(a) está sendo atendido e/ou remetidas para armazenamento no INCA. É rotina nos laboratórios de patologia usar parte do tumor retirado por cirurgia para exames laboratoriais que são importantes para o diagnóstico definitivo. O restante do tumor que é retirado não é utilizado e fica armazenado nas instituições por um período de tempo, sendo posteriormente descartado conforme Legislação Sanitária que regulamenta o assunto.

De acordo as opções de participação no projeto autorizadas por você as informações fornecidas e/ou as amostras armazenadas serão utilizadas em estudos futuros para:

- a) identificar e caracterizar características individuais e familiares do câncer hereditário;
b) identificar e caracterizar as alterações genéticas presentes em seu filho(a) que podem estar relacionadas ao tipo de tumor diagnosticado.

Se estudos adicionais, não previstos inicialmente forem propostos, você será chamado(a) para autorizar ou não a utilização das informações e material biológico fornecidos por seu filho(a). Dados e materiais biológicos fornecidos somente poderão ser utilizados para estes projetos complementares se isso for autorizado por você.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Você pode optar por uma das alternativas acima para a participação de seu filho(a) neste estudo. Não existem outras alternativas para a participação de seu filho(a) no estudo, e caso não concorde com nenhuma das alternativas você pode optar por não autorizar a participação de seu filho(a) no estudo.

RISCOS

O tratamento de seu filho (a) será exatamente o mesmo caso você autorize ou não a participação dele(a) no estudo. A coleta de sangue (equivalente a duas colheres de sopa) para isolamento de ácidos nucleicos será feita por punção venosa adicional, além da rotina de tratamento a que seu filho(a) será submetido(a). Esta punção venosa pode resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses. A amostra de tumor será obtida a partir do procedimento cirúrgico que seu filho(a) será submetido como parte do tratamento, e não implica em um risco adicional

BENEFÍCIOS

A análise das informações e o material biológico coletados podem não trazer um benefício direto ao seu filho(a). As informações coletadas a respeito do tumor de seu filho (a) e a história familiar de câncer em sua família poderão ajudar a compreender melhor a doença de seu filho(a) e em sua família. As informações coletadas também ajudarão a compreender os diferentes tipos de tumores hereditários que ocorrem no Brasil.


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Todo acompanhamento de seu filho(a), para fins deste estudo, será feito pelos médicos pesquisadores Fernando Regla Vargas ou José Cláudio Casali da Rocha, pesquisadores vinculados a este projeto.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

As informações fornecidas serão mantidas sob sigilo, sendo utilizadas apenas pelos pesquisadores participantes do projeto. O material armazenado será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, a privacidade e identidade sua e de seu filho(a) serão preservadas. As informações fornecidas sobre o histórico pessoal de seu filho(a) e seu histórico familiar serão utilizadas apenas para publicações científicas ou com fins educacionais, mas a identidade e os dados pessoais permanecerão confidenciais, sendo tomados todos os cuidados para manter a sua privacidade e a de seu filho(a).

TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. O tratamento de seu filho(a) e o acompanhamento médico independem de sua autorização para participação neste estudo.

CUSTOS

Se você concordar em fornecer as informações e/ou material biológico de seu filho(a) mencionados acima, desejamos esclarecer que você e seu filho(a) não receberão quaisquer benefícios financeiros pela participação neste estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

Sua autorização para a participação de seu filho(a) neste projeto é voluntária. Se você não concordar em autorizar a participação de seu filho(a) neste projeto sua decisão não influenciará, de modo algum, o tratamento ou acompanhamento, atuais ou futuros de seu filho(a) na Instituição.

Você pode retirar este consentimento a qualquer momento, de modo que as informações fornecidas, assim como as amostras biológicas fornecidas, não serão mais utilizadas no presente projeto e serão descartadas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você receberá uma cópia deste documento e o original permanecerá arquivado. Somente assine este Termo se você compreendeu as informações contidas nele. Caso você tenha questões a fazer ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, você pode entrar em contato com a Dra. Adriana Scheliga, Coordenadora da Comissão de Ética e Pesquisa do INCA, pelo telefone (21) 3233-1353, ou com Dr Héctor N. Seuanez Abreu Coordenador do Projeto, pelo telefone (21) 3233 1469


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que meu filho(a) será submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais ele(a) poderia ser submetido, todos acima listados.

Opto em autorizar participação de meu filho(a) no projeto de pesquisa proposto fornecendo autorização para uso de

- () dados obtidos a partir da história médica e familiar de meu filho(a) que poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;

Assinatura do Responsável

Nome do Responsável

Local e Data

- () uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) de meu filho(a) para extração de ácidos nucléicos e armazenamento na Instituição que será utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto,

Assinatura do Responsável

Nome do Responsável

Local e Data

- () amostras do tumor, e/ou tecido normal próximo, de meu filho(a), que já tiverem sido retiradas por cirurgia.

Assinatura do Responsável

Nome do Responsável

Local e Data


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



Adicionalmente, declaro:

1. Ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.
 2. Estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.
 3. Ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.
 4. Ter sido esclarecido sobre a segurança de que a minha identidade e a de meu filho(a) serão preservadas e que todas as informações fornecidas por mim e meu filho(a) serão confidenciais.
 6. Que autorizo o armazenamento da amostra de DNA do meu filho(a), obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização na investigação de síndromes hereditárias do câncer.
 7. Que, em caso do desenvolvimento de novas pesquisas na área de câncer hereditário, desejo ser contatado e informado acerca destas pesquisas.
 8. Que, caso sejam propostos novos projetos de pesquisa sobre câncer familiar, entendo que informações sobre meu filho(a) e minha pessoa/família e o material biológico de meu filho(a) somente poderão ser utilizados se eu assinar novo consentimento para o estudo específico
 9. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível. Os resultados das análises de dados clínicos e sobre testes de DNA serão disponibilizados em forma publicação científica, de modo a garantir o sigilo de identidade de meu filho(a). Os dados sobre testes de DNA serão informados a mim e/ou a um familiar por mim indicado se eu assim o quiser.
 10. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.
 11. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo Telefone () _____.
- Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do pesquisador

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em autorizar a participação de meu filho(a) neste projeto de pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome do Paciente menor de 18 anos

Assinatura do Responsável

Nome do Responsável

Local e Data

RG ou CPF do Responsável


 Dra. Adriana Scheliga
 Coordenadora
 Comitê de Ética em Pesquisa
 CEP-INCA

Anexo 3 – Termo de consentimento livre e esclarecido para familiares de pacientes



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Para familiares maiores de 18 anos de pacientes)

Projeto de Pesquisa: Caracterização clínica e molecular do câncer hereditário: Rede Nacional de Câncer Familiar

Nome de Voluntário: _____

Você está sendo convidado(a) pelos médicos e pesquisadores do **INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA)** e de outras Instituições de diferentes Estados do país que tratam de pacientes com câncer a participar de um projeto colaborativo, com apoio do Ministério da Saúde e CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico).

OBJETIVOS DO ESTUDO

Este projeto de pesquisa pretende reunir informações sobre indivíduos e famílias que têm certos tipos de câncer com características hereditárias. Estes tumores ocorrem em pessoas que apresentam um risco maior de desenvolver câncer devido à presença de fatores genéticos transmitidos de geração em geração. As informações obtidas poderão ajudar a compreender melhor este conjunto de doenças, e definir:

- 1- Procedimentos para identificar indivíduos com maior risco de desenvolver tumores;
- 2- Estratégias para identificar precocemente tumores hereditários;
- 3- Procedimentos para estimular a prevenção do câncer em indivíduos em risco;
- 4- Quais são as alterações genéticas que causam tumores hereditários.

Para atingir estes objetivos, estamos convidando-o (a) a participar de forma voluntária neste projeto de pesquisa.

Ao participar deste projeto e após assinar este termo de consentimento livre e esclarecido, serão solicitadas informações sobre a sua história médica e sobre a sua história familiar de câncer. É possível que sejam solicitadas informações adicionais sobre sua família e outros familiares afetados por câncer. Neste caso, será solicitado que você forneça as informações e/ou faça contato com seus familiares e/ou solicite que os mesmos entrem em contato com a equipe de pesquisa. Por fim, ao participar desse projeto de pesquisa você deverá consentir com uma ou mais das seguintes opções de participação:

- a) os dados obtidos a partir da sua história médica e familiar poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;
- b) uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) será


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



coletada para extração de ácidos nucleicos e armazenamento na Instituição sendo utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto, e

De acordo as opções de participação no projeto escolhidas por você as informações fornecidas e/ou as amostras armazenadas serão utilizadas em estudos futuros para:

- a) identificar e caracterizar características individuais e familiares do câncer hereditário;
- b) identificar e caracterizar as alterações genéticas que podem estar relacionadas ao tipo de tumor diagnosticado.

Se estudos adicionais, não previstos inicialmente forem propostos, você será chamado (a), informado(a) da possibilidade de participar do estudo e convidado(a) novamente a participar. Dados e materiais biológicos fornecidos somente poderão ser utilizados para estes projetos complementares se isso for autorizado por você.

MÉTODOS ALTERNATIVOS

Você pode optar por uma das alternativas acima para sua participação neste estudo. Não existem outras alternativas para sua participação no estudo, e caso não concorde com nenhuma das alternativas você pode optar por não participar do estudo.

RISCOS

A coleta de sangue (equivalente a duas colheres de sopa) para isolamento de ácidos nucleicos será feita por punção venosa pode resultar em dor no local da punção ou manchas rochas transitórias chamadas de equimoses.

BENEFÍCIOS

A análise das informações e o material biológico coletado podem não trazer um benefício direto a você. As informações coletadas a respeito do seu tumor e sua história familiar de câncer poderão ajudar a compreender melhor esta doença em sua família. As informações coletadas também ajudarão a compreender os diferentes tipos de tumores hereditários que ocorrem no Brasil.

ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS

Todo seu acompanhamento, para fins deste estudo, será feito pelos médicos pesquisadores Fernando Regla Vargas ou José Cláudio Casali da Rocha, pesquisadores vinculados a este projeto.

CARÁTER CONFIDENCIAL DOS REGISTROS

Suas informações serão mantidas sob sigilo, sendo utilizadas apenas pelos pesquisadores participantes do projeto. O material armazenado será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. As informações fornecidas sobre seu histórico pessoal e seu histórico familiar serão utilizadas apenas para publicações científicas ou com fins educacionais, mas sua identidade e seus dados pessoais permanecerão confidenciais, sendo tomados todos os cuidados para manter a sua privacidade.


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



TRATAMENTO MÉDICO EM CASO DE DANOS

Todo e qualquer dano decorrente do desenvolvimento deste projeto de pesquisa, e que necessite de atendimento médico, ficará a cargo da instituição. O seu tratamento e o acompanhamento médico independem de sua participação neste estudo.

CUSTOS

Se você concordar em fornecer as informações e/ou material biológico mencionados acima, desejamos esclarecer que você não receberá quaisquer benefícios financeiros por sua participação neste estudo.

BASES DA PARTICIPAÇÃO

Sua participação neste projeto é voluntária. Se você não concordar em participar deste projeto sua decisão não influenciará, de modo algum, o seu tratamento ou acompanhamento, atuais ou futuros, na Instituição.

Você pode retirar seu consentimento a qualquer momento, de modo que as informações fornecidas, assim como a amostras biológica fornecida, não serão mais utilizadas no presente projeto e serão descartadas.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

Você receberá uma cópia deste documento e o original permanecerá arquivado. Somente assine este Termo se você compreendeu as informações contidas nele. Caso você tenha questões a fazer ou alguma dúvida que não tenha sido esclarecida, você pode entrar em contato com a **Dra. Adriana Scheliga, Coordenadora da Comissão de Ética e Pesquisa do INCA, pelo telefone (21) 3233-1353**, ou com **Dr Héctor N. Seuanez Abreu Coordenador do Projeto, pelo telefone (21) 3233 1469**


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO

Pelo presente Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, declaro que fui informado (a), de forma clara e detalhada, livre de qualquer forma de constrangimento e coerção, dos objetivos, da justificativa, dos procedimentos que serei submetido, dos riscos, desconfortos e benefícios do presente Projeto de Pesquisa, assim como dos procedimentos alternativos aos quais poderia ser submetido, todos acima listados.

Opto em participar do projeto de pesquisa proposto fornecendo autorização para uso de:

- () dados obtidos a partir de minha história médica e familiar que poderão ser armazenados em um banco de dados e utilizados posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto;

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data

- () uma amostra de sangue (10 mL, o equivalente a duas colheres de sopa) para extração de ácidos nucleicos e armazenamento na Instituição que será utilizada posteriormente para o desenvolvimento do presente projeto,

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data


Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA



Adicionalmente, declaro:

1. Ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.
2. Estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.
3. Ter sido esclarecido que não receberei nenhuma remuneração financeira.
4. Ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.
5. Que autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização na investigação de síndromes hereditárias do câncer.
6. Que, em caso do desenvolvimento de novas pesquisas na área de câncer hereditário, desejo ser contatado e informado acerca destas pesquisas.
7. Que, caso sejam propostos novos projetos de pesquisa sobre câncer familiar, entendo que informações sobre minha pessoa/família e meu material biológico somente poderão ser utilizados se eu assinar novo consentimento para o estudo específico.
8. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível. Os resultados das análises de dados clínicos e sobre testes de DNA serão disponibilizados em forma publicação científica, de modo a garantir o sigilo sobre minha identidade. Os dados sobre testes de DNA serão informados a mim e/ou a um familiar por mim indicado se eu assim o quiser.
9. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.
10. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. _____ a recebê-lo Telefone () _____.

Eu expliquei a _____ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

Assinatura do pesquisador

Nome por extenso

Local e Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento e concordo em participar da pesquisa. Eu entendo a informação fornecida por este documento e tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer minhas dúvidas sobre a pesquisa.

Nome do Participante

Assinatura do Participante

Local e Data

RG ou CPF do Participante

Dra. Adriana Scheliga
Coordenadora
Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

Anexo 4 – Carta de aprovação do projeto pelo comitê de ética



Memo 003/08-CEP-INCA

Rio de Janeiro, 10 de janeiro de 2008

A(o): A(o): Dr. Héctor N. Seuanez Abreu
Pesquisador(a) Principal

Registro CEP nº 114/07 (Este nº. deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)
Título do Projeto: "Implementação de rede nacional de câncer familiar"

Prezado Pesquisador,

O Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer após re-análise **aprovou** o Protocolo intitulado: Implementação de rede nacional de câncer familiar bem como seus **Termos de Consentimento Livre e Esclarecido (versão 1 de 04/01/2008)**, em 10 de janeiro de 2008.

Ressaltamos que conforme descrito na folha de rosto (item 49), o pesquisador responsável deverá apresentar relatórios semestrais a respeito do seu protocolo que estão previstos para as seguintes datas: julho/2008 e janeiro/2008.

Estamos encaminhando a documentação pertinente para a CONEP com vistas a registro e arquivamento.

Atenciosamente

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'C. H. D. Silva', is written over a faint circular stamp or watermark.

Dr. Carlos Henrique D. Silva
Coordenador Substituto do Comitê de Ética em Pesquisa
CEP-INCA

GRIN2A	chr16	9847226	4791	4624	96.51%	195	101	147.81	160
MSH6	chr2	48010237	4283	3923	91.59%	56	106	146.14	160
HRAS	chr11	532206	780	763	97.82%	15	119	142.87	160
IDH1	chr2	209100944	1405	1352	96.23%	38	106	146.68	160
IDH2	chr15	90627207	1579	1501	95.06%	26	101	135.69	159
IGF2R	chr6	160412200	8436	8018	95.05%	131	100	146.45	160
IL7R	chr5	35856963	1544	1535	99.42%	28	100	142.46	160
JAK2	chr9	4985241	3859	3745	97.05%	86	100	142.59	160
JAK3	chr19	17935569	3984	3848	96.59%	71	100	142.89	160
KDR	chr4	55944392	4671	4556	97.54%	94	101	145.13	160
KIT	chr4	55524137	3354	3249	96.87%	78	102	144.74	160
KRAS	chr12	25358270	787	775	98.48%	67	101	145.03	160
SMAD2	chr18	45359406	1604	1593	99.31%	143	102	146.07	160
SMAD4	chr18	48556530	1879	1792	95.37%	115	102	147.30	160
MEN1	chr11	64570979	2028	1995	98.37%	48	106	145.21	160
MET	chr7	116312364	4704	4598	97.75%	99	103	145.82	160
MLH1	chr3	37034832	2651	2553	96.3%	49	102	145.08	160
MPL	chr1	43803441	2148	2020	94.04%	46	100	138.85	160
ABCC1	chr16	16101617	5266	4985	94.66%	93	100	143.87	160
MSH2	chr2	47630209	3277	2947	89.93%	50	103	147.92	160
MYD88	chr3	38179931	1054	1038	98.48%	37	115	147.14	160
NF1	chr17	29421917	9900	9465	95.61%	210	103	146.67	160
NF2	chr22	29999496	2164	2127	98.29%	84	102	147.14	160
NOS1	chr12	117645942	5072	4945	97.5%	161	100	144.93	160
NOTCH1	chr9	139388867	8348	8168	97.84%	140	100	141.26	160
NOTCH2	chr1	120454200	8149	8017	98.38%	171	100	146.49	160
NPM1	chr5	170814662	1134	1121	98.85%	32	107	142.94	160
NRAS	chr1	115247116	650	644	99.08%	60	102	147.60	160
NTN3	chr16	2521491	1863	1378	73.97%	23	102	135.48	160
PAX5	chr9	36838484	1547	1346	87.01%	52	107	145.71	160
PDGFRA	chr4	55095269	3831	3623	94.57%	95	108	147.82	160
PDGFRB	chr5	149493401	3761	3641	96.81%	81	106	145.91	160
PIK3C2A	chr11	17108056	5701	5287	92.74%	119	100	142.63	160
PIK3CA	chr3	178866382	3607	3342	92.65%	58	100	142.47	160
PIK3R1	chr5	67511661	2637	2561	97.12%	102	100	146.50	160
PPP2R1A	chr19	52693045	2070	1980	95.65%	37	102	139.68	160
PRKAR1A	chr17	66508087	1407	1314	93.39%	63	101	144.19	160
PRKCE	chr2	45879042	2588	2406	92.97%	72	100	145.19	160
MAP2K1	chr15	66679193	1436	1348	93.87%	37	103	144.70	160
PTCH1	chr9	98205263	5045	4860	96.33%	130	100	143.98	160
PTEN	chr10	89623335	1392	1232	88.51%	74	100	147.16	160
PTGS2	chr1	186640963	2015	1947	96.63%	54	102	148.13	160
PTPN11	chr12	112856484	2086	1998	95.78%	84	109	148.01	160
PTPRC	chr1	198608136	4745	4183	88.16%	93	102	142.88	160
RB1	chr13	48877810	3327	2644	79.47%	65	104	142.89	160
RET	chr10	43572565	3777	3662	96.96%	91	103	142.95	160

ROS1	chr6	117609523	7904	7679	97.15%	119	101	145.17	160
MAP2K4	chr17	11924087	1502	1280	85.22%	52	106	145.17	160
SMARCA4	chr19	11091381	5761	5462	94.81%	87	100	140.00	160
SMARCB1	chr22	24129093	1392	1294	92.96%	27	101	143.85	159
SMO	chr7	128828726	2604	2318	89.02%	46	103	143.15	160
SRC	chr20	35973082	1831	1671	91.26%	60	102	144.00	160
STK11	chr19	1206244	2135	1866	87.4%	39	103	139.62	160
HNF1A	chr12	121416510	2423	2206	91.04%	49	107	144.76	160
TERT	chr5	1253280	3719	3509	94.35%	59	101	139.24	160
TGFBR2	chr3	30647976	1939	1926	99.33%	58	100	146.03	160
TNFAIP3	chr6	138188597	2533	2507	98.97%	60	113	148.97	160
TOP1	chr20	39657409	2797	2592	92.67%	61	101	143.67	160
TP53	chr17	7571703	1503	1413	94.01%	40	100	147.43	160
HSP90B1	chr12	104324174	2772	2644	95.38%	46	104	143.63	160
TSHR	chr14	81421833	2691	2547	94.65%	70	100	146.53	160
KDM6A	chrX	44732347	4962	4606	92.83%	87	100	145.26	160
VHL	chr3	10183318	702	640	91.17%	40	106	139.60	160
WT1	chr11	32409320	1784	1651	92.54%	48	105	140.77	160
XPO1	chr2	61705034	3746	3571	95.33%	72	101	143.17	160
ARID1A	chr1	27022533	7258	6717	92.55%	111	100	140.70	160
TRRAP	chr7	98478695	13095	12422	94.86%	194	103	145.22	160
SOCS1	chr16	11348393	656	540	82.32%	12	101	137.75	160
TNKS	chr8	9413389	4524	4279	94.58%	144	100	145.83	160
HDAC4	chr2	239969848	3844	3644	94.8%	123	102	141.72	160
AKT3	chr1	243651464	1764	1650	93.54%	101	104	148.35	160
POLR3A	chr10	79734886	4793	4607	96.12%	97	101	145.35	160
FKBP9	chr7	32996954	2119	1756	82.87%	43	100	144.91	160
PIK3R5	chr17	8782221	3003	2931	97.6%	66	103	143.58	160
SETD2	chr3	47057897	8252	7810	94.64%	115	108	146.70	160
TET2	chr4	106067021	6278	6241	99.41%	203	101	147.45	160
FBXW7	chr4	153242409	2898	2711	93.55%	67	101	144.64	160
CRLF2	chrX	1314867	912	880	96.49%	13	102	138.46	160
CDC73	chr1	193091081	1936	1714	88.53%	78	101	145.99	160
CARD11	chr7	2945694	4020	3880	96.52%	68	100	144.51	160
AMER1	chrX	63404989	3506	3506	100%	102	104	149.63	160
ASXL1	chr20	30946066	4912	4782	97.35%	95	101	147.20	160

Anexo 6 – Protocolo de preparo das bibliotecas para sequenciamento de nova geração

Os reagentes utilizados nas 3 etapas são do fabricante Illumina®

Etapa 1: Reparo das pontas

1. Diluir 500 ng de DNA de cada PCR em tampão EB, com volume final de 60 µl para cada amostra.
2. Adicionar 40 µl de *End Repair Mix* à cada amostra e homogeneizar.
3. Incubar as amostras a 30°C por 30 min;
4. Vortexar as *AMPure XP beads* até que estejam bem dispersas, e adicionar 160 µl a cada amostra e homogeneizar;
5. Incubar as amostras por 15 min em temperatura ambiente;
6. Colocar as amostras em uma estante magnética em temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos, até o líquido ficar claro;
7. Descartar 127,5 µl do sobrenadante de cada amostra, com cuidado para não desfazer as *beads*.
8. Sem retirar a placa da estante magnética, adicionar 200 µl de etanol 80% a cada amostra sem desfazer as *beads*.
9. Incubar a placa em temperatura ambiente por pelo menos 30 segundos, e então remover e descartar todo o sobrenadante de cada amostra, com cuidado para não desfazer as *beads*.
10. Repetir os últimos dois passos para um total de duas lavagens com etanol 80%;
11. Deixar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos para secar e depois remover a placa da estante magnética;
12. Ressuspender e homogeneizar a *bead* seca em 20 µl de *Resuspension Buffer*.
13. Incubar em temperatura ambiente por 2 minutos;
14. Colocar a placa em uma estante magnética em temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos, até o líquido ficar claro;
15. Transferir 17,5 µl do sobrenadante para um novo poço.
16. Nesse ponto, o protocolo pode ser parado. Nesse caso, guardar as amostras entre -15° e -25°C por até sete dias.

Etapa 2: Ligação dos adaptadores

1. Adicionar 12,5 µl de *A-tailing Mix* a cada amostra.

2. Levar ao termociclador, usando o seguinte programa: "37°C por 30 min + 70°C por 5 min + 4° ∞".
3. Adicionar 2,5 µl de *DNA Ligase Mix* a cada amostra.
4. Adicionar 2,5 µl de *Resuspension Buffer* a cada amostra.
5. Adicionar 2,5 µl de um *RNA Adapter Index* diferente a cada amostra. Homogeneizar bem.
6. Incubar as amostras a 30°C por 10 min.
7. Adicionar 5 µl de *Stop Ligase Mix* a cada poço.
8. Vortexar as *AMPure XP Beads* até que estejam bem dispersas, e então adicionar 42 µl a cada poço. Homogeneizar bem.
9. Incubar a placa em temperatura ambiente por 15 minutos.
10. Colocar a placa na estante magnética e deixar à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos, até o líquido ficar claro.
11. Remover e descartar 79,5 µl de sobrenadante de cada poço, com cuidado para não desfazer as *beads*.
12. Ainda com a placa na estante magnética, adicionar 200 µl de etanol 80% a cada poço sem desfazer as *beads*.
13. Incubar a placa por pelo menos 30 segundos, e então remover e descartar todo o sobrenadante de cada poço. Repetir a lavagem com etanol 80% para completar duas lavagens.
14. Deixar a placa em temperatura ambiente por 5 minutos para secar e só então removê-la da estante magnética.
15. Homogeneizar a *bead* seca em 52,5 µl de *Resuspension Buffer*.
16. Incubar a placa em temperatura ambiente por 2 minutos.
17. Colocar a placa na estante magnética à temperatura ambiente por pelo menos 5 minutos, até o líquido aparecer claro.
18. Transferir 50 µl do sobrenadante claro para um novo poço da placa.
19. Vortexar as *AMPure XP Beads* até que fiquem bem dispersas, e então adicionar 50µl das *beads* em cada amostra. Pipetar o volume todo 10 vezes para misturar bem.
20. Incubar a placa por 15 minutos à temperatura ambiente.
21. Colocar a placa na estante magnética à temperatura ambiente por 5 minutos, até o líquido ficar claro.
22. Remover e descartar 95 µl de cada amostra, com cuidado para não desfazer as *beads*.
23. Com a placa ainda na estante magnética, adicionar 200 µl de etanol 80%. Manter a placa em temperatura ambiente por 30 segundos.
24. Repetir a lavagem com etanol para um total de duas lavagens.

25. Manter a placa em temperatura ambiente por 15 minutos para secar, e então removê-la da estante magnética.
26. Ressuspender o pellet seco em 22,5 µl de *Ressuspension Buffer*.
27. Incubar a placa em temperatura ambiente por 2 minutos.
28. Posicionar a placa na estante magnética por pelo menos 5 minutos, até o líquido ficar claro.
29. Transferir 20 µl do sobrenadante contendo as bibliotecas para um novo poço.

Etapa 3: Enriquecimento dos fragmentos de DNA

1. Adicionar 5 µl de *PCR Primer Cocktail* a cada amostra.
2. Adicionar 25 µl de *PCR Master Mix* a cada amostra.
3. Levar termociclador, usando o seguinte programa: 98°C por 30 segundos; 15 ciclos de: 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; 72°C por 5 minutos, 4°C até a retirada da máquina.
4. Vortexar as *AMPure XP Beads* até que estejam bem dispersas, e então adicionar 50 µl a cada amostra, misturando bem.
5. Manter em temperatura ambiente por 15 minutos
6. Posicionar a placa na estante magnética por 5 minutos, até o líquido ficar claro.
7. Remover e descartar 95 µl do sobrenadante de cada poço, com cuidado para não desfazer as *beads*.
8. Sem mover a placa da estante magnética, adicionar 200 µl de etanol 80% a cada poço, sem desfazer as *beads*.
9. Manter a placa em temperatura ambiente por 30 segundos, e então remover e descartar o sobrenadante.
10. Repetir a lavagem com etanol 80% para um total de duas lavagens.
11. Manter a placa em temperatura ambiente por 15 minutos para secar, e só então removê-la da estante magnética.
12. Ressuspender o *pellet* seco em 32,5 µl de *Resuspension Buffer*.
13. Incubar a placa em temperatura ambiente por 2 minutos.
14. Posicionar a placa na estante magnética por 5 minutos, até o líquido ficar claro.
15. Transferir 30 µl do sobrenadante para um novo poço.
16. Armazenar a -20°C até o uso.

Anexo 7 – Histopatologia dos tumores dos 58 probandos com suspeita clínica da SLF/LFL

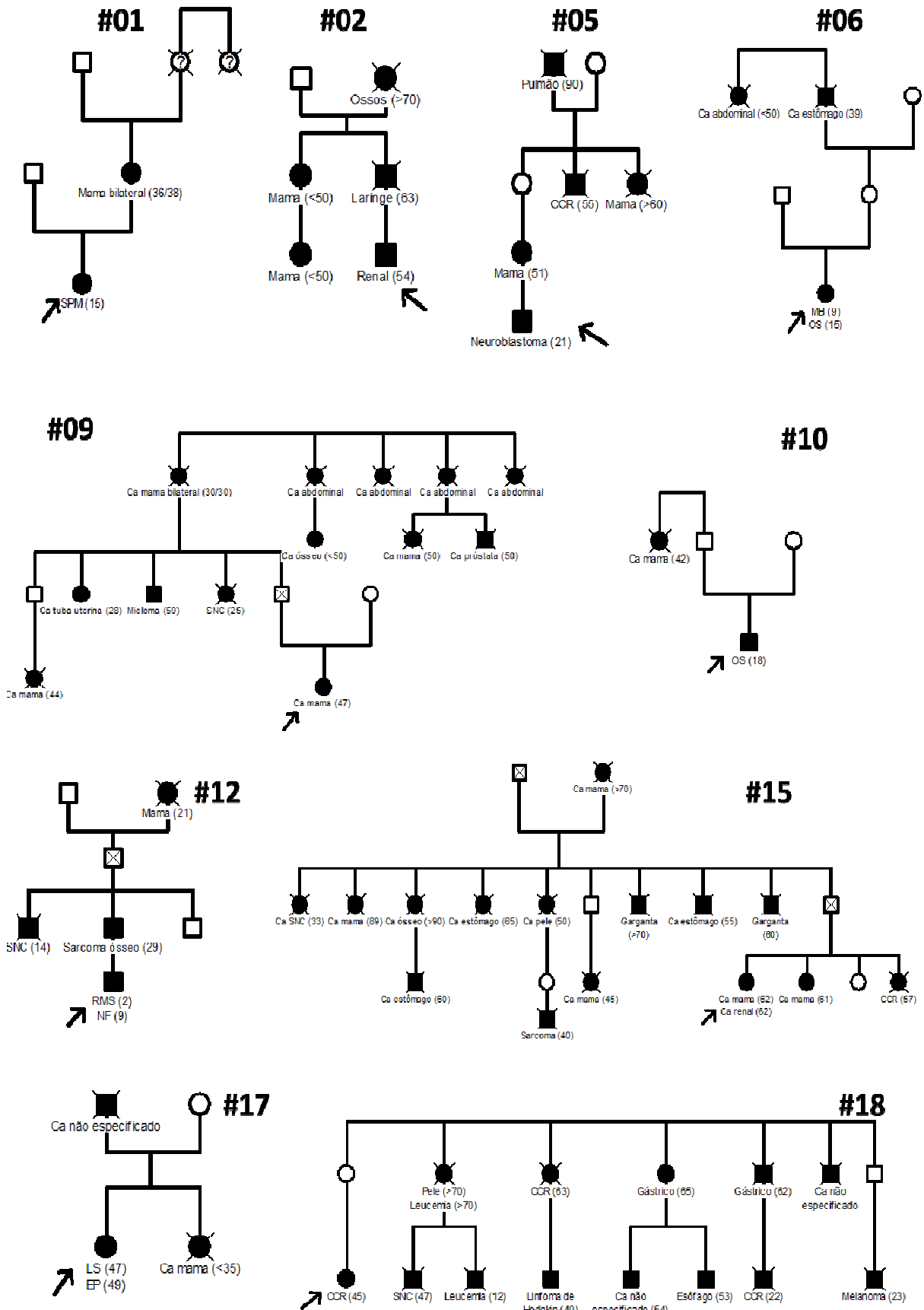
Probando	Tumor(es)	Histopatologia
LF01	Sarcoma de partes moles	Sinoviosarcoma monofásico; não metastático. Imunohistoquímica: Vimentina, EMA, bcl2 e CD99 positivos; CK7 e S100: parcialmente positivos.
LF02	Câncer renal	Carcinoma de células renais tipo células claras; grau nuclear 2 (Fuhrman); pT3a pNx pMx.
LF03	Câncer renal	Carcinoma de células renais tipo cromofobo; grau nuclear 4 (Furhmann); pT3 Nx Mx.
LF05	Neuroblastoma	Neuroblastoma pouco diferenciado, metastático. Imunohistoquímica: NB84 e sinaptofisina – positivos; CD99 – negativo.
LF06	Sistema nervoso central	Meduloblastoma.
	Sarcoma ósseo	Osteosarcoma; grau Huvos III, não metastático.
LF07	Sarcoma de partes moles	Rabdomiossarcoma embrionário; metastático para medula óssea. Imunohistoquímica: vimentina, desmina e HHF35 – positivos; mioD1, S100, CD34 e isozima – negativos.
LF08	Sarcoma ósseo	Condrossarcoma mesenquimal polipóide; T2N0. Imunohistoquímica: AE1AE3, CK7, 34BE12, CD10, p63, CD45, CD20, CD3: negativo.
LF09	Câncer de mama	Carcinoma micropapilífero infiltrante; grau histológico II. Determinação de receptores hormonais: Estrogênio - positivo (++/3). Progesterona - positivo (++/3).
LF10	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma clássico; grau de Huvos II; metastático para pulmão.
LF11	Câncer hepático	Carcinoma hepatocelular variante fibrolamelar, moderadamente diferenciado; pT1 pNx pMx.
LF12	Sarcoma de partes moles	Rabdomiossarcoma embrionário com anaplasia difusa.
	Neurofibroma	Neurofibroma não plexiforme em espaço intercostal. Imunohistoquímica: CD34 e S100 - positivos. Desmina, caldesmon, miogenina e actina 1A4 - negativos.
LF14	Sarcoma de partes moles	Dermatofibrossarcoma protuberans; grau I.
LF15	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante.
	Câncer renal	Carcinoma de células renais, tipo células claras, grau I (Fuhrman), TNM - T1a.
LF17	Sarcoma de partes moles	Lipossarcoma, estadiamento IA.
	Sistema nervoso central	Glioma de baixo grau (ependimoma).
LF18	Câncer colorretal	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado reto-sigmóide tipo Bormmann II. TNM: pT4 N0 MX.
LF19	Sarcoma ósseo	Sarcoma de EWING/PNET. Imunohistoquímica: CD99 positivo. AE1/3, NB84, miogenina, LCA negativos.
LF20	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante; grau II (primeiro tumor) e grau III (recidiva). Receptores hormonais: Estrogênio – negativo; progesterona – negativo; HER2 negativo.
LF21	Sarcoma ósseo	Sarcoma de Ewing / PNET. Metástase torácica. Imunohistoquímica: CD99 – positivo.
LF22	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante; grau histológico II (Nottingham).

Probando	Tumor(es)	Histopatologia
		Receptores hormonais: Estrogênio – negativo; progesterona - negativo. HER2: negativo.
	Melanoma	Melanoma; nível de Clark 3.
LF23	Câncer colorretal	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado de reto sigmoidé; classificação de Mandard: grau 2; pT2 N0 Mx.
LF24	Câncer de laringe	Carcinoma epidermóide focalmente invasor.
LF25	Tumor adrenocortical	Carcinoma do córtex da adrenal. Imunohistoquímica: Inibina, Melan-A e sinaptofisina - positivos. AE1/AE3, calretinina e cromogranina - negativos.
LF26	Tumor de Wilms	Tumor de Wilms com anaplasia difusa; Estádio I (SIOP).
LF27	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma convencional. TNM: ypT2.
LF28	Sarcoma de partes moles	Rabdomiossarcoma pleomórfico. Imunohistoquímica: Desmina, Vimentina e HHF35 positivos.
LF29	Câncer de próstata	Carcinoma de próstata.
	Câncer colorretal	Adenocarcinoma de sigmóide distal.
	Câncer de pele (n=6)	Carcinoma de células basais (n=4); Carcinoma de células escamosas (n=2).
LF31	Sarcoma de partes moles	Fibrohistiocitoma plexiforme. Imunohistoquímica: CD68 e vimentina positivos. AE1/AE3, desmina e Proteína S100 negativos.
LF33	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante; grau II. Receptores hormonais: Estrogênio – negativo; progesterona - negativo.
	Sarcoma de partes moles	Dermatofibrossarcoma protuberans. Imunohistoquímica: CD34 e C-kit positivos. S100 – negativo.
LF35	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma.
LF36	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma; grau Huvos III.
LF38	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma telangectásico.
LF39	Sarcoma de partes moles	Rabdomiossarcoma.
LF41	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante; grau III.
LF45	Sistema nervoso central	Ependimoma; grau II.
LF46	Câncer de mama	Carcinoma intraductal ("in situ"); grau intermediário. Receptores hormonais: Estrogênio - positivo (++)/3); progesterona - positivo (++)/3).
LF47	Carcinoma hepático	Carcinoma hepatocelular típico.
LF48	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma clássico; grau Huvos II.
LF49	Linfoma	Linfoma não Hodgkin.
	Sarcoma ósseo (n=2)	Osteossarcoma de alto grau (dois diferentes tumores primários). Imunohistoquímica: Vimentina e CD99 – positivos; proteína S100 - focalmente positiva. AE1/AE3, LCA, actina 1A4, desmina - negativos.
	Sarcoma de partes moles	Leiomiossarcoma; grau II; metastático para fígado. Imunohistoquímica: Actina músculo liso (1a4), Caldesmom, Desmina, Vim e HHF35 positivos. Melan A, AE1/ AE3, CD99, S100 negativos.
	Melanoma	Melanoma; nível de Clark 2.
LF50	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma periosteal; grau de Huvos IV; metástase para intestino.
LF51	Sistema nervoso central	Oligodendroglioma; grau II.
LF52	Neuroblastoma	Neuroblastoma
LF53	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma central; grau Huvos III.
LF54	Leucemia	Leucemia linfoblástica aguda. Imunohistoquímica: positiva para

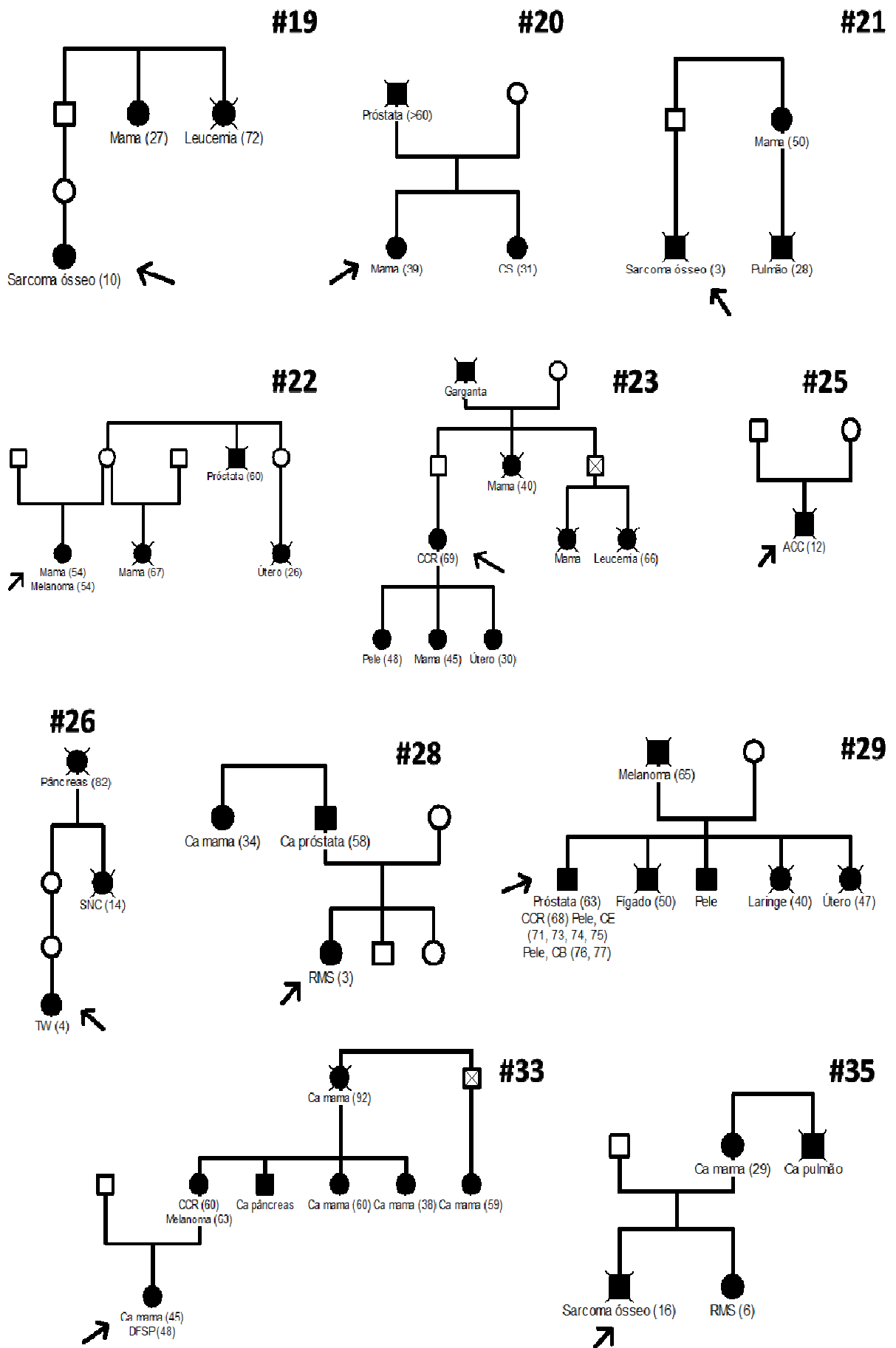
Probando	Tumor(es)	Histopatologia
		CD10 e CD99. Negatividade para CD20, PAX-5, CD79a, CD3, CD117, mieloperoxidase, TDT e CD68.
LF56	Sarcoma de partes moles	Sarcoma pleomórfico de alto grau.
LF57	Sarcoma de partes moles	Sinoviossarcoma monofásico. Imunohistoquímica: Vimentina, bcl2, EMA, CD56 e CD99 positivos. AE1/AE3, CK7, CK14, CD31, CD34, S100, HMB45, NSE, sinaptofisina, desmina, miogenina, HHF35, actina SR1 e actina 1a4 negativos.
LF58	CCR	Adenocarcinoma colorretal.
LF59	Linfoma	Linfoma de Hodgkin.
	Câncer de tireóide	Adenocarcinoma papilífero de tireóide.
	Câncer de mama	Carcinoma ductal infiltrante.
LF60	Neuroblastoma	Neuroblastoma metastático pouco diferenciado.
LF61	Câncer colorretal	Adenocarcinoma moderadamente diferenciado; pT4 pN0 pMx.
LF62	Tumor de Wilms	Tumor de Wilms, risco intermediário, tipo misto; estadio II (SIOP).
LF64	Câncer colorretal	Adenocarcinoma bem diferenciado com displasia de alto grau.
LF65	Sarcoma de partes moles	Rabdomiossarcoma. Imunohistoquímica: miogenina e desmina - positivos. CD99 e PLAP - negativos.
LF66	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma. Imunohistoquímica: Positividade para AE1/AE3, CK-8 e Vimentina.
LF67	Sarcoma de partes moles	Sinoviossarcoma bifásico. Imunohistoquímica: Positivo: AE-1/AE-3; EMA; CD-99; b-CL-2; Vimentina Negativo: CD-34.
LF68	Melanoma	Melanoma nodular metastático; nível de Clark 3.
LF69	Câncer colorretal	Adenocarcinoma retal moderadamente diferenciado. Presença de invasão neoplásica linfática. Classificação patológica: pT3 pN2b.
LF70	Sarcoma ósseo	Osteossarcoma osteoblástico (grau III de Huvos). Presença de infiltração de partes moles adjacentes.
LF71	Linfoma	Linfoma difuso de grandes células B. Imuno-histoquímica: CD20 e LCA positivos difusamente. CD30 com positividade fraca em raras células. Negativo para CD3, FALP, citoqueratina AE1/AE3 e CD99. Índice proliferativo pelo Ki-67= 50%.

Anexo 8 – Heredogramas dos 58 probandos incluídos no estudo

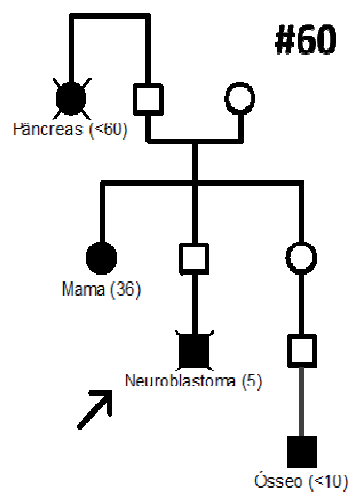
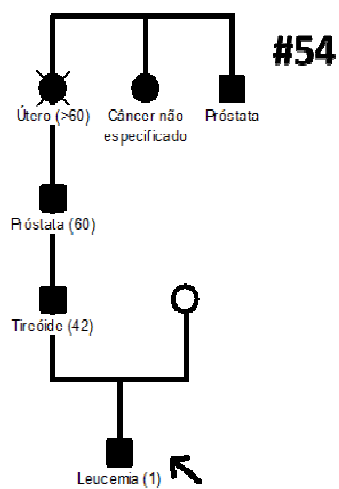
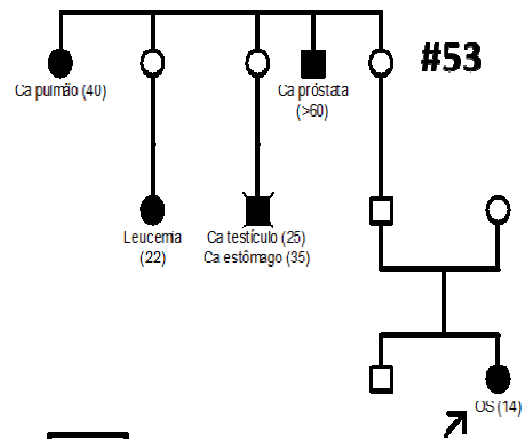
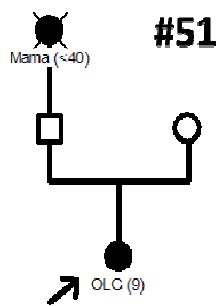
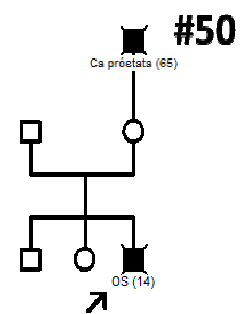
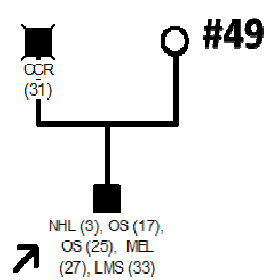
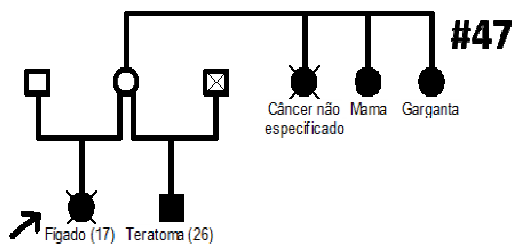
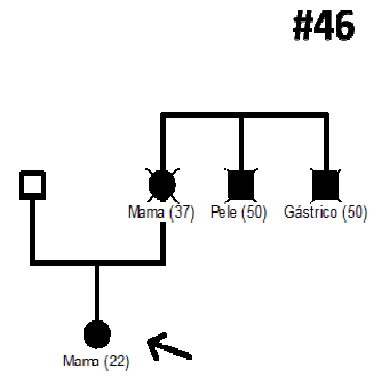
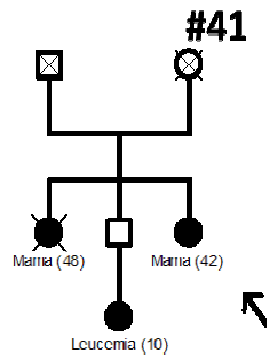
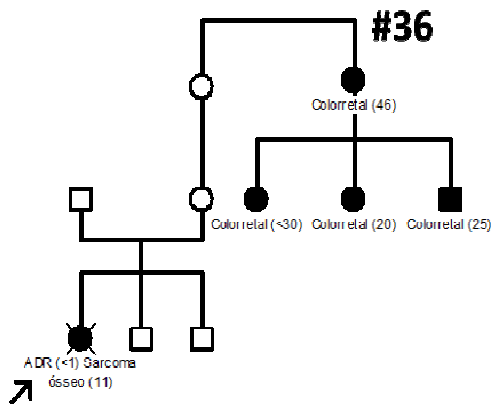
Grupo 1 (Probandos de famílias com critérios clínicos da SLF/LFL)



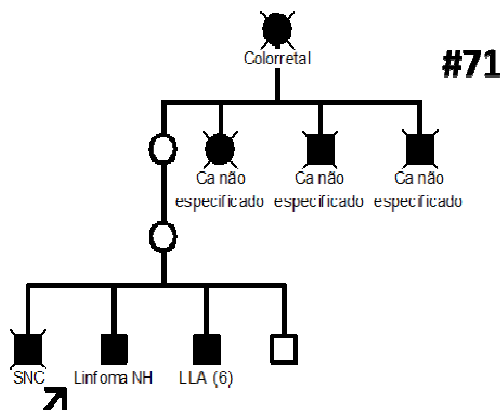
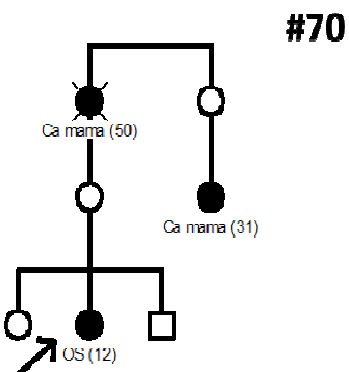
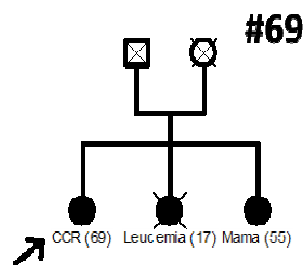
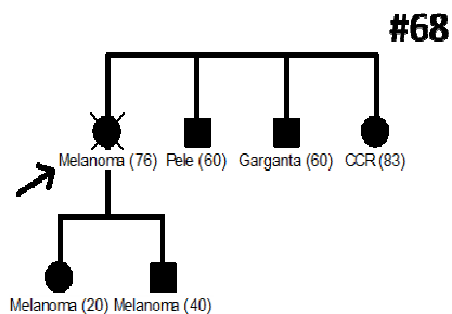
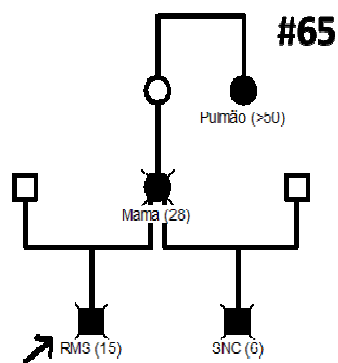
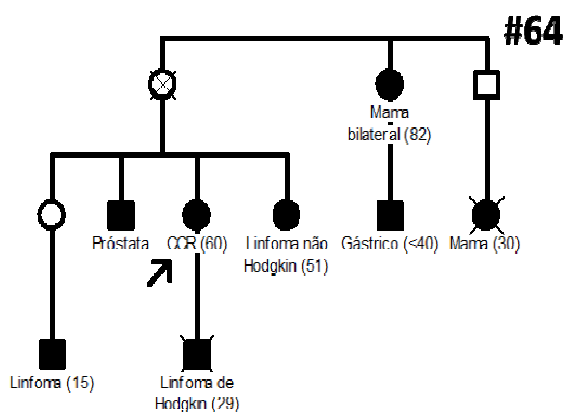
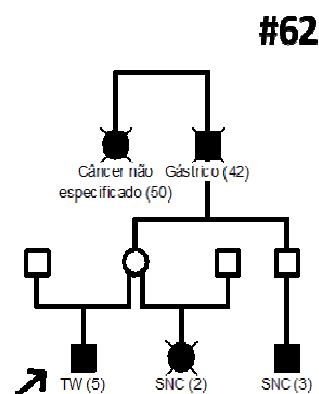
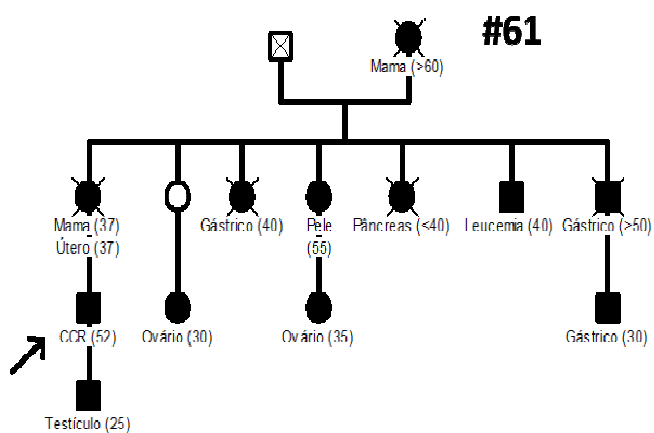
Ca: câncer; CCR: câncer colorretal; EP: ependimoma; LS: lipossarcoma; MB: meduloblastoma; NF: neurofibroma; OS: osteossarcoma; RMS: rabiomiossarcoma; SNC: sistema nervoso central; SPM: sarcoma de partes moles.



ACC: carcinoma adrenocortical; Ca: câncer; CB: carcinoma basocelular; CCR: câncer colorretal; CE: carcinoma espinocelular; CS: condrossarcoma; DFSP: dermatofibrossarcoma protuberans; RMS: rabdomiossarcoma; SNC: sistema nervoso central; TW: tumor de Wilms.

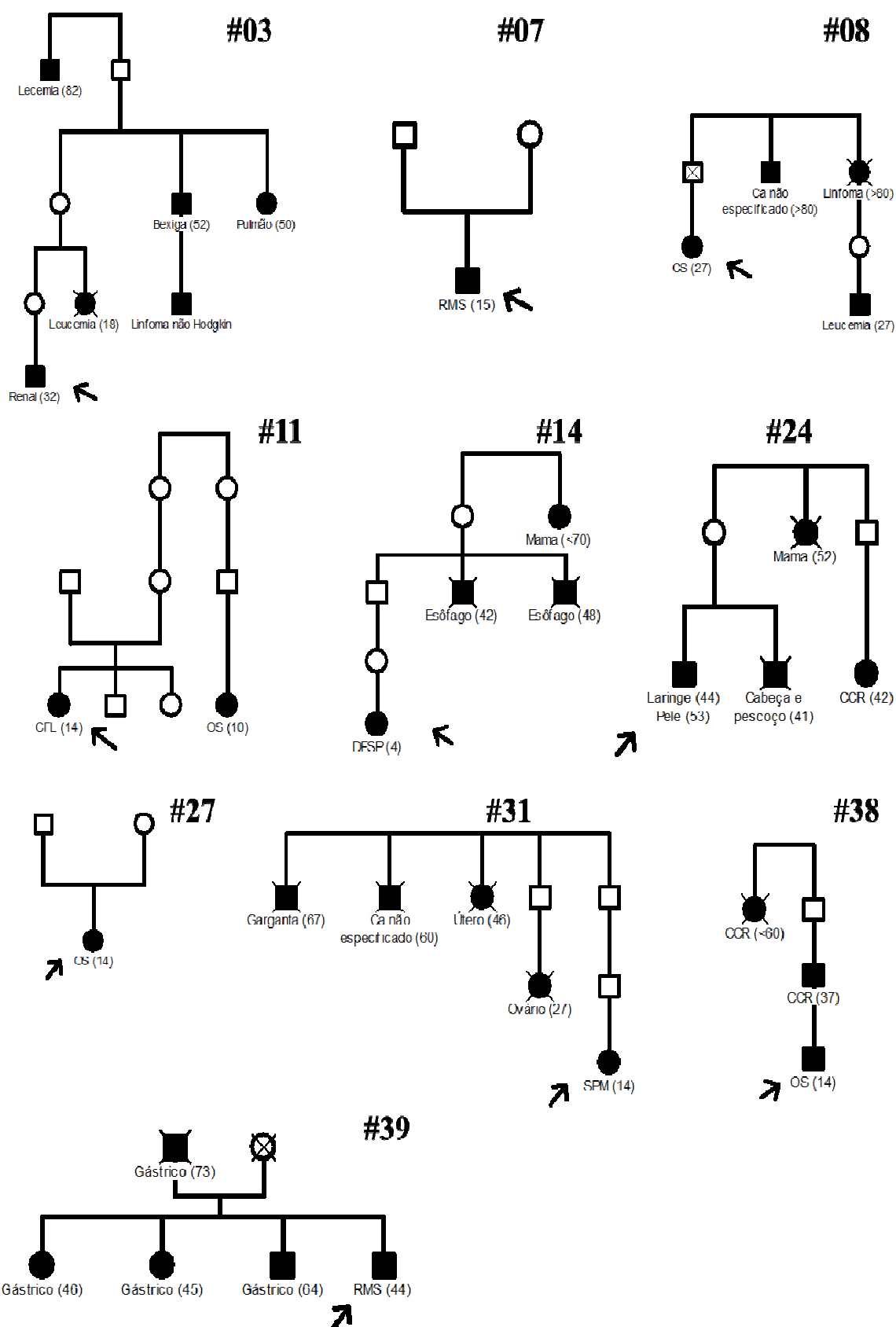


ADR: tumor adrenal; Ca: câncer; LMS: leiomiocarcinoma; LNH: linfoma não Hodgkin; MEL: melanoma; OLG: oligodendroglioma; OS: osteossarcoma.

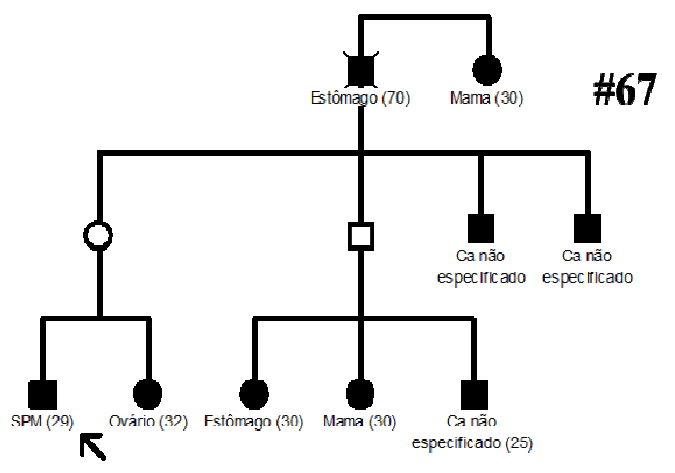
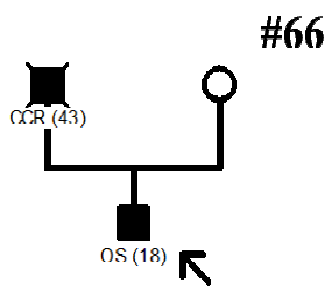
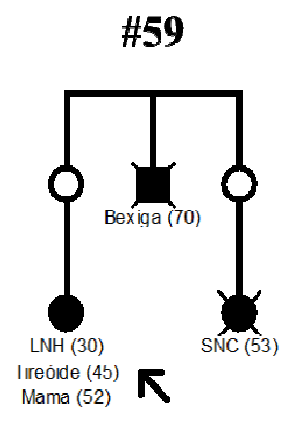
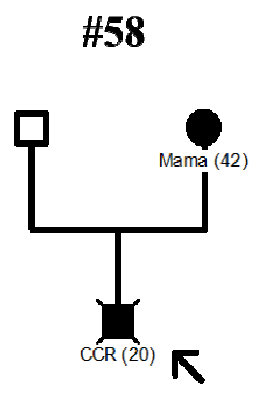
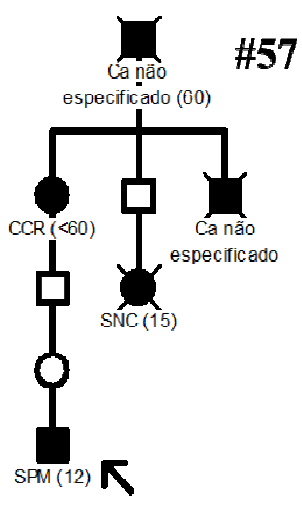
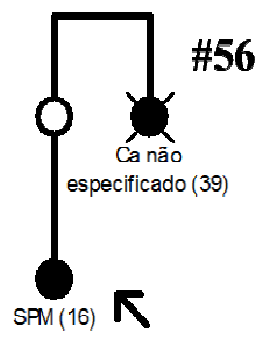
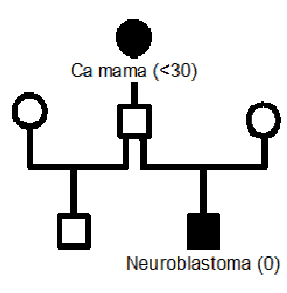
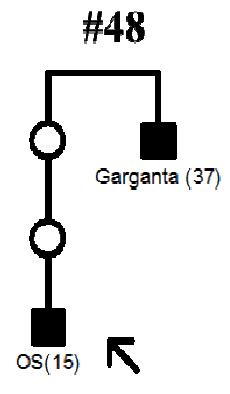
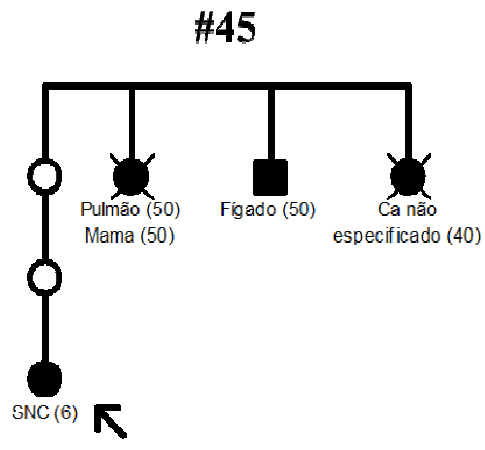


Ca: câncer; CCR: câncer colorretal; LLA: leucemia linfóide aguda; OS: osteossarcoma; RMS: rhabdomyosarcoma; SNC: sistema nervoso central; TW: tumor de Wilms.

Grupo 2 (Probandos LFL-suspeita)



Ca: câncer; CCR: câncer colorretal; CFL: carcinoma fibrolamelar; CS: condrossarcoma; DFSP: dermatofibrossarcoma protuberans; OS: osteossarcoma; RMS: rabdmiossarcoma; SNC: sistema nervoso central; SPM: sarcoma de partes moles.



Ca: câncer; CCR: câncer colorretal; LNH: linfoma não Hodgkin; OS: osteossarcoma; SNC: sistema nervoso central; SPM: sarcoma de partes moles.

Association of *TP53* Polymorphisms on the Risk of Wilms TumorR.C. Andrade, MSc,^{1,2} L.C.A. Cardoso, PhD,¹ S.E. Ferman, MD, PhD,³ P.S. Faria, MD, PhD,⁴ H.N. Seuánez, PhD,^{1,2}
M.I. Achatz, MD, PhD,⁵ and F.R. Vargas, MD, PhD^{1,2,6,7*}

Background. Molecular factors influencing Wilms tumor (WT) development remain largely unknown. *TP53* mutations seem to be restricted to the anaplastic WT subtype. However, *TP53* polymorphisms do not have a defined role in the disease. **Procedure.** To assess the impact of *TP53* mutations and polymorphisms (PIN2, PIN3, and PEX4) on risk of development, age at diagnosis, and survival in WT, we analyzed 46 blood DNA samples and 31 fresh tumor DNA samples from 52 patients with WT. Sequencing of *TP53* exons 2–11 was performed. **Results.** Tumor DNA analysis revealed *TP53* pathogenic missense mutations (p.V197M, p.R213Q, p.R248W, and p.R337C) in four samples (12.9%). Blood DNA samples revealed a novel intronic mutation, IVS2+37C>T, in one patient (2.2%). Bilaterality was associated with a twofold decrease in survival ($P=0.00037$). Diffuse anaplasia also presented a lower

survival probability compared to patients with non-anaplastic tumors, or with focal anaplasia ($P=0.045$). Patients with a *TP53* somatic mutation showed survival probability of 37.5% versus 85.0% for patients with no somatic mutations, although the difference was not statistically significant ($P=0.0706$). PIN3 duplicated allele was associated with a 20-month later mean age at diagnosis ($P=0.0084$). *TP53* PEX4 C allele showed an increased risk for WT development ($P=0.0379$). No relationship was found between survival and gender, age at diagnosis, or the less frequent alleles of PIN2, PIN3, and PEX4. **Conclusions.** Our results demonstrate an association between PIN3 and age at diagnosis, as well as an association of PEX4 and risk of development of WT. Pediatr Blood Cancer © 2013 Wiley Periodicals, Inc.

Key words: PEX4; PIN2; PIN3; *TP53*; Wilms tumor

INTRODUCTION

Wilms tumor (WT) is the most common renal tumor of childhood, affecting 1:10,000 children [1]. In Brazil, there are approximately 10 new cases per 10 million children younger than 14 years old per year [2], figuring as one of the highest incidences in the world [3]. Genetics of WT is complex, and although mutations in *WT1*, *WTX*, and *CTNNB1* have shown to be common events related to the disease, they occur in only one third of the cases [4]. The tumor suppressor *TP53* remains the most frequently mutated gene in human malignancies. Somatic mutations are found in up to 50% of cancers [5], and germline mutations predispose to various early-onset cancers, condition known as the Li–Fraumeni syndrome (LFS) [6]. Also, *TP53* polymorphisms have shown to play a role in cancer. Three polymorphisms are of special interest in *TP53*: PIN2 (polymorphism in intron 2, or rs1642785), a G>C substitution; PIN3 (polymorphism in intron 3, or rs17878362), a 16bp duplication; and PEX4 (polymorphism in exon 4, or rs1042522), a G>C transversion that leads to an arginine to proline substitution at codon 72. The three of them have been extensively studied and associated to risk of development of many cancers [7–12]. Although *TP53* mutations in patients with WT seem to be restricted to tumors of the anaplastic subtype [13–15], its polymorphisms do not have a defined role in the disease. Therefore, this study investigated the mutational spectrum of *TP53*, and assessed the frequency of PIN2, PIN3, and PEX4 polymorphisms, and their association with the risk of tumor development, age at diagnosis, and cumulative 60-month survival rate in patients with WT.

METHODS

Samples

Fifty-two patients with WT, diagnosed and treated at the Instituto Nacional de Câncer (INCA) between the years of 2000 and 2012, were included in this study. Parents were asked for the participation of their children during follow-up medical appointments. Because patients with bilateral and/or syndromic forms of WT are referred for genetic counseling clinic more often than

patients with unilateral and/or sporadic disease, our cohort had a high proportion of bilateral and syndromic cases. Clinical files were reviewed for information regarding gender, age at diagnosis, histopathology, and laterality. Peripheral blood DNA samples were available for 46 of the 52 patients, while fresh primary tumor DNA samples from 31 patients were available. The study obtained institutional review board approval prior to its start, and informed consent was obtained from affected individuals' parents. All patients received preoperative chemotherapy, according to the SIOF 2001 protocol implemented in our institution. Part of the clinical data presented here was previously published by our group [16].

TP53 Analysis

TP53 exons 2–11, including splice-site junctions, and the entirety of introns 2, 3, 5, and 8, were amplified and then sequenced with Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA), according to manufacturer's

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

¹Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ²Department of Genetics, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ³Pediatrics Oncology Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ⁴Pathology Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil; ⁵Department of Oncogenetics, Hospital AC Camargo, São Paulo, Brazil; ⁶Genetics and Molecular Biology Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil; ⁷Birth Defects Epidemiology Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Grant sponsor: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq); Grant numbers: 40196/2010-0; 476808/2010-3; 486599/2012-4; 135171/2010-5

Conflict of interest: None.

*Correspondence to: Fernando R. Vargas, Birth Defects Epidemiology Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil. E-mail: fvargas@inca.gov.br

Received 31 May 2013; Accepted 21 August 2013

© 2013 Wiley Periodicals, Inc.

DOI 10.1002/pbc.24775

Published online in Wiley Online Library
(wileyonlinelibrary.com).

protocol, using primer sequences described at the International Agency for Research on Cancer (IARC) *TP53* Database (<http://www-p53.iarc.fr>) [17] (Supplementary Material). Products were analyzed at an *ABI3130xl* platform (Applied Biosystems), and compared to the reference sequences obtained from NCBI (NG_017013.2; NP_000537.3).

Statistical Analysis

Molecular data concerning the polymorphisms were analyzed by chi-square and Fisher's exact test, using the website for statistical computation VassarStats (<http://vassarstats.net/>). Odds ratio was estimated to verify if the less frequent allele of each polymorphism was related to risk or protection in WT. Relation between the polymorphisms and laterality with age at diagnosis was assessed using the non-parametric Mann-Whitney test. To increase accuracy of this analysis, the two outliers observed in the sample were not considered (136 and 137 months). Clinical and molecular data were used to estimate the cumulative 60-month survival rates of the patients by the non-parametric Kaplan-Meier method. Survival curves were compared with the log-rank test using the *GraphPad Prism* software (www.graphpad.com/scientific-software/prism). Survival was estimated considering the time at hospital registration, corresponding to the beginning of the treatment, until last visit to the hospital. All statistical results were considered significant when $P < 0.05$.

RESULTS

Clinical Characterization

Clinical characteristics of the patients are summarized in Table I. The mean age at diagnosis for bilateral cases was 24 months (± 19), while mean age for unilateral cases was 38 months (± 20) ($P = 0.0563$). Syndromes or congenital anomalies presented in our cohort included Denys-Drash syndrome ($n = 4$), Beckwith-Wiedemann syndrome ($n = 2$), hemihypertrophy ($n = 1$), macrosomia ($n = 2$), WAGR syndrome ($n = 1$), Simpson-Golabi-Behmel

syndrome ($n = 1$), and one patient who presented Moebius syndrome associated with hemihypertrophy. Three of the 12 patients with syndromes/anomalies (25%) developed bilateral WT (one with Beckwith-Wiedemann syndrome and two patients with Denys-Drash syndrome). Histological data of the tumors were available for 49 patients, and 8/49 tumors presented focal or diffuse anaplasia (16.3%): 4/49 (8.2%) with focal anaplasia, and 4/49 (8.2%) with diffuse anaplasia.

TP53 Mutation Analysis

Five mutations were found in the analyzed samples (Table II). Among the 46 blood DNA samples, one constitutional mutation was present (2.2%). The novel intronic germline mutation IVS2 + 37 C > T (NG_017013.2: g.16067C > T) was found in homozygosity in patient P05 (Fig. 1). Among the 31 studied tumor DNA samples, 4 (12.9%) presented mutations, and 3 of these were tumors of the anaplastic subtype. Considering that seven of the eight anaplastic tumors were available for DNA analysis, a *TP53* mutation was observed in 3/7 (42.9%) of the studied anaplastic tumors. All tumor mutations were missense, and located between exons 6 and 10. Patients P16 and P17, in addition to carrying somatic missense mutations, also showed discordant genotypes between blood and tumor samples for polymorphisms PIN2 and PEX4, with loss of heterozygosity in tumor DNA. These results suggest the likely loss of one allele of *TP53* in tumor samples in these patients. According to the IARC *TP53* Database, the four observed missense mutations were previously described in both germline DNA from LFS patients, as well as in malignant tumors, being classified as pathogenic [17]. The germline mutation IVS2 + 37C > T was first identified in this study. None of the patients carrying mutations had clinical signs of congenital syndrome or anomaly, thereby being apparently sporadic WT cases.

PIN2, PIN3, and PEX4 Polymorphisms Analysis

Analysis of *TP53* polymorphisms PIN2, PIN3, and PEX4 was performed in available blood DNA samples from 46 patients with WT. Allele and genotype frequencies in patients were compared to a control group of 300 healthy adults from Brazil [18]. Intragroup genotype distributions were in Hardy-Weinberg equilibrium ($P > 0.05$), both in patients and controls. Chi-square test showed no statistically significant differences in intergroup genotype frequencies of PIN2, PIN3, and PEX4 between patients and controls ($P = 0.27$, $P = 0.91$, $P = 0.09$, respectively). For PIN2 and PEX4, the most prevalent genotype among patients was homozygous GG (Table III). For PIN3, the most common genotype was represented by two non-duplicated alleles (NN). For the odds ratio analysis, the most common genotype of each polymorphism in the control group was considered the reference genotype (i.e., GG for PIN2, NN for PIN3 and GG for PEX4). Likewise, the allele showing the higher frequency in each polymorphism in the control group was considered the reference allele. We found a significant risk associated with PEX4 CC genotype ($P = 0.0337$), and with PEX4 C allele in patients ($P = 0.0379$). The other analyses did not show statistical significance (Table III). Among the nine patients with PEX4 CC genotype, eight did not show tumor anaplasia, and from one patient the complete histopathological data were not available; this patient had bilateral WT and Denys-Drash syndrome and died before surgery. Also, no *TP53* mutation was observed among the nine PEX4 CC genotype patients.

TABLE I. Epidemiological, Clinical, and Histopathological Characteristics of 52 Patients With WT

Characteristics	N (%)
Gender	
Female	24 (46.2)
Male	28 (53.8)
Laterality	
Unilateral	41 (78.8)
Bilateral	11 (21.2)
Age at diagnosis (months)	
0-24	16 (30.8)
25-48	21 (40.4)
49 or +	15 (28.8)
Mean	39 \pm 28
Presence of tumor anaplasia ^a	
Focal anaplasia	4 (8.2)
Diffuse anaplasia	4 (8.2)
Associated syndromes/anomalies	12 (23.1)

^aHistological data were available for only 49 patients.

TABLE II. TP53 Mutational Spectrum Observed in 52 Patients With WT

Mutation	Patient	Age at diagnosis (months)	DNA		Tumor histology	Heterozygous	Location	Altered base/codon	Amino acid substitution	Mutation type
			Blood	Tumor						
IVS2 + 37C > T	P05	9	Yes	NA	Blastomatous	No	Intron 2	C > T	—	Intronic
p.V197M	P49	16	NA	Yes	Focal anaplasia	No	Exon 6	GTG > ATG	Val → Met	Missense
p.R213Q	P16	29	No	Yes	Diffuse anaplasia	No	Exon 6	CGA > CAA	Arg → Gln	Missense
p.R248W	P29	10	NA	Yes	Epithelial	No	Exon 7	CGG > TGG	Arg → Trp	Missense
p.R337C	P17	50	No	Yes	Focal anaplasia	No	Exon 10	CGC > TGC	Arg → Cys	Missense

NA, non-available.

We assessed the influence of the less frequent allele of PIN2, PIN3, and PEX4 in age at diagnosis in our patients. For each polymorphism, we compared the mean age at diagnosis (in months) between the group of patients with the more frequent genotype (reference genotype), and the group of patients carrying at least one copy of the less frequent allele. For PIN2 and PEX4, there were no statistically significant differences between mean age at diagnosis of carriers and non-carriers of the less frequent allele C ($P = 0.2774$ and $P = 0.0858$, respectively). For PIN3, however, carriers of at least one duplicated allele were diagnosed, on average, 20 months later than non-carriers, a statistically significant difference ($P = 0.0084$). The mean age at diagnosis for the non-duplicated homozygous patients (NN) was 30 months (± 20), while patients with heterozygous or homozygous duplication (ND or DD) had a mean age at diagnosis of 50 months (± 17) (Table IV). Also, we sought to investigate a potential association between the less frequent alleles of PIN2, PIN3, and PEX4 and a higher frequency of bilateral tumor cases, what was not observed (Fisher's exact test, $P = 1.000$; $P = 0.700$; $P = 0.488$, respectively).

Cumulative 60-Month Survival

To evaluate the impact of clinical, epidemiological and molecular data, we calculated the 60-month survival probability of patients according to the variables: laterality, gender, age at diagnosis, presence of tumor anaplasia, presence of TP53 somatic mutation, and PIN2, PIN3, and PEX4 genotypes. Overall survival ($n = 52$) was 80.8% (95% CI = 0.701 to 0.931). Bilaterality represented the highest difference in survival ($n = 52$; $P = 0.00037$) (Fig. 2A). Patients with unilateral disease showed a survival rate of 92.4% (95% CI = 0.845 to 1), while patients with bilateral tumors had an approximately twofold decrease in survival, 45.5% (95% CI = 0.238 to 0.868). When considering only patients with available tumor samples ($n = 31$), we observed that patients with no pathogenic somatic mutations in TP53 showed a survival probability of 85.0% (95% CI = 0.725 to 0.997), while patients with a TP53 somatic mutation showed survival probability of only 37.5% (95% CI = 0.084 to 1), a difference that did not show a statistical significance ($P = 0.0706$) (Fig. 2B). The presence of diffuse anaplasia was associated with an impact on survival probability, showing rates that tended to zero, versus the 86.7% and 100% survival probabilities for patients with non-anaplastic tumors and patients with tumors with focal anaplasia ($n = 49$; $P = 0.045$) (Fig. 2C). No association was observed between survival and gender ($n = 52$; $P = 0.15$), age at diagnosis ($n = 52$; $P = 0.818$), or the less frequent allele of PIN2, PIN3, and PEX4 ($n = 46$; $P = 0.342$; $P = 0.975$; and $P = 0.812$, respectively). Patients without any syndromes/anomalies showed a survival rate of 85.4% (95% CI = 0.742 to 0.982), while patients presenting such clinical signs showed a survival rate of 65.6% (95% CI = 0.432 to 0.997), a difference that tended towards statistical significance ($n = 52$; $P = 0.0551$) (Fig. 2D).

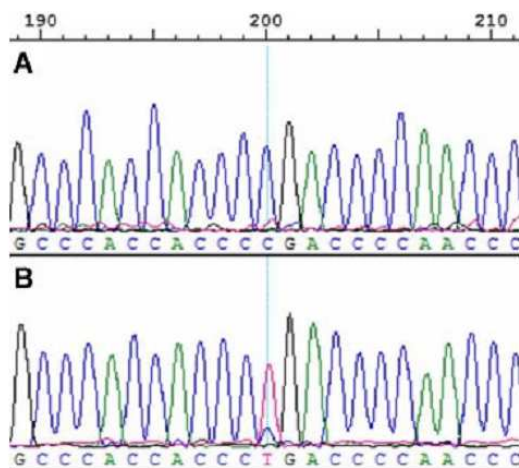


Fig. 1. Identification of the novel germline IVS2 + 37C > T mutation in intron 2 of the TP53 gene. A: Patient with wild-type sequence; (B) germline homozygosity for IVS2 + 37C > T in patient P05.

Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc

DISCUSSION

We investigated germline and somatic mutations, as well as polymorphisms in TP53 in 52 patients with WT, and the influence of genotype and clinical variables in their survival rates. One novel germline mutation was found in one patient, corresponding to 2.2% (1/46) of the available blood DNA samples. It is known that germline mutations in TP53 are more frequently related to soft tissue sarcomas, osteosarcomas, premenopausal breast cancer,

TABLE III. Distribution of Allele and Genotype Frequencies, and Odds Ratio Determined for Each *TP53* Polymorphism in Patients With WT and Controls

Polymorphism	Patients (%), N = 46	Controls (%), N = 300 ^a	OR (95% CI)	P (Fisher's exact test)
PIN2				
GG	27 (58.7)	166 (55.3)	1.00 (Reference)	—
GC	13 (28.3)	112 (37.3)	0.71 (0.35–1.44)	0.3901
CC	6 (13.0)	22 (7.3)	1.68 (0.62–4.51)	0.3915
Allele frequency G	67 (72.8)	444 (74.0)	1.00 (Reference)	—
Allele frequency C	25 (27.2)	156 (26.0)	1.06 (0.65–1.74)	0.8987
PIN3				
NN	33 (71.7)	222 (74.0)	1.00 (Reference)	—
ND	12 (26.1)	70 (23.3)	1.15 (0.57–2.35)	0.7103
DD	1 (2.2)	8 (2.7)	0.84 (0.10–6.94)	1.0000
Allele frequency N	78 (84.8)	514 (85.7)	1.00 (Reference)	—
Allele frequency D	14 (15.2)	86 (14.3)	1.07 (0.58–1.98)	0.8734
PEX4				
GG	19 (41.3)	158 (52.7)	1.00 (Reference)	—
GC	18 (39.1)	114 (38.0)	1.31 (0.66–2.61)	0.4809
CC	9 (19.6)	28 (9.3)	2.67 (1.10–6.50)	0.0337
Allele frequency G	56 (60.9)	430 (71.7)	1.00 (Reference)	—
Allele frequency C	36 (39.1)	170 (28.3)	1.63 (1.03–2.56)	0.0379

N, non-duplicated allele; D, duplicated allele. ^aControl group genotyped by Marcel et al. [18].

brain tumors, adrenocortical carcinoma and acute leukemias, the core tumors of the LFS [19]. Although WT has been reported as more frequent in families carrying *TP53* germline mutations [20], it is considered a rare component of this syndrome [21,22]. The novel intronic mutation IVS2 + 37C > T is located one nucleotide upstream of PIN2. According to the Human Splice Finder software (<http://www.umd.be/HSF>) [23], this substitution creates a new exonic splicing regulatory sequence, although *in vitro* studies would be necessary to characterize its impact on the protein. It is noteworthy, though, that the patient carrying the mutation died 28 months after diagnosis. Family history of cancer was negative. Parents were unavailable for molecular analysis. Pathogenic somatic mutations were found in four tumor DNA samples, and three of them were obtained from anaplastic areas. There is a clear relationship between *TP53* mutations and anaplastic WT, the histologic subtype with poorer prognosis. This indicates these mutations are related to tumor progression, and associated with a more aggressive type of the disease [13–15]. Our patients were

treated with preoperative chemotherapy according to the SIOP 2001 protocol. However, we could not find evidence that somatic or germline mutations within *TP53* gene could be influenced by this treatment modality. Interestingly, one study used comparative genomic hybridization to search for chromosomal rearrangements in tumor samples of 41 patients with WT, of whom 19 had received preoperative chemotherapy, and observed fewer chromosomal rearrangements in the group that received this modality of therapy [24].

Besides pathogenic mutations, *TP53* polymorphisms may also be sufficient to alter the expression or activity of the protein [5,25], emphasizing the importance of investigating *TP53* polymorphisms as possible risk factors, or phenotype modifiers in cancer. PIN3 duplicated allele was a modifier of age at diagnosis in our cohort, since age of tumor presentation in patients with this allele was, on average, 20 months later than in non-carriers. A similar effect has already been observed in patients with LFS, in which patients with the duplicated allele developed their first tumor, on average, 19 years later than patients without the duplicated allele. However, this effect was restricted to patients with germline *TP53* mutations [18]. The PIN3 16bp sequence bends in a tertiary structure of pre-RNA called G-quadruplex. G-quadruplexes operate in the regulation of pre-RNA processing, modifying synthesis rates of the different p53 isoforms [26]. One of these isoforms, $\Delta 40p53$, is produced with retention of intron 2 by alternative splicing, and lacks the N-terminal domain and part of the transactivation domain. The truncated protein $\Delta 40p53$ lacks functional activity, and acts as a negative regulator of functional p53 [27]. G-quadruplex structures in the stable RNA increase efficiency of intron 2 excision, thus reducing the production of mRNA encoding $\Delta 40p53$, and increasing the production of mRNA encoding functional p53. Thus, PIN3 duplicated allele may contribute to this regulation, having a potential regulatory role on the expression of p53, but its mechanisms of action are not well determined [26]. Interestingly, most studies involving PIN3 report an association between the

TABLE IV. Distribution of Mean Age at Diagnosis According to *TP53* Polymorphisms Status

Polymorphism	Mean age in months (SD)	P
PIN2		
GG	34 (± 23)	0.2774
GC + CC	39 (± 18)	
PIN3		
NN	30 (± 20)	0.0084
ND + DD	50 (± 17)	
PEX4		
GG	30 (± 20)	0.0858
GC + CC	41 (± 21)	

N, non-duplicated allele; D, duplicated allele.

Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc

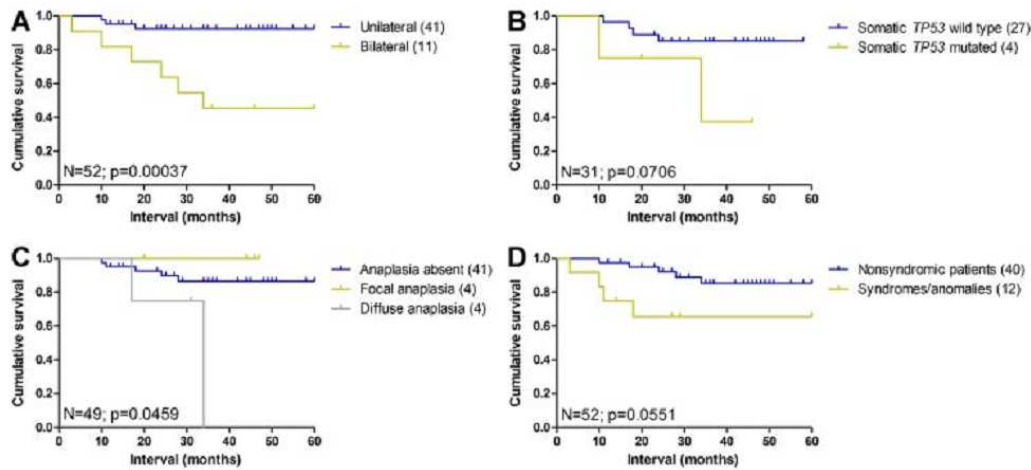


Fig. 2. Kaplan–Meier survival estimates for Wilms tumor patients. **A:** Survival curves of the patients according to tumor laterality; **(B)** shows only patients who had tumor DNA samples available stratified by the absence or presence of a *TP53* somatic mutation; **(C)** patients who had accessible histological data are divided in groups with non-anaplastic tumors, focal anaplasia tumors, and diffuse anaplasia tumors; **(D)** survival curves of patients according to the presence of congenital syndromes/anomalies.

duplicated allele and the risk of developing several cancers, including ovarian, colorectal, esophageal, and gastric cancer [28–30]. Wu et al. [31] reported lower rates of apoptosis and DNA repair in lymphoblastoid cells that had a duplicated allele of *PIN3* in specific haplotype combinations with *PEX4* and rs1625895 *TP53* SNPs.

Concerning the odds ratio for *PIN2*, *PIN3*, and *PEX4* polymorphisms in our cohort, *PIN2* and *PIN3* showed no association with risk for developing the disease ($P > 0.05$), although several studies have linked them to other types of cancer [7,8,28–30]. *PEX4* C allele showed a higher risk for development of WT than G allele. There is no consensus regarding the impact of *PEX4* polymorphism in p53 protein function. While some studies demonstrate that the protein carrying the Arg72 residue (G allele) has a higher ability to induce apoptosis [32,33], other studies showed that the protein carrying Pro72 residue (Allele C) has greater efficacy in activating DNA repair genes [34] and in suppressing cell cycle at G1 phase [35]. Thus, it is expected that studies investigating the influence of *PEX4* in development of various cancers do not show a consensus, reporting both an increased risk for the G allele [36,37], and for the C allele [9,38,39]. A recent study with 23 favorable histology WT samples showed *PEX4* had no influence on age of onset of tumors, staging, or tumor recurrence [40]. The same authors, however, found an over-representation of the G allele in their samples, compared to reported frequencies in general population. Such association was not observed in our cohort, when comparing to Brazilian control data. It is necessary to enlarge our cohort to verify if the effect of *PIN3* and *PEX4* in age at diagnosis and risk of development remains the same.

The overall 60-month survival rate in our cohort was 80.8%. Age at diagnosis had no influence on patients’ survival. Although patients diagnosed after 48 months usually have a higher frequency of tumors in stage III and IV [41], advances in treatment may be related to the high survival rates even in cases diagnosed later in childhood. In relation to the presence of anaplasia, our study is in

Pediatr Blood Cancer DOI 10.1002/pbc

accordance to postulated data from the National Wilms Tumor Study Group, reporting that only the diffuse subtype of anaplasia can be considered unfavorable histology, being related to a poorer prognosis [42]. Bilaterality, on the other hand, showed a 60-month survival probability rate about two times lower than survival of patients with unilateral disease, corresponding to the most important prognostic factor. Bilateral disease remains a challenge for the need to preserve both renal parenchyma, avoiding renal failure and reaching a better survival rate. The high frequency of bilateral disease and/or syndromic patients in our cohort may be due to the fact that both characteristics are commonly related to genetic predisposition, and thus the patients tend to be directed to genetic counseling and molecular studies more often than unilateral cases and children with no syndrome/anomaly. It is noteworthy, however, that all mutations observed in our cohort were present in non-syndromic patients. The presence of the less frequent alleles and genotypes of *PIN2*, *PIN3*, and *PEX4* showed no influence on patients’ survival, although an association of *PEX4* and risk of tumor development was apparent in our sample, as well as the impact of *PIN3*, associated with a difference of 20 months in the mean age at diagnosis. The exact mechanisms of action concerning *TP53* polymorphisms in WT remain to be elucidated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the staff of the Pediatric Oncology Department at Instituto Nacional de Câncer (INCA) for their help with recruitment of patients. This study was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grants 40196/2010-0, 476808/2010-3, and 486599/2012-4 to FRV. RCA was recipient of CNPq grant 135171/2010-5.

REFERENCES

1. Royer-Pokora B. Genetics of pediatric renal tumors. *Pediatr Nephrol* 2013;28:13–23.
2. de Camargo B, de Oliveira Ferreira JM, de Souza Reis R, et al. Socioeconomic status and the incidence of non-central nervous system childhood embryonic tumors in Brazil. *BMC Cancer* 2011;11:160.

6 Andrade et al.

3. Stiller CA, Parkin DM. International variations in the incidence of childhood renal tumors. *Br J Cancer* 1990;62:1026–1030.
4. Rivera MN, Kim WJ, Wells J, et al. An X chromosome gene, *WTX*, is commonly inactivated in Wilms tumor. *Science* 2007;315:642–645.
5. Soussi T, Lozano G. p53 mutation heterogeneity in cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:834–842.
6. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: Correlation between tumor type, family structure, and *TP53* genotype. *Cancer Res* 2003;63:6643–6650.
7. Savage SA, Burdett L, Troisi R, et al. Germ-line genetic variation of *TP53* in osteosarcoma. *Pediatr Blood Cancer* 2007;49:28–33.
8. Jha P, Jha P, Pathak P, et al. *TP53* polymorphisms in gliomas from Indian patients: Study of codon 72 genotype, rs1642785, rs1800370 and 16 base pair insertion in intron-3. *Exp Mol Pathol* 2011;90:167–172.
9. Fan R, Wu MT, Miller D, et al. The p53 codon 72 polymorphism and lung cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000;9:1037–1042.
10. Granja F, Morari J, Morari EC, et al. Proline homozygosity in codon 72 of p53 is a factor of susceptibility for thyroid cancer. *Cancer Lett* 2004;210:151–157.
11. Ohayon T, Gershoni-Baruch R, Papa MZ, et al. The R72P *P53* mutation is associated with familial breast cancer in Jewish women. *Br J Cancer* 2005;92:1144–1148.
12. Zhu ZZ, Cong WM, Liu SF, et al. A p53 polymorphism modifies the risk of hepatocellular carcinoma among non-carriers but not carriers of chronic hepatitis B virus infection. *Cancer Lett* 2005;229:77–83.
13. Bardeesy N, Falkoff D, Petruzzi MJ, et al. Anaplastic Wilms' tumor, a subtype displaying poor prognosis, harbours p53 gene mutations. *Nat Genet* 1994;7:91–97.
14. Bardeesy N, Beckwith JB, Pelletier J. Clonal expansion and attenuated apoptosis in Wilms' tumors are associated with p53 gene mutations. *Cancer Res* 1995;55:215–219.
15. Malkin D, Sexsmith E, Yeger H, et al. Mutations of the p53 tumor suppressor gene occur infrequently in Wilms' tumor. *Cancer Res* 1994;54:2077–2079.
16. Cardoso LC, De Souza KR, De O Reis AH, et al. *WT1*, *WTX* and *CTNNB1* mutation analysis in 43 patients with sporadic Wilms' tumor. *Oncol Rep* 2013;29:315–320.
17. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Hum Mutat* 2007;28:622–629.
18. Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, et al. *TP53* PIN3 and *MDM2* SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: Impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* 2009;46:766–772.
19. Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71:747–752.
20. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline *TP53* mutations. *Oncogene* 2001;20:4621–4628.
21. Hartley AL, Birch JM, Harris M, et al. Leukemia, lymphoma, and related disorders in families of children diagnosed with Wilms' tumor. *Cancer Genet Cytogenet* 1994;77:129–133.
22. Moutou C, Hochez J, Chompret A, et al. The French Wilms' tumor study: No clear evidence for cancer prone families. *J Med Genet* 1994;31:429–434.
23. Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, et al. Human Splicing Finder: An online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res* 2009;37:e67.
24. Schlonm T, Gunawan B, Schulten HJ, et al. Effects of chemotherapy on the cytogenetic constitution of Wilms' tumor. *Clin Cancer Res* 2005;11:4382–4387.
25. Pietsch EC, Humbey O, Murphy ME. Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 2006;25:1602–1611.
26. Marcel V, Tran PL, Sagne C, et al. G-quadruplex structures in *TP53* intron 3: Role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. *Carcinogenesis* 2011;32:271–278.
27. Bourdon JC. p53 and its isoforms in cancer. *Br J Cancer* 2007;97:277–282.
28. Wang-Gohrke S, Weikel W, Risch H, et al. Intron variants of the p53 gene are associated with increased risk for ovarian cancer but not in carriers of *BRCA1* or *BRCA2* germline mutations. *Br J Cancer* 1999;81:179–183.
29. Gemignani F, Moreno V, Landi S, et al. A *TP53* polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of *TP53* mRNA. *Oncogene* 2004;23:1954–1956.
30. Malik MA, Sharma K, Goel S, et al. Association of *TP53* intron 3, 16 bp duplication polymorphism with esophageal and gastric cancer susceptibility in Kashmir Valley. *Oncol Res* 2011;19:165–169.
31. Wu X, Zhao H, Amos CI, et al. p53 genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:681–690.
32. Dumont P, Leu JI, Della Pietra AC III, et al. The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* 2003;33:357–365.
33. Osorio A, Martínez-Delgado B, Pollán M, et al. A haplotype containing the p53 polymorphisms Ins16bp and Arg72Pro modifies cancer risk in *BRCA2* mutation carriers. *Hum Mutat* 2006;27:242–248.
34. Siddique M, Sabapathy K. Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* 2006;25:3489–3500.
35. Pim D, Banks L. p53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* 2004;108:196–199.
36. Buyru N, Tigli H, Dalay N. P53 codon 72 polymorphism in breast cancer. *Oncol Rep* 2003;10:711–714.
37. Pérez-Pérez GI, Bosques-Padilla FJ, Crosatti ML, et al. Role of p53 codon 72 polymorphism in the risk of development of distal gastric cancer. *Scand J Gastroenterol* 2005;40:56–60.
38. Noma C, Miyoshi Y, Taguchi T, et al. Association of p53 genetic polymorphism (*Arg72Pro*) with estrogen receptor positive breast cancer risk in Japanese women. *Cancer Lett* 2004;210:197–203.
39. Densclag D, Bettendorf H, Watermann D, et al. Polymorphism of the p53 tumor suppressor gene is associated with susceptibility to uterine leiomyoma. *Fertil Steril* 2005;84:162–166.
40. Cost NG, Mitui M, Khokhar S, et al. *TP53* codon 72 polymorphisms in favorable histology Wilms tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2012;59:326–328.
41. Grabois MF, Mendonça GA. Prognosis for patients with unilateral Wilms' tumor in Rio de Janeiro, Brazil, 1990–2000. *Rev Saude Publica* 2005;39:731–737.
42. Faria P, Beckwith JB, Mishra K, et al. Focal versus diffuse anaplasia in Wilms tumor—New definitions with prognostic significance: A report from the National Wilms Tumor Study Group. *Am J Surg Pathol* 1996;20:909–920.



***TP53* and *CDKN1A* mutation analysis in families with Li–Fraumeni and Li–Fraumeni like syndromes**

Raissa Coelho Andrade¹ · Anna Claudia Evangelista dos Santos¹ · Joaquim Caetano de Aguirre Neto² · Julián Nevado³ · Pablo Lapunzina³ · Fernando Regla Vargas^{1,4,5}

© Springer Science+Business Media Dordrecht 2016

Abstract Li–Fraumeni and Li–Fraumeni like syndromes (LFS/LFL) represent rare cancer-prone conditions associated mostly with sarcomas, breast cancer, brain tumors, and adrenocortical carcinomas. *TP53* germline mutations are present in up to 80 % of families with classic Li–Fraumeni syndrome, and in 20–60 % of families with Li–Fraumeni like phenotypes. The frequency of LFS/LFL families with no *TP53* mutations detected suggests the involvement of other genes in the syndrome. In this study, we searched for mutations in *TP53* in 39 probands from families with criteria for LFS/LFL. We also searched for mutations in the gene encoding the main mediator of p53 in cell cycle arrest, *CDKN1A/p21*, in all patients with no mutations in *TP53*. Eight probands carried germline disease-causing mutations in *TP53*: six missense mutations and two partial gene deletions. No mutations in *CDKN1A* coding region were detected. *TP53* partial deletions in our cohort represented 25 % (2/8) of the mutations found, a much higher frequency than usually reported, emphasizing the need to

search for *TP53* rearrangements in patients with LFS/LFL phenotypes. Two benign tumors were detected in two *TP53* mutation carriers: an adrenocortical adenoma and a neurofibroma, which raises a question about the possible implication of *TP53* mutations on the development of such lesions.

Keywords Li–Fraumeni syndrome · Li–Fraumeni like syndrome · *TP53* · *CDKN1A* · Gene deletion

Introduction

Li–Fraumeni syndrome (LFS) represents a rare cancer-prone condition associated to germline mutations in the *TP53* gene [1, 2]. The classic phenotype of this syndrome was clinically defined before the identification of germline mutations in *TP53*, and it consists in the following criteria: a family with one proband diagnosed with a sarcoma before age 45 years, plus one first-degree relative with any cancer before age 45 years, and another first- or second-degree relative with any cancer before age 45 years or a

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s10689-016-9935-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Fernando Regla Vargas
fernando.vargas@ioc.fiocruz.br

Raissa Coelho Andrade
randrade.inca@gmail.com

Anna Claudia Evangelista dos Santos
acsantos@inca.gov.br

Joaquim Caetano de Aguirre Neto
caetanoaguirre@hotmail.com

Julián Nevado
jnevado@salud.madrid.org

Pablo Lapunzina
pablo.lapunzina@salud.madrid.org

¹ Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

² Clínica de Oncologia Pediátrica da Santa Casa de Belo Horizonte, Belo Horizonte, Brazil

³ INGEMM, Instituto de Genética Médica y Molecular, IdiPAZ-CIBERER, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, Spain

⁴ Genetics and Molecular Biology Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵ Birth Defects Epidemiology Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365 – Pavilhão Leônidas Deane Sala 617, Manguinhos, Rio de Janeiro, RJ 21040-900, Brazil

sarcoma at any age [3]. Further studies revealed that, although highly specific for *TP53* germline mutations, these criteria fail to include many mutation-positive families [1, 2]. Since then, less stringent criteria have been used for indicating *TP53* testing, including the Li–Fraumeni like (LFL) criteria of Birch [4] and Eeles [5]. The most robust analysis of *TP53* mutation carriers to this date was performed in France by Bougeard et al. [6], who developed the most recent version of the Chompret criteria. Table 1 shows the definitions of these criteria.

Phenotypes of families carrying *TP53* mutations can be highly variable, partly due to life style and genetic background of genes involved in the p53 pathway [1, 2]. Therefore, it is important to collect data from several populations to better understand the epidemiology of LFS/LFL. Moreover, mutations in *TP53* can lead to different consequences on gene function, and thereby further characterization of individual genotype–phenotype associations could enable a better patient stratification and cancer risk management [2].

The possibility of a major second *locus* involved in LFS is an additional issue in the etiology of the syndrome, since approximately 20 % of LFS and up to 80 % of LFL families do not exhibit *TP53* mutations [1, 2]. The underlying genetic defects in these families remain to be uncovered. The most obvious candidate genes would be p53 partners in tumor suppressor pathways. Therefore, different studies investigated *BAX* [7], *CDKN2A* [8], *TP63* [9], *CHEK2* [9], *BCL10* [10], and *PTEN* [11] in *TP53*-negative families, but no association was evidenced. Although a few studies have occasionally linked other *loci* to some LFS kindreds [12, 13], *TP53* remains the only gene conclusively associated to the syndrome [1]. *CDKN1A/p21* (Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A) is a

direct transcriptional target of p53 and the main regulator of p53 activity in cell cycle arrest [14]. A previous analysis of *CDKN1A/p21* variants has shown that they may have a direct effect on tumor development, and tend to be less prevalent in tumors with *TP53* mutations [15]. In addition, knockout mice for *CDKN1A* have shown to be susceptible to early cancer development, including the development of sarcomas, the main feature of LFS [14]. It has been reported that p53 mutants that downregulate the transcription of *CDKN1A* are highly frequent in sporadic tumors, suggesting these mutations might undergo positive selection in human cancers [16]. Even so, to the best of our knowledge, germline mutations in *CDKN1A* in patients with LFS/LFL criteria have never been investigated.

In the present study, we characterized a cohort of Brazilian families with criteria for LFS/LFL. First, we searched for point mutations and gene rearrangements in the *TP53* gene. Subsequently, we searched for germline mutations in the *CDKN1A* gene, as a possible second *locus* for *TP53*-negative LFS/LFL patients.

Materials and methods

Patients

Thirty-nine unrelated probands whose families fulfilled at least one of the diagnostic criteria for LFS/LFL were included in the study. The probands were referred for genetic counseling appointments both in the pediatric and adult genetic counseling outpatient clinics. Available histopathologic data and/or medical reports were used to confirm the reported data.

Table 1 Diagnostic criteria for LFS and LFL syndromes

Criteria	Definition
Classical [3]	Proband with a sarcoma diagnosed before age 45, and a first-degree relative with any cancer before age 45, and a first- or second-degree relative with any cancer before age 45 or a sarcoma at any age
Birch [4]	Proband with any childhood cancer or sarcoma, brain tumor or adrenocortical carcinoma diagnosed before age 45, and a first- or second-degree relative with a typical LFS malignancy (sarcoma, leukemia, breast, brain, adrenal cortex) regardless of age at diagnosis, and a first- or second-degree relative with any cancer diagnosed before age 60
Eeles [5]	Two different tumors that are part of extended LFS in first- or second-degree relatives at any age (sarcoma, breast cancer, brain tumor, leukemia, adrenocortical tumor, melanoma, prostate cancer, pancreatic cancer)
Chompret (2015 version) [6]	Proband with a tumor of the LFS spectrum (premenopausal breast cancer, soft tissue sarcoma, osteosarcoma, brain tumor, adrenocortical carcinoma) before age 46 and at least one first- or second-degree relative with any LFS tumor (except BC if the proband has BC) before age 56 or with multiple tumors; OR proband with multiple tumors (except multiple BC), two of which belong to the LFS spectrum, the first before age 46; OR proband with adrenocortical carcinoma, choroid plexus tumor or rhabdomyosarcoma of embryonalanaplastic subtype, regardless of family history; OR breast cancer before age 31 years

Age in years

BC breast cancer

Sanger sequencing and multiplex ligation probe amplification (MLPA) analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples according to standard procedures. Amplification and direct sequencing of all coding and intronic flanking regions of *TP53* were performed using primer sequences described at the IARC *TP53* database (<http://p53.iarc.fr/>) [17]. The pathogenicity of the detected mutations was determined by consulting the IARC *TP53* database. The mutations found were confirmed by a second, independent analysis. Mutation-negative patients were then tested for copy number variation (CNV) using a MLPA kit designed for gliomas (SALSA kit P105-D1, MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands) that contains eight probes for the *TP53* gene, in addition to probes for eight other glioma-related genes (*CDKN2A*, *CDK4*, *EGFR*, *MDM2*, *MIR26A2*, *NFKBIA*, *PDGFRA*, *P TEN*). The copy number variations found were confirmed by a second reaction, using a different MLPA kit (SALSA kit P056-C1, MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands). Patients with no pathogenic mutations in *TP53* were submitted to sequencing of *CDKN1A* coding regions, performed as described elsewhere [18].

Results

Three families (3/39; 8 %) exhibited the classic LFS criteria. Among the remaining 36 families (92 %), four met only the Chompret criteria (2015 version), two met only the Birch criteria, and 18 met only the Eeles criteria. Fifteen families fulfilled more than one of the four criteria. These data are shown in Table 2 and Online Resource 1.

Sequencing of the coding and intronic flanking regions of *TP53* in 39 probands identified six (6/39) carriers of pathogenic missense *TP53* mutations in heterozygosis (Table 2). Among the remaining samples ($n = 33$), MLPA analysis was reliable for 31 samples, and revealed partial deletion of *TP53* in heterozygosis in two (2/31) probands (Table 2; Online Resource 2).

The 31 probands negative for *TP53* mutations are shown in Online Resource 1. None of them exhibited mutations in *CDKN1A*. The pedigrees of all *TP53* mutation carriers are arranged in Fig. 1. Partial deletions of *TP53* represented 25 % (2/8) of the *TP53* mutations found in our cohort. The total prevalence of large deletions in *TP53* in our cohort was 6.5 % (2/31 patients).

The mutational rate according to the phenotypic criteria was: LFS-classic: 67 % (2/3 families); LFL–Birch: 30 % (3/10 families); LFL–Chompret (2015): 35 % (6/17 families); LFL–Eeles: 15 % (5/33 families). Sensitivity, specificity, and predictive values of these criteria are shown in

Online Resource 3. The Chompret criteria (2015 version) exhibited the highest sensitivity (75 %). The classic criteria, on the other hand, were the most specific (97 %) but the less sensitive (25 %).

All eight probands with pathogenic *TP53* mutations developed pediatric neoplasias: four developed osteosarcoma, two developed rhabdomyosarcoma, one had adrenocortical carcinoma, and one developed multiple primary cancers. Considering the tumors developed by the probands with mutations and the tumors developed by their relatives, a total of 33 tumors were reported. The most common was osteosarcoma (7/33; 21.2 %), followed by colorectal cancer (5/33; 15.2 %) and soft tissue sarcomas (4/33; 12.1 %). Breast and prostate cancers represented each 9.1 % of these tumors (3/33), and the hematological cancers, lung cancer, and adrenocortical tumors represented each 6.1 % (2/33). One case (3 %) of each of the following tumors occurred: central nervous system, stomach, skin (melanoma), testicle, and neurofibroma. The comparison of tumors in families with a *TP53* mutation versus families with no *TP53* mutation revealed that the following cancers were more prevalent in *TP53*-positive families (Fisher’s exact test): osteosarcomas ($p = 0.00003$), soft tissue sarcomas ($p = 0.0191$), and adrenocortical tumors ($p = 0.0219$). The other core LFS cancers (breast cancer and central nervous system tumors) did not reveal the same association ($p > 0.05$).

Two benign tumors were observed in *TP53* mutation carriers: an adrenocortical adenoma (proband #36) and a neurofibroma (proband #12). Proband #36 developed an adrenal adenoma at age 1 and an osteosarcoma at age 11, and was found to be a carrier of the *TP53* R248W mutation. This patient was included in the study because the initial information was that she developed an “adrenal tumor”. Subsequent review of the histopathologic data revealed that this proband developed an adenoma of the right adrenal cortex, treated with surgery alone, weighing 20 g and with low mitotic index. No foci of carcinoma were observed in the tumor. Subsequently, this proband developed an osteosarcoma at age 11. Proband #12 had developed a rhabdomyosarcoma at age 2, and at age 9 he was diagnosed with an intercostal non-plexiform neurofibroma. His family history is compatible with the four clinical diagnostic criteria for LFS/LFL. This proband and his father, who developed osteosarcoma at age 29, were found to carry the *TP53* Y220C mutation.

Proband #25 was diagnosed at age 12 with an adrenocortical carcinoma, and was a carrier of the *TP53*R337H mutation. His mother was not a carrier of the mutation, and information regarding familial history of cancer of the proband’s father was not available. Two other probands diagnosed with osteosarcoma were found to be carriers of pathogenic *TP53* mutations (proband #50, mutation R175H; proband #35, mutation R337C). Proband #28 developed a

Table 2 Clinical characterization of *TP53* pathogenic mutation carriers

Patient gender	Tumor(s) ^a	<i>TP53</i> mutation	Protein	Exon (s)	Famhx ^b	Clinical criteria			
						LFS	Birch	Chompret	Eeles
#49 M	NHL (3), OS (17), OS (25), MEL(27), LMS (33)	Deletion E2–4		2–4	CRC (M-31)			✓	
#50 M	OS (14)	c.524G > A	R175H	5	PC (M-65)				✓
#28 F	RMS (3)	c.584T > A	I195 N	6	PC (M-58), BC (F-34)		✓	✓	✓
#12 M	RMS (2), NF (9)	c.659A > G	Y220C	6	OS (M-29*), BT (M-14), BC (F-23)	✓	✓	✓	✓
#36 F	ACA (<1), OS (11)	c.742C > T	R248W	7	CRC (F-46, F- <30, F-20, M-25)			✓	
#53 F	OS (14)	Deletion E8		8	PC (M- >60), TC (M-25), GC (M-35), LK (F-22), LC (F-40)				✓
#35 M	OS (16)	c.1009C > T	R337C	10	BC (F-29), RMS (F-6), LC (M-N/A)	✓	✓	✓	✓
#25 M	ACC (12)	c.1010G > A	R337H	10	N/A			✓	

Tumors in bold occurred in the same individual. Reference sequences: Genbank NP_000537.3 and NM_000546.5

M male, *F* female, *N/A* not available, *ACA* adrenocortical adenoma, *ACC* adrenocortical carcinoma, *BC* breast cancer, *BT* brain tumor, *CRC* colorectal cancer, *GC* gastric cancer, *LC* lung cancer, *LK* leukemia, *LMS* leiomyosarcoma, *NF* neurofibroma, *NHL* non-Hodgkin's lymphoma, *OS* osteosarcoma, *PC* prostate cancer, *RMS* rhabdomyosarcoma, *TC* testicular cancer

*Relative tested and also a carrier of the mutation

^a Age at diagnosis

^b Gender—age at diagnosis

rhabdomyosarcoma at age 3, and was found to carry the *TP53* I195N mutation, which has not been previously reported in the germline [17].

Two probands showed partial deletion of the *TP53* gene. Proband #49 developed five primary neoplasias (non-Hodgkin lymphoma at age 3, osteosarcomas at ages 17 and 25, melanoma at age 27, and a leiomyosarcoma at age 33). MLPA probes for exons 2–4 of *TP53* evidenced only one copy of this region in this patient's DNA. Proband #53 developed an osteosarcoma at age 14, and was found to carry only one copy of exon 8 of *TP53*. Sequencing of this exon in this patient did not disclose polymorphisms that could result in non-hybridization of the probe. MLPA of both probands, and sequencing of exon 8 of proband #53 are shown in Online Resource 2.

Discussion

We have searched for mutations in *TP53* and *CDKN1A* in 39 probands with LFS/LFL phenotypes. Eight probands with pathogenic mutations in *TP53* were observed. Two mutations were partial deletions of *TP53*, accounting for 25 % of the *TP53* mutations in our cohort. This prevalence is much higher than the one reported in the IARC *TP53* database (<http://p53.iarc.fr/-version> R18), where this type of mutation is shown to represent only 0.7 % of the

germline mutations reported in this gene. Our results emphasize the importance of performing copy number variation analysis in addition to direct sequencing to avoid the underestimation of germline *TP53* mutation carriers.

An unusual feature in our cohort was the development of a non-plexiform neurofibroma in proband #12, carrier of the *TP53* Y220C mutation. These benign tumors are hallmark features of neurofibromatosis 1 (OMIM #16220), and are not associated to LFS/LFL. This patient does not exhibit clinical features and/or family history of neurofibromatosis 1. The neurofibroma developed by the proband might have been the result of a genomic instability in the context of an inherited *TP53* pathogenic mutation.

Another benign tumor observed in our cohort was an adrenocortical adenoma developed by proband #36, carrier of the *TP53* R248W mutation. This case is remarkably similar to a previously reported patient with a mosaic *TP53* mutation (R282W) who also developed an adrenal adenoma at age 1, and an osteosarcoma at age seven [19]. Interestingly, our proband was also a carrier of an arginine-to-tryptophan substitution (R248W), and both mutations are located in the DNA binding domain of p53. Somatic mosaicism for *TP53* R248Q mutation was recently described in a 2 year-old child with three primary neoplasias [20]. Importantly, in spite of being a mutation carrier, the phenotype presented by our proband does not fit into any LFS/LFL criteria. Our findings emphasize the idea

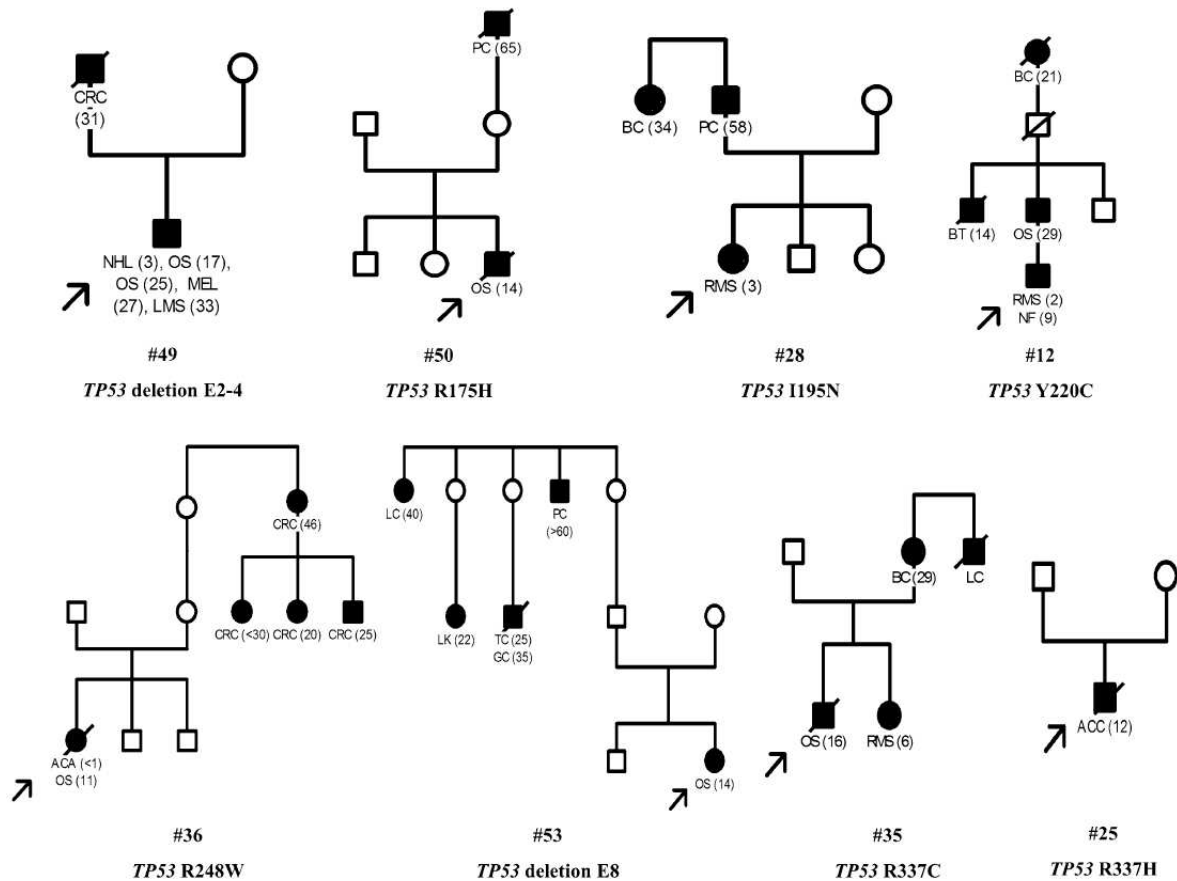


Fig. 1 Pedigrees of the probands with *TP53* mutations detected ACA adrenocortical adenoma, ACC adrenocortical carcinoma, BC breast cancer, BT brain tumor, CRC colorectal cancer, GC gastric cancer, LC lung cancer, LK leukemia, LM leiomyosarcoma, MEL melanoma, NF

neurofibroma, NHL non-Hodgkin’s lymphoma, OS osteosarcoma, PC prostate cancer, RMS rhabdomyosarcoma, TC testicular cancer. Ages at diagnosis (in years) are presented in parenthesis

that large and/or functioning pediatric adrenocortical adenomas, when in association with LFS core cancers in the proband or in close relatives, should be considered for *TP53* mutation screening.

Benign tumors are occasionally reported in *TP53* germline mutation carriers, e.g. leiomyomatosis [21], meningioma [22], endometrial polyp [23], trichilemmoma [24], thymoma [6]. Available data on benign lesions in *TP53* mutation carriers are scarce. It is not clear whether benign tumors are incidental findings or may be causally associated to *TP53* germline mutations. If *TP53* mutations are implicated in the development of benign tumors, it is plausible to think these might represent premalignant lesions, and therefore the follow-up of these tumors should demand more caution.

We did not find mutations in the main mediator of p53 in cell cycle arrest, *CDKN1A*, although knockout mice for this gene have shown to be susceptible to early cancer

development, including core cancers of LFS [14]. Other candidate genes in LFS/LFL phenotypes have shown lack of association with these phenotypes [7–11]. Likewise, abnormal *TP53* promoter methylation was not observed in LFS/LFL families negative for mutations in this gene [25]. Given the large spectrum of LFS/LFL phenotypes, the underlying genetic defect in some families may be linked to specific patterns of tumor occurrence. For example, genes involved in chromatin remodeling function were associated with excess of brain tumors in Chompret-positive *TP53*-negative families [13]. Likewise, a pathogenic mutation in *POT1*, which regulates telomere length, was associated to cancer predisposition in LFL families with cardiac angiosarcoma [26].

In conclusion, our findings reinforce the need to include CNV analysis in *TP53* mutation screening protocols. Moreover, large and/or functioning adrenal adenomas, when in association with LFS core cancers in the proband

and/or close relatives, should be considered for *TP53* mutation analysis.

Acknowledgments F. R. V. is a recipient of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) Grant 486599/2012-4 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) Grant E26/110.535/2012. RCA is recipient of a Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer Grant.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

Ethical approval All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Informed consent Informed consent was obtained from all individual participants included in the study.

References

- Malkin D (2011) Li–Fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2:475–484. doi:10.1177/1947601911413466
- McBride KA, Ballinger ML, Killick E et al (2014) Li–Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* 11:260–271
- Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ et al (1988) A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358–5362
- Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ et al (1994) Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li–Fraumeni families. *Cancer Res* 54:1298–1304
- Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101–124
- Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman J-M et al (2015) Revisiting Li–Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *J Clin Oncol* 33:2345–2352. doi:10.1200/JCO.2014.59.5728
- Barlow JW, Mous M, Wiley JC et al (2004) Germ line BAX alterations are infrequent in Li–Fraumeni syndrome. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 13:1403–1406
- Portwine C, Lees J, Verselis S et al (2000) Absence of germline p16(INK4a) alterations in p53 wild type Li–Fraumeni syndrome families. *J Med Genet* 37:E13
- Bougeard G, Limacher JM, Martin C et al (2001) Detection of 11 germline inactivating TP53 mutations and absence of TP63 and HCHK2 mutations in 17 French families with Li–Fraumeni or Li–Fraumeni-like syndrome. *J Med Genet* 38:253–257
- Stone JG, Eeles RA, Sodha N et al (1999) Analysis of Li–Fraumeni syndrome and Li–Fraumeni-like families for germline mutations in Bcl10. *Cancer Lett* 147:181–185
- Brown LT, Sexsmith E, Malkin D (2000) Identification of a novel PTEN intronic deletion in Li–Fraumeni syndrome and its effect on RNA processing. *Cancer Genet Cytogenet* 123:65–68
- Bachinski LL, Olufemi S-E, Zhou X et al (2005) Genetic mapping of a third Li–Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. *Cancer Res* 65:427–431
- Aury-Landas J, Bougeard G, Castel H et al (2013) Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li–Fraumeni syndrome with brain tumours. *Eur J Hum Genet* 21:1369–1376. doi:10.1038/ejhg.2013.68
- Martín-Caballero J, Flores JM, García-Palencia P, Serrano M (2001) Tumor susceptibility of p21(Waf1/Cip1)-deficient mice. *Cancer Res* 61:6234–6238
- Mousses S, Ozçelik H, Lee PD et al (1995) Two variants of the CIP1/WAF1 gene occur together and are associated with human cancer. *Hum Mol Genet* 4:1089–1092
- Petitjean A, Achatz M, Borresen-Dale A et al (2007) TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene* 26:2157–2165. doi:10.1038/sj.onc.1210302
- Petitjean A, Mathe E, Kato S et al (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622–629. doi:10.1002/humu.20495
- Gravina S, Lescai F, Hurteau G et al (2009) Identification of single nucleotide polymorphisms in the p21 (CDKN1A) gene and correlations with longevity in the Italian population. *Aging (Albany NY)* 1:470–480
- Prochazkova K, Pavlikova K, Minarik M et al (2009) Somatic TP53 mutation mosaicism in a patient with Li–Fraumeni syndrome. *Am J Med Genet A* 149A:206–211. doi:10.1002/ajmg.a.32574
- Behjati S, Maschietto M, Williams RD et al (2014) A pathogenic mosaic TP53 mutation in two germ layers detected by next generation sequencing. *PLoS One* 9:e96531. doi:10.1371/journal.pone.0096531
- Kazarin O, Vlodayevsky E, Guralnik L et al (2013) Association between esophageal leiomyomatosis and p53 mutation. *Ann Thorac Surg* 95:1429–1431. doi:10.1016/j.athoracsur.2012.08.081
- Rieske P, Zakrzewska M, Biernat W et al (2005) Atypical molecular background of glioblastoma and meningioma developed in a patient with Li–Fraumeni syndrome. *J Neurooncol* 71:27–30. doi:10.1007/s11060-004-9181-3
- Varley JM, Thorncroft M, McGown G et al (1996) A novel deletion within exon 6 of TP53 in a family with Li–Fraumeni-like syndrome, and LOH in a benign lesion from a mutation carrier. *Cancer Genet Cytogenet* 90:14–16
- Eeles RA, Warren W, Knee G et al (1993) Constitutional mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary tumours: molecular and immunohistochemical findings. *Oncogene* 8:1269–1276
- Finkova A, Vazna A, Hrachovina O et al (2009) The TP53 gene promoter is not methylated in families suggestive of Li–Fraumeni syndrome with no germline TP53 mutations. *Cancer Genet Cytogenet* 193:63–66. doi:10.1016/j.cancergencyto.2009.04.014
- Calvete O, Martínez P, García-Pavía P et al (2015) A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li–Fraumeni-like families. *Nat Commun* 6:8383. doi:10.1038/ncomms9383

Manuscrito 1 submetido ao periódico “Familial Cancer”

TP53 germline and somatic mutations in a patient with fibrolamellar hepatocarcinoma

Raissa C. Andrade¹, Maria A. F. D. de Lima², Paulo A. S. de Faria³, Fernando R. Vargas^{1,4,5*}

¹Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

²Genetics Internship Program, Universidade UnigranRio, Rio de Janeiro, Brazil

³Pathology Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Genetics and Molecular Biology Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Oswaldo Cruz Institute, Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

* Corresponding author: Fernando R Vargas

Pav. Leonidas Deane, Rm. 617, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, 21040-360, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Phone/Fax: +552138658121

Email: fernando.vargas@ioc.fiocruz.br

Abstract

Li-Fraumeni syndrome is a rare hereditary cancer predisposition syndrome associated with germline mutations in *TP53* gene. The phenotype may vary from classical to variant forms, known as Li-Fraumeni-like phenotypes. We searched for mutations in *TP53* in a 14 year-old female diagnosed with fibrolamellar hepatocarcinoma, a rare variant of hepatocellular carcinoma. The proband is a heterozygote carrier of the *TP53* c.467G>A (p.Arg156His) in exon 5, and her mother is an asymptomatic carrier. Analysis of tumor DNA disclosed an additional mutation in *TP53*, c.461G>A; p.Gly154Asp. The *TP53* germline and somatic mutations may have acted as possible driver mutations, resulting in genomic instability and tumor development. The fibrolamellar subtype of hepatocarcinoma may be part of the broad spectrum of tumors associated with Li-Fraumeni phenotype.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, Li-Fraumeni-like syndrome, fibrolamellar hepatocarcinoma, *TP53* gene.

Introduction

Li-Fraumeni syndrome is a rare inherited autosomal dominant condition, predisposing to many early-onset cancers. Core cancers include soft tissue sarcomas, osteosarcomas, pre-menopausal breast cancers, brain tumors, adrenocortical carcinomas and leukemias. Classical criteria for clinical diagnosis include a proband with a sarcoma diagnosed before age 45 years, a first-degree relative with any cancer before age 45 years, and a first- or second-degree relative with any cancer before age 45 years or a sarcoma at any age [1]. Alternative criteria were developed to include families with similar but less restrictive phenotypes, known as Li-Fraumeni like syndrome [2,3,4]. Still, some families present features that are reminiscent of the disease, yet are not compatible with the published classical or variant criteria. Molecular diagnosis is established by the presence of a germline pathogenic *TP53* mutation, irrespective of cancer history. Herein we describe a young female patient with fibrolamellar hepatocarcinoma carrying a germline pathogenic *TP53* mutation, and a further somatic mutation that might correspond to the second hit in this gene.

Patient and Methods

DNA samples were isolated from peripheral blood samples collected from the proband, her parents, and from one formalin-fixed, paraffin-embedded tumor sample. Sanger sequencing of *TP53* coding and intronic flanking regions was performed with primer sequences and amplification conditions described by the International Agency for Research in Cancer *TP53* database, version R17 (reference sequences accession numbers: NP_000537.3 and NM_000546.5) [5]. The pathogenicity of the identified mutations was determined with data from mutation databases and from *in silico* prediction models. The study was approved by the local Institutional Review Board. Individuals were included in the study after discussion and signature of the informed consent.

Results

We searched for *TP53* germline pathogenic mutations in a proband that was diagnosed with a moderately differentiated fibrolamellar hepatocarcinoma at age 14 years (Fig. 1C). She had a third degree cousin diagnosed at age 10 years with osteosarcoma (Fig. 1A). The proband carried a missense mutation in *TP53* (c.467G>A; p.Arg156His) in exon 5 (Fig. 1B), and the silent mutation c.582T>C (p.Leu194Leu) in exon 6, both in heterozygosis. Further investigation of her parents revealed her mother was also a carrier of both mutations (Fig. 1A). Sequencing of *TP53* in a DNA sample from a paraffin-embedded tumor block from the proband

confirmed the presence of the germline mutations p.Arg156His and p.Leu194Leu, and revealed an additional mutation, c.461G>A (p.Gly154Asp), all in heterozygosis (Fig. 1B).

Discussion

Because our proband was a carrier of hepatocarcinoma, a disease previously associated with the Li-Fraumeni phenotype [6], and had a maternal third degree cousin diagnosed with osteosarcoma at age 10 years, *TP53* mutation screening was performed in the proband. The fibrolamellar is a very rare subtype of hepatocellular carcinoma, with an age-adjusted incidence rate of 0.2 per 100,000 in the United States [7]. The tumor has a marked clinical predilection for younger individuals. Most cases occur between ages 10 and 35 years. Its distinct clinical and pathological features include lack of previous chronic liver disease as risk factor for tumor development, and its unique histological findings: tumor cells with profuse eosinophilic cytoplasm, large vesiculated nuclei and macronucleoli surrounded by a lamellar pattern of fibrosis [8]. It is known that fibrolamellar hepatocarcinoma carries a molecular pattern greatly distinguishable from typical hepatocellular carcinoma [9]. Recent studies using parallel sequencing and/or array hybridization approaches have confirmed the relatively low rate of somatic mutations and chromosomal aberrations in this cancer. The most promising discovery was the presence of the chimeric transcript DNAJB1-PRKACA that confers an increased cAMP-dependent protein kinase (PKA) activity in tumor cells. This transcript results from an approximately 400-kb deletion in chromosome 19 found in all or most of the samples analyzed in each study, and is expressed in fibrolamellar hepatocarcinoma, but not in adjacent normal liver [10, 11].

TP53, which has a somatic mutation rate of up to 35% in typical hepatocellular carcinoma [12], did not exhibit mutations or promoter methylation in fibrolamellar hepatocarcinoma so far [10; 11; 13]. Germline mutations in *TP53* have been reported in five individuals with primary cancer in the liver (two hepatocellular carcinomas, one hepatoblastoma, one unspecified liver cancer), and to the best of our knowledge, none of them had the fibrolamellar variant [5, 6, 14].

Herein we describe a patient with fibrolamellar hepatocarcinoma who is a carrier of one germline and one somatic mutation in *TP53* in the absence of clinical criteria for the classic or variant forms of Li-Fraumeni syndrome. The p.Arg156His mutation, found in blood and tumor samples from our proband, is predicted to result in a partially functional protein with limited transcriptional activity [5], which could be accounted for the non-classic phenotype in this family. The fact that the mother is carrier of *TP53* p.Arg156His mutation lends support to the hypothesis that the maternal cousin diagnosed with osteosarcoma would be also a carrier, thus

characterizing a low penetrance mutation. This mutation was detected in 16 cancer-affected individuals from four different families, and does not represent a common alteration in families with Li-Fraumeni syndrome [5]. Our findings draw attention to two issues regarding genetic testing of *TP53*: the continuously growing spectrum of tumors associated with mutations in this gene; and the influence of factors still poorly understood that impact the penetrance of *TP53* mutations, generating non-classic phenotypes.

It is still a challenge to define clinical criteria for indicating *TP53* testing, mainly because of the broad spectrum of tumors associated to these mutations [2]. One study found that 40% of adults affected with sarcomas carrying a germline *TP53* mutation did not exhibit a family history compatible with the syndrome [15]. In a cohort of 457 patients with colorectal cancer diagnosed before age 40 years, Yurgelun et al. [16] found six carriers of germline pathogenic *TP53* mutations. Interestingly, none of these patients had family history compatible of Li-Fraumeni classic or variant forms [16]. Ruijs et al. [6] also found six *TP53*-positive families that did not fulfill Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like criteria [6]. In line with these findings, our results suggest that *TP53* mutation screening should be an option to individuals with personal and/or family history of the fibrolamellar variant of hepatocellular carcinoma in association with family history of other LFS core cancers.

Acknowledgments: FRV is recipient of a Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant 486599/2012– 4, and a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) grant E26/110.535/2012. RCA is recipient of a Ministério da Saúde / Instituto Nacional de Câncer grant.

References

- 1 - Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358–62.
- 2 - Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994;54:1298–1304.
- 3 - Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995;25:101–24.
- 4 - Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J. Clin. Oncol.* 2009;27:e108–9; author reply e110.
- 5 - Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 2007;28:622–9.
- 6 - Ruijs MWG, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Genet* 2010;47:421e428.
- 7 - El-Serag HB, D'Avila JA. Is fibrolamellar carcinoma different from hepatocellular carcinoma? A US population-based study. *Hepatology.* 2004;39:798–803.
- 8 - Craig JR, Peters RL, Edmondson HA, et al. Fibrolamellar carcinoma of the liver: a tumor of adolescents and young adults with distinctive clinico-pathologic features. *Cancer.* 1980;46(2):372-9.
- 9 - Ward SC, Waxman S. Fibrolamellar carcinoma: a review with focus on genetics and comparison to other malignant primary liver tumors. *Semin Liver Dis.* 2011;31:61–70.
- 10 - Honeyman JN, Simon EP, Robine N, et al. Detection of a recurrent DNAJB1-PRKACA chimeric transcript in fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Science* 2014;343:1010–4.
- 11 - Xu L, Hazard FK, Zmoos A-F, Jahchan N, Chaib H, Garfin PM, et al. Genomic analysis of fibrolamellar hepatocellular carcinoma. *Hum Mol Genet.* 2015;24:50–63.
- 12 - Ozen C, Yildiz G, Dagcan AT, Cevik D, Ors A, Keles U, et al. Genetics and epigenetics of liver cancer. *N Biotechnol.* 2013;30:381–4.
- 13 - Vivekanandan P, Torbenson M. Epigenetic instability is rare in fibrolamellar carcinomas but common in viral-associated hepatocellular carcinomas. *Mod Pathol.* 2008;21:670–5.
- 14 - Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol.* 2015;33(21):2345-52.
- 15 - Mitchell G, Ballinger ML, Wong S, et al. High frequency of germline TP53 mutations in a prospective adult-onset sarcoma cohort. *PLoS One* 2013;8:e69026.
- 16 - Yurgelun MB, Masciari S, Joshi VA, et al. Germline TP53 mutations in patients with early-onset colorectal cancer in the Colon Cancer Family Registry. *JAMA Oncol.* 2015;1(2):214-221.

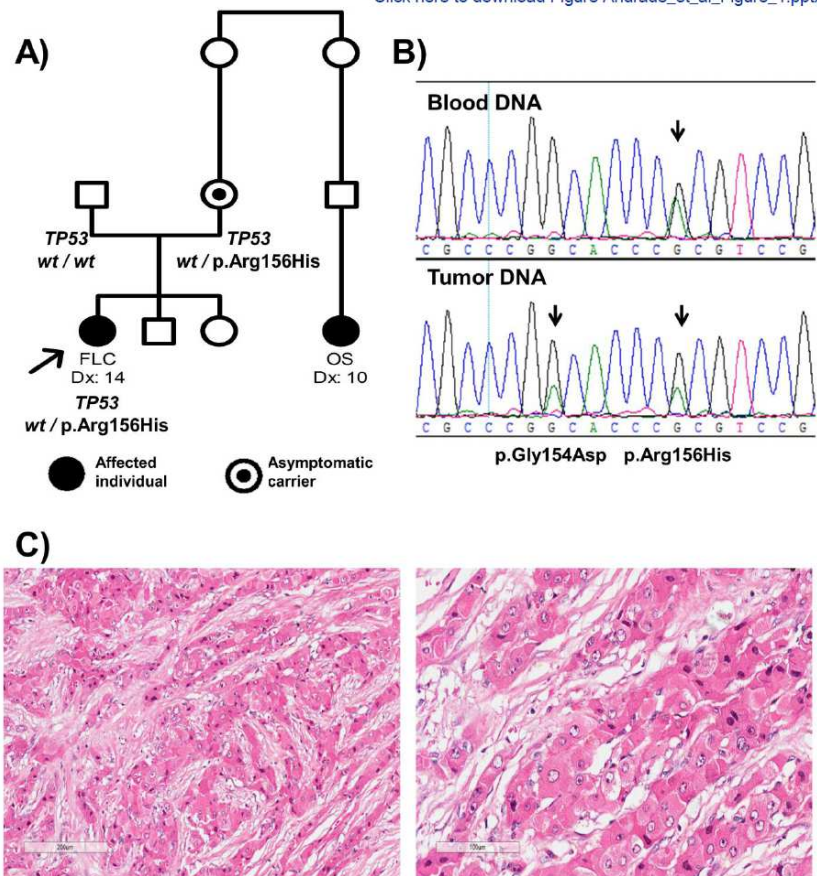
Figure legends

Figure 1. Pedigree of the patient's family, *TP53* analysis and histopathology of the tumor. **A)** The proband and her mother were carriers of the *TP53* p.Arg156His (c.467G>A) mutation in exon 5. FLC: Fibrolamellar carcinoma. OS: Osteosarcoma. Dx: Age at diagnosis (years). Wt: wild type allele. **B)** Electropherograms of the patient's blood and tumor DNA. The image shows the germline p.Arg156His (c.467G>A) in *TP53* and the somatic additional mutation p.Gly154Asp (c.461G>A), both in exon 5. **C)** H&E staining of the patient's tumor. The oncocytic cells are surrounded by the lamellar pattern of fibrosis characteristic of the fibrolamellar carcinoma. Left: Original magnification of 20X. Right: Original magnification of 40X.

Figure 1 (re-numbered)

[Click here to download Figure Andrade_et_al_Figure_1.pptx](#)

Andrade et al
FIGURE 1



Manuscrito 2 (em preparo)

Prevalence of *TP53* R337H Founder Mutation in Breast, Colorectal, and Retinoblastoma cancer patients in Rio de Janeiro

*Raissa Coelho Andrade¹

*Marion Kielmanowicz Amazonas¹

Miguel Ângelo Martins Moreira¹

Fernando Regla Vargas^{1,2,3}

¹Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil;

²Genetics and Molecular Biology Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

³Birth Defects Epidemiology Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil.

*These authors contributed equally for this study.

Corresponding author: Fernando Regla Vargas: fernando.vargas@ioc.fiocruz.br
Av. Brasil 4365 – Pavilhão Leônidas Deane sala 617, Manguinhos, 21040-900 –Rio de Janeiro, RJ – Brazil. Phone/Fax: +552138658121

Acknowledgments: FRV is a recipient of the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant 486599/2012-4 and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) grant E26/110.535/2012. RCA and MKA are recipients of Ministério da Saúde / Instituto Nacional de Câncer grants. We thank Dr. Patricia Ashton Prolla for gently giving in *TP53* R337H positive control samples for our RFLP essay.

Abstract

In Brazil, a germline founder mutation in *TP53*, R337H, is estimated to occur in 0,3% of the population from southern States, representing a major issue for Public Health in this country. That emphasizes the need of larger studies to define the differential patterns of occurrence of this mutation throughout Brazil. In the present study, we aimed to investigate the frequency of the R337H mutation in three cancer cohorts from Rio de Janeiro, to contribute to the epidemiological characterization of LFS/LFL in Brazil. RFLP essays were performed with blood DNA samples collected from three groups of patients: (1) 126 patients with breast cancer that were referred for genetic counseling because of suspicion of hereditary ovary and breast cancer syndrome and had no pathogenic mutations in *BRCA1/BRCA2*; (2) 291 patients with colorectal cancer and (3) 81 patients with retinoblastoma, collected consecutively. Our results disclosed no carriers of the R337H. Additional data from a control group of 92 individuals also revealed no carriers. We discuss the possibility of a lower frequency of the R337H mutation in Rio de Janeiro in relation to other States from South and Southeastern Brazil investigated so far. There is still uncertainty about the age of this mutation, the region where it first occurred and how it spread through the country. Epidemiological studies in this matter will be important to develop adequate strategies of surveillance for individuals at risk.

Introduction

Germline mutations in *TP53* result in the hereditary cancer predisposition conditions known as Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes (LFS/LFL). Phenotypes associated to these mutations involve a wide variety of cancers at young ages: approximately 80% of *TP53* mutation carriers will have developed cancer by age 50 [1], and the risk of secondary malignancies is also high, especially in individuals previously exposed to radiotherapy [2,3]. These facts address the need to establish adequate protocols for cancer risk assessment and tumor surveillance for these individuals.

While the frequency of germline *TP53* mutations was estimated to be 1:10.000 to 1:25.000 in North America and Europe [4,5], in Brazil, the occurrence of a founder mutation in *TP53*, R337H, is responsible for an unusually high frequency of the syndrome in this country. The *TP53* R337H (c.1010G>A), occurs in the exon 10 of the gene, and alters the structure of the oligomerization domain of the p53 protein. This mutation was first described in children with adrenocortical carcinoma in the Southern region of Brazil [6], and later studies have shown it also predisposes to a wide spectrum of tumors, including typical LFS cancers like sarcomas, brain and breast cancers [7,8], and also cancers that are not usually seen in carriers of other *TP53* mutations, like renal and thyroid cancers [7].

Genotyping of control groups from southern Brazil revealed a prevalence of 0,3% for *TP53* R337H [9,10]. Although this mutation seems less penetrant in young individuals than mutations hitting the DNA binding domain of p53 [8], it represents a major issue for Public Health in this country. These data led to the consideration of inserting the R337H genotyping in newborn screening protocols, although larger studies are needed to best describe the differential patterns of occurrence of R337H in different regions of Brazil and the phenotypes associated to this mutation [11]. In the present study, we aimed to investigate the frequency of the R337H mutation in three cancer cohorts from Rio de Janeiro, to contribute to the epidemiological characterization of LFS/LFL in Brazil.

Patients and Methods

Three cohorts of patients were included in this study: 126 unrelated patients with breast cancer (BC), 291 unrelated patients with colorectal cancer (CRC) and 81 unrelated patients with Retinoblastoma (RB), treated at Instituto Nacional de Câncer (INCA), Rio de Janeiro, Brazil. The patients with breast cancer were referred for Genetic Counseling services for suspicion of Hereditary Breast and Ovarian Cancer (HBOC), and *BRCA1/BRCA2* screening in these patients had not disclosed pathogenic mutations. The patients with

colorectal cancer and retinoblastoma were unselected for familial history of cancer, and collected consecutively. All procedures performed were in accordance with the ethical standards of the institutional research committee and informed consent was obtained from all individual participants or from their legal guardians. We additionally screened 92 individuals with no history of cancer as a control group.

Amplification of *TP53* exon 10 was performed using blood DNA samples available from all the individuals, following standards procedures and primer sequences described at the IARC *TP53* database: forward primer P-E10Li: 5'-caattgtaactgaaccatc-3' and reverse primer P-562: 5'-ggatgagaatggaatcctat-3' [12]. Genotyping was performed using the restriction enzyme *HhaI* (Life Technologies®), which cleaves the wild-type fragment of 260 bp in two fragments of 92 and 168 bp. When the substitution c.1010G>A occurs, the recognition sequence of the enzyme is abolished, and the fragment is not cleaved. Positive control samples were used in every essay.

Results

None of the patients genotyped exhibited the *TP53* R337H mutation. A Clinical characterization of the patients is disposed in table 1. The genotyping of the control individuals (52 women and 40 men) also disclosed no carriers of the *TP53* R337H.

Table 1. Clinical information of the patients screened for *TP53* R337H.

Cohort	N	Men (%)	Women (%)	Mean dx (std)
Breast cancer	126	6 (4.8%)	120 (95.2%)	45.2 (±10.3)*
Colorectal cancer	291	142 (48.8%)	149 (51.2%)	61.4 (±12.3)
Retinoblastoma	81	36 (44.4%)	45 (55.6%)	2.1 (±2.0)

Dx: age at diagnosis. STD: Standard deviation. *Age at diagnosis was not available for two patients.

Discussion

Our study aimed to investigate the frequency of the *TP53* R337H in cancer cohorts from Rio de Janeiro, Southeastern Brazil. The allelic frequency of this mutation in Southern Brazil is estimated to be 0,0015. This result was the same in two different States from this geographic region: in a control group of 750 women from Rio Grande do Sul [9] and in 171,649 newborns from Paraná [10]. Compared to estimates from USA and the United Kingdom [4,5], R337H is at least 30 times more frequent than any other *TP53* pathogenic mutation in a given population. Given the importance of this datum for clinical practice in Brazil, and the vast continental extension of the country, differences in the geographic regions concerning this mutation must be well determined.

Our preliminary data suggest that the frequency of this mutation in Rio de Janeiro might be lower than in other States from Brazil. Perhaps the most informative cohort from our study was the 126 patients with breast cancer and no pathogenic mutations in *BRCA1/BRCA2*. Breast cancer is the most frequent tumor among *TP53* mutation carriers [12], and the R337H mutation has been shown to occur in 8.6% of Brazilian patients with this cancer, from diverse geographic regions and irrespective of familial history of cancer [13]. In São Paulo, this mutation was found in 2.4% to 7.1% of patients with breast cancer referred for genetic counseling [14–16]. A previous study has also reported an apparent lower frequency of this mutation in breast cancer patients from Rio de Janeiro in comparison to Southern States [17]. Also, CRC, although not belonging to LFS core cancers, was reported as a common event in *TP53* mutation carriers [18,19], and its inclusion in surveillance protocols was suggested for LFS/LFL Brazilian families [19]. Even so, none of our patients with CRC exhibited the R337H.

Although retinoblastoma has not been linked to LFS/LFL so far, the most frequent mutated gene in this cancer, *RBI*, shares a common pathway with *TP53*, and germline mutations in either of these genes predispose to sarcomas, the most well recognized core cancer of LFS [20]. This led us to investigate the R337H mutation in patients with this cancer. A previous study from our Institution also screened this mutation in blood DNA samples from 46 patients with Wilms tumor, a pediatric cancer that has been reported as more frequent in families segregating *TP53* germline mutations [21]. None of the patients with RB or WT at INCA carried the R337H. It has been reported that the phenotypes associated to the R337H mutations are slightly different from those of mutations hitting in the DNA-binding domain of the protein, with tumors not usually associated to LFS being relatively frequent in R337H families [7]. Recently, this mutation was reported in 8.4% (7/83) of patients with neuroblastoma, a pediatric cancer rarely reported in LFS, in São Paulo, Southeastern Brazil [22].

In previously reported LFS/LFL Brazilian families, mostly from São Paulo and Rio Grande do Sul (42/45), R337H was found in 13.3% of the probands [7]. Probands from 39 families with LFS/LFL clinical criteria treated at our Institution were investigated in a previous study (data not shown), disclosing only one carrier (2.6%) of the R337H. This patient had developed an adrenocortical carcinoma.

The R337H mutation has been screened in several cancer cohorts in Southern and Southeastern Brazil so far (Box 1, Figure 1). It is important to state that the centers developing these investigations, as well as our Institution, are reference centers who receive patients from several states from Brazil. That implies a considerable bias when trying to

estimate the frequency of R337H in each region of Brazil based on these studies. Even so, we can assume the majority of patients treated in these institutions reside in the corresponding States, considering the geographical difficulties of access for patients from other regions. Also, it has been reported in Paraguay, although with a lower frequency than in Southern Brazil (Figure 1) [23], and in two of 60 cases of pheochromocytoma (3.3%) in the UK [24]. It has been hypothesized that the spread of the R337H mutation accompanied the development of cities and villages along the road axis between São Paulo and Rio Grande do Sul, that also includes the States of Paraná and Santa Catarina [8]. That would be compatible with an apparent lower frequency of this mutation outside those States. It is unclear, though, whether this mutation would have arisen in Brazil, and spread throughout the country only by internal migration; or in Europe, being latter brought to this territory [8,25].

A more detailed analysis of STR markers in R337H carriers showed that the haplotype carrying the mutation has a Caucasian/Iberic/Portuguese origin, and the authors estimated the age of the mutation in 2,000 years (72-84 generations ago), what is 1,500 years before the Brazilian colonization. In this context, R337H could have been introduced in Brazil by different carriers. This is supported by the genetic variability observed in the Brazilian R337H haplotypes [25]. If we consider this hypothesis, the current geographic location of the families with this mutation would be associated not only to inter-regional migration patterns in Brazil, but also to the differential distribution of Portuguese immigrants in the country since the beginning of colonization.

It is known that the Brazilian population is composed by the admixture of three major parental populations: Amerindians, Europeans and Africans. Although European genetic ancestry is the most prevalent in urban populations of all regions of Brazil, there are important inter-regional differences. In general, the European genetic ancestry decreases in from South towards North Brazil [34,35], which reflects the differences in dispersion of European contingents that immigrated since the XVI century [36]. The capital of Rio de Janeiro is located 429 kilometers north of São Paulo, and 1,552 kilometers north of the capital of Rio Grande do Sul. Among the four states in southeastern Brazil, the population of Rio de Janeiro has the greater genetic distance from the European parental population, followed by Minas Gerais [34], which would be consistent with a lower frequency R337H in those States. Indeed, a recent study conducted with 513 controls and 103 ovarian cancer patients from Minas Gerais disclosed no carriers of *TP53* R337H [37]. Further studies with larger samples are needed to better clarify these differences, especially in regions other than South and Southeast of Brazil.

Box 1. Tumor types associated to the *TP53* R337H mutation in studies developed in Brazil.

Region	City of the center of enrollment of patients	Pediatric Adrenocortical tumors	Familial Breast Cancer	Breast Cancer	Other cohorts
South	Porto Alegre (RS)	9/11 (81.8%) [26]	2/59 (3.4%) [13]	8/148 ^{1,2} (5.4%) [27] 17/293 (5.8%) [13]	Choroid plexus carcinoma: 2/2 (100%) [26]
	Curitiba (PR)	35/36* (97.2%) [6] 40/40** (100%) [28]			Choroid plexus carcinoma: 14/22 (63.6%) [29]
Southeast	São Paulo (SP)	14/18 ¹ (77.8%) [30]	3/120 (2.5%) [15]	50/238 ¹ (21.0%) [13]	Adrenocortical carcinoma (adults) ¹ : 5/37 (13.5%) [30] Probands from families with LFS/LFL criteria ² : 6/45 (13.3%) [7]
	Campinas (SP)	65/70 (92.9%) [31]	2/45 (4.4%) [14]	1/78 (1.3%) [14]	Choroid plexus carcinoma: 9/13 (69.2%) [31] Osteosarcoma: 3/41 (7.3%) [31] Neuroblastoma: 7/83 (8.4%) [22]
	Ribeirão Preto (SP)	12/16 (75%) [32]	2/28 (7.1%) [16]		Adrenocortical carcinoma (adults): 1/5 (20%) [32]
	Barretos (SP)			3/284 ¹ (1.1%) [13]	
	Rio de Janeiro (RJ)		0/126 (0%) [This study]	2/390 (0.5%) [17]	Probands from families with LFS/LFL criteria: 1/39 (2.6%) [38]
Northeast	Salvador (BA)		1/101 ³ (1.0%) [33]		

LFS/LFL: Li-Fraumeni syndrome and Li-Fraumeni like syndrome. *from 34 families. **from 30 families.

¹Considering DNA from both tumor and/or non-tumor tissues.

²These were actually multicentric studies. We classified them based on the location of the major center of enrollment of patients, but they also included centers from other States in Brazil.

³Considering only patients with breast cancer.

References:

- [1] Hwang S-J, Lozano G, Amos CI, Strong LC. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. *Am J Hum Genet* 2003;72:975–83. doi:10.1086/374567.
- [2] Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:606–11.
- [3] Chompret A, Brugières L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichay F, Abel A, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 2000;82:1932–7. doi:10.1054/bjoc.2000.1167.
- [4] Gonzalez KD, Noltner K a, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol* 2009;27:1250–6. doi:10.1200/JCO.2008.16.6959.
- [5] Mai PL, Malkin D, Garber JE, Schiffman JD, Weitzel JN, Strong LC, et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. *Cancer Genet* 2012;205:479–87. doi:10.1016/j.cancergen.2012.06.008.
- [6] Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:9330–5. doi:10.1073/pnas.161479898.
- [7] Achatz MIW, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 2007;245:96–102. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.039.
- [8] Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 2010;31:143–50. doi:10.1002/humu.21151.
- [9] Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MIW, Olivier M, Martel-Planche G, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 2008;261:21–5. doi:10.1016/j.canlet.2007.10.044.
- [10] Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol* 2013;31:2619–26. doi:10.1200/JCO.2012.46.3711.
- [11] Achatz MIW, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol* 2009;10:920–5. doi:10.1016/S1470-2045(09)70089-0.
- [12] Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian S V, Hainaut P, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007;28:622–9. doi:10.1002/humu.20495.
- [13] Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CABT, Koehler-Santos P, Palmero EI, Zagonel-Oliveira M, et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One* 2014;9:e99893. doi:10.1371/journal.pone.0099893.
- [14] Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, et al.

- Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* 2008;8:357. doi:10.1186/1471-2407-8-357.
- [15] Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos EM, Krepischi AC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet* 2014;15:55. doi:10.1186/1471-2350-15-55.
- [16] Cury NM, Ferraz VE, Silva WA. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hered Cancer Clin Pract* 2014;12:8. doi:10.1186/1897-4287-12-8.
- [17] Gomes MC, Kotsopoulos J, de Almeida GL, Costa MM, Vieira R, Filho F de A, et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. *Hered Cancer Clin Pract* 2012;10:3. doi:10.1186/1897-4287-10-3.
- [18] Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, et al. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology* 2006;130:73–9. doi:10.1053/j.gastro.2005.10.014.
- [19] Achatz M. No Title. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 2008.
- [20] Kleinerman RA, Schonfeld SJ, Tucker MA. Sarcomas in hereditary retinoblastoma. *Clin Sarcoma Res* 2012;2:15. doi:10.1186/2045-3329-2-15.
- [21] Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 2001;20:4621–8. doi:10.1038/sj.onc.1204621.
- [22] Seidinger AL, Fortes FP, Mastellaro MJ, Cardinalli IA, Zambaldi LG, Aguiar SS, et al. Occurrence of Neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. *PLoS One* 2015;10:e0140356. doi:10.1371/journal.pone.0140356.
- [23] Legal EF, Ascurra M, Custódio G, Ayala HL, Monteiro M, Vega C, et al. Prevalence of an inherited cancer predisposition syndrome associated with the germ line TP53 R337H mutation in Paraguay. *Cancer Epidemiol* 2015;39:166–9. doi:10.1016/j.canep.2015.01.005.
- [24] Luchetti A, Walsh D, Rodger F, Clark G, Martin T, Irving R, et al. Profiling of somatic mutations in pheochromocytoma and paraganglioma by targeted next generation sequencing analysis. *Int J Endocrinol* 2015;2015:138573. doi:10.1155/2015/138573.
- [25] Paskulin DD, Giacomazzi J, Achatz MI, Costa S, Reis RM, Hainaut P, et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. *PLoS One* 2015;10:e0143262. doi:10.1371/journal.pone.0143262.
- [26] Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, Alemar B, Santos-Silva P, Pereira FS, et al. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer* 2013;119:4341–9. doi:10.1002/cncr.28346.
- [27] Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, Graudenz MS, Rivero LF, Lima E, et al. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Arch* 2013;463:17–22. doi:10.1007/s00428-013-1439-8.
- [28] Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 2006;43:91–6. doi:10.1136/jmg.2004.030551.
- [29] Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, Gugelmin ES, Oliveira Figueiredo MM, Watanabe F, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline

- TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One* 2011;6:e18015. doi:10.1371/journal.pone.0018015.
- [30] Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:4970–3. doi:10.1210/jcem.86.10.7957.
- [31] Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, Godoy Assumpção J, Aparecida Cardinalli I, Aparecida Ganazza M, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. *Cancer* 2011;117:2228–35. doi:10.1002/cncr.25826.
- [32] Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LLK. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res = Horm Und Stoffwechselforsch = Horm Métabolisme* 2005;37:231–5. doi:10.1055/s-2005-861373.
- [33] Felix GE, Abe-Sandes C, Machado-Lopes TM, Bomfim TF, Guindalini RSC, Santos VCS, et al. Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Hum Genome Var* 2014;1:14012. doi:10.1038/hgv.2014.12.
- [34] Saloum de Neves Manta F, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmüller de Araújo A, Leite Góes Gitaí D, Aparecida da Silva D, et al. Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels. *PLoS One* 2013;8:e75145. doi:10.1371/journal.pone.0075145.
- [35] Santos NPC, Ribeiro-Rodrigues EM, Ribeiro-Dos-Santos AKC, Pereira R, Gusmão L, Amorim A, et al. Assessing individual interethnic admixture and population substructure using a 48-insertion-deletion (INSEL) ancestry-informative marker (AIM) panel. *Hum Mutat* 2010;31:184–90. doi:10.1002/humu.21159.
- [36] Levy MS. [The role of international migration on the evolution of the Brazilian population (1872 to 1972)]. *Rev Saúde Pública* 1974;Suppl:49–90.
- [37] Schayek H, De Marco L, Starinsky-Elbaz S, Rossette M, Laitman Y, Bastos-Rodrigues L, et al. The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. *Cancer Genet* 2015. doi:10.1016/j.cancergen.2015.11.003.
- [38] Andrade RC, Dos Santos AC, de Aguirre Neto JC, Nevado J, Lapunzina P, Vargas FR. TP53 and CDKN1A mutation analysis in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes. *Fam Cancer*. 2016 Oct 6. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 27714481.

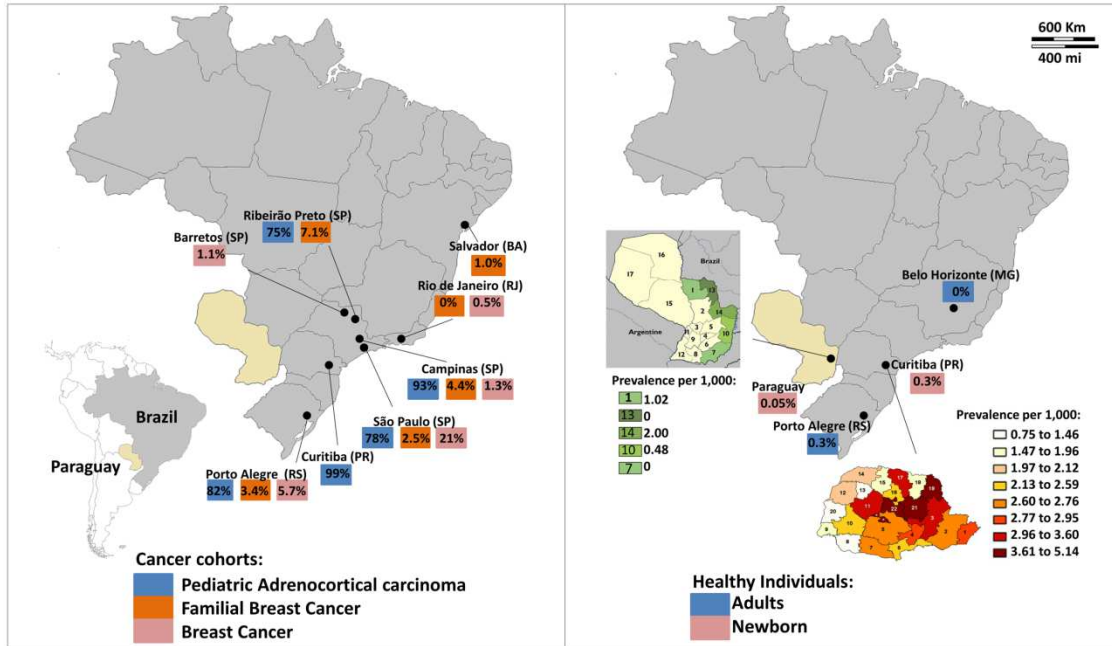


Figure 1. Prevalence of R373H mutations in different cohorts from South America. The map representing healthy individuals was adapted from references 10 and 23.

Manuscrito 3 (em preparo)

Targeted next generation sequencing in *TP53*-negative probands suggestive of Li-Fraumeni syndrome

Raissa Coelho Andrade¹ (randrade.inca@gmail.com)

Carolina Furtado Torres da Silva¹ (carolfts@gmail.com)

Hector Nicolas Seuánez Abreu^{1,2} (hseuanez@inca.gov.br)

*Fernando ReglaVargas^{1,3,4} (fernando.vargas@ioc.fiocruz.br)

*Corresponding author.

¹Genetics Division, Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brazil;

²Genetics Department, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

³Genetics and Molecular Biology Department, Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil;

⁴Birth Defects Epidemiology Laboratory, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

Competing interests: None.

Acknowledgments: We thank the staff of the Genetics Division of Instituto Nacional de Câncer for enabling the development of the study, and in special Albert REAN Menezes for the help with NGS data. We thank FAPERJ for FRV's grant, and INCA/MS for RCA's grant.

Abstract

Introduction: Several clinical criteria were developed to indicate *TP53* screening in patients suspected of Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes (LFS/LFL). Among them, the revised Chompret criteria figures as the most sensitive. However, the genetic alterations beneath these clinical criteria in *TP53*-negative patients remain to be unraveled. **Material and Methods:** We searched for potentially pathogenic mutations in eleven patients from families fulfilling the revised Chompret criteria who did not exhibit *TP53* mutations, by high throughput sequencing of 124 cancer-related genes. Protein-changing variants with a frequency <0.01 were considered for *in silico* evolutionary conservation analysis and manually referenced to published studies and/or mutation databases. **Results:** Thirty-four potentially pathogenic variants were found in 21 genes. None of them were clearly stated as pathogenic in the literature. Four of them occurred in two well-known cancer-predisposition genes: one in *BRCA1* (F1761S) and three in *ATM* (S49C, C532Y, and the novel mutation E2087A). *In vitro* studies support the pathogenicity of *BRCA1* F1761S. Two of the patients with *ATM* mutations developed second malignancies after radiation exposure, resembling this feature of germline *TP53* mutation carriers. Novel mutations were observed in *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* and *PTPRC*. Further studies are needed to confirm the clinical impact of these mutations. **Conclusion:** The variety of cancers associated to germline mutations in *TP53* makes it a challenge to determine specific clinical criteria for *TP53* screening. High-throughput technologies are effective tools to identify the underlying genetic variants associated to LFS/LFL phenotypes individually in the absence of *TP53* germline mutations, since no clear second *locus* is related to the syndrome.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, Li-Fraumeni like syndrome, *TP53*, next generation sequencing.

Introduction

TP53 germline mutations are responsible for the hereditary cancer predisposition disorder known as Li-Fraumeni syndrome (LFS) [1]. These mutations confer variable phenotypes to the carriers, what made several authors develop different clinical criteria to indicate *TP53* screening. These clinical standards went from the most stringent classic LFS criteria [2] to the more flexible Li-Fraumeni like (LFL) clinical criteria [3–5].

The progress of such studies led to the development of the revised Chompret criteria for *TP53* testing [6]. These have been reported as the most sensitive in predicting the occurrence of a *TP53* pathogenic mutation in a given individual. The Chompret criteria include a proband with a tumor of the LFS spectrum (i.e. sarcoma, brain tumor, premenopausal breast cancer, adrenocortical carcinoma, leukemia, lung bronchoalveolar cancer) before age 46 **AND** at least one 1st or 2nd degree relative with any LFS tumor (except breast cancer if the proband has breast cancer) before age 56 or with multiple tumors; **OR** a proband with multiple tumors (except multiple BC), two of which belong to the LFS spectrum, the first before age 46; **OR** a proband with adrenocortical carcinoma and/or choroid plexus tumor regardless of family history.

On the other hand, a large proportion of individuals (20-80%) that fulfill the clinical standards for *TP53* testing do not exhibit pathogenic mutations in this gene. With that in mind, several other genes have been investigated to define what genetic alterations could mimic *TP53* germline mutations phenotypes. Until this moment, though, *TP53* remains the only gene conclusively related to this disorder [7]. We searched for potentially pathogenic mutations in 124 cancer-related genes in a cohort of eleven patients that fulfilled the revised Chompret criteria but did not exhibit *TP53* mutations.

Material and Methods

Patients: Eleven patients that fulfilled the revised Chompret criteria, and that were previously tested for mutations in coding and intronic flanking regions of *TP53*, as well as for copy number variations in this gene by MLPA (SALSA kit P105-D1, MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands), and who disclosed negative results. The study was approved by the local Institutional Review Board, and subjects were included after discussion and signature of the informed consent by the probands and/or their parents or legal guardians.

Next generation sequencing (NGS): The probands were submitted to NGS using a PCR enrichment panel designed for the coding regions of 124 cancer-related genes (NGHS-501Z, Qiagen®, Valencia, CA, USA). The libraries preparation was performed according to the

manufacturer's protocol, and 2 nM of each library was sequenced with 100-bp paired end reads on a HiSeq2500 platform (Illumina®, San Diego, CA, USA). Variant calling was performed in the Qiagen's platform (<http://ngsdataanalysis.sabiosciences.com/NGS2>), and high confidence variants which fulfilled the following criteria were selected for further analysis:

Exonic variants (indels or non-synonymous substitutions) or splice site variants within ± 2 bp away from exon/intron boundary. Also, these variants should not occur within the 1000 Genomes (1000G) database with a global minor allele frequency (MAF) greater than 0.01. Indels, nonsense, and splice site mutations would be considered pathogenic. Missense variants were further filtered according to two levels of *in silico* evidence:

(1) **aminoacid** conservation and protein structure prediction softwares SIFT (<http://sift.bii.a-star.edu.sg/>) and PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) were assessed, and a given variant was considered deleterious when either prediction tool classified it this way; (2) **nucleotide** conservation was assessed through the PhyloP and PhastCons scores. A variant was considered deleterious when either score had shown it as conserved.

Variants considered deleterious both by missense prediction tools and nucleotide conservation scores were predicted as potentially pathogenic, and manually referenced to published studies and/or mutation databases (*ClinVar*, LOVD, HGMD, and *Breast Cancer Information Core* for variants in *BRCA1* and *BRCA2*). The final classification of the variants was determined according to ACMG guidelines [8]: benign, likely benign, uncertain significance, likely pathogenic and pathogenic. After excluding the mutations classified as benign/likely benign, we prioritized mutations in known cancer predisposing genes and/or novel mutations for validation by Sanger sequencing.

Results

The coverage of the targeted regions by ≥ 10 reads was at least 97% for all eleven probands, and the coverage by ≥ 30 reads was at least 94%. The mean number of variants found in the group was 543 (standard deviation of ± 49). After applying the filtering criteria on the variants detected, no clear loss-of-function mutations (nonsense, indels, or frameshift) or splice site variants were disclosed. We came to a final set of 34 missense variants in 21 genes (Supplementary box 1). Six of them were classified as benign or likely benign: four in *BRCA2* (p.S976I, p.H2116R, p.I2944F, p.A2951T), one in *CREBBP* (p.L551I) and one in *PDGFRA* (p.G79D). One mutation in *BRCA1* (p.F1761S), found in proband #15 (Figure 1), was classified as likely pathogenic supported by *in vitro* and population frequency data. The remaining variants filtered as possibly pathogenic were considered variants of uncertain

significance (USV), since we did not find sufficient data in the literature to classify these variants as benign or as disease-causing mutations (Supplementary box 1). Three of these variants were in *ATM* (p.S49C, p.C532Y, and the novel p.E2087A). Importantly, two patients with *ATM* mutations developed second malignancies posteriorly to radiotherapy for their first tumors (patients #06 and #33 - Figure 1). Besides, novel mutations were found in *SETD2* (p.R2040G), *PIK3C2A* (p.T1431P), *SMO* (p.R168G) and *PTPRC* (p.R1107I). These four mutations were validated by Sanger sequencing, as well as the mutations found in *ATM* and *BRCA1* (Supplementary Figure 1). The primer sequences used for this validation are available in Supplementary box 2.

Discussion

We searched for mutations in 124 cancer-related genes in a group of patients fulfilling the revised Chompret criteria for *TP53* testing, who had shown no evidence of *TP53* pathogenic mutations. Potentially pathogenic variants were found in a heterogeneous group of genes. Among them, there were the two well-known hereditary cancer predisposition genes *BRCA1* and *ATM*, besides *SETD2*, *PIK3C2A*, *SMO* and *PTPRC*, which revealed novel mutations.

Proband #06, who carried the novel *ATM* mutation E2087A, had a typical personal history of cancer indicative of *TP53* screening (Figure 1), with two LFS core cancers (medulloblastoma and osteosarcoma) occurring at a young age. This sequence variation was not found in the 1000 genomes project. Absence of immunohistochemical expression of *ATM* was previously associated with rhabdomyosarcoma [9]. More recently, a patient with ataxia-telangiectasia, carrier of biallelic *ATM* mutations, was reported to have two first-degree cousins who developed a rhabdomyosarcoma, and a medulloblastoma, respectively. The child with rhabdomyosarcoma was a heterozygote carrier of one of the mutations (D2708N) found in his cousin. Assays using lymphoblastoid cultures from two mutation carriers in this family revealed cellular radiosensitivity [10]. Proband #33 developed breast cancer and a soft tissue sarcoma (dermatofibrosarcoma protuberans) under the age of 50, and was a carrier of *ATM* S49C mutation. In spite of its relative high prevalence (0.2-1.7%) in some populations, S49C was previously reported as a breast cancer susceptibility allele [11,12].

Interestingly, both probands #06 and #33 had received radiotherapy as part of the treatment for their first tumors, in areas close to those where their second tumors developed. Given the results found here, and since ionizing radiation sensitivity is a known feature both for carriers of *ATM* and *TP53* germline mutations [7,13], we believe the screening of *ATM*

should be considered in LFS/LFL patients where no *TP53* mutation was found, especially in the occurrence of tumors secondary to radiotherapy.

Proband #41 developed breast cancer at age 42, and was a carrier of *ATM* C532Y. This substitution has a frequency of 2/10,000 in dbSNP. The proband has relatives with early-onset breast cancer (sister) and pediatric leukemia (niece), two neoplasias associated with *ATM* mutations. This proband was also a carrier of a previously undescribed substitution in *SETD2* gene: R2040G. *SETD2* is a histone modifier gene, non-redundantly responsible for the trimethylation of histone 3 lysine 36 (H3K36). *SETD2* protein interacts with p53, and regulates *TP53* target genes [14]. Reduced expression of *SETD2* was observed in a breast cancer tumor sample [15], and somatic mutations have recently been observed in malignant phyllodes breast tumor [16]. Also, heterozygote germline mutations in *SETD2* were detected in two patients with a Sotos like overgrowth syndrome [17]. Another mutation in *SETD2* (p.C394R) was observed in proband #65, the only patient in our series that also fulfilled the classical criteria for LFS [2], the most specific clinical standard for indicating *TP53* testing.

Proband #15 developed breast cancer and clear cell renal cancer at age 62. She was a carrier of *BRCA1* F1761S substitution. This variation was not found in reference populations according to the 1000 genomes project, and functional assays have described it as deleterious [18], which made us classify it as likely pathogenic. The fact that breast cancer is a core cancer of LFS results in an overlap of clinical criteria for LFS/LFL and Hereditary Breast and Ovarian cancer (HBOC) in many families [19]. The last one is associated to mutations in *BRCA1* and *BRCA2* [19].

Proband #51 developed oligodendroglioma at age 9, and his grandmother had breast cancer at age <40. This proband was a carrier of the previously undescribed p.T1431P substitution in *PIK3C2A* gene. This gene is part of the phosphatidylinositol3kinase/AKT/mTOR pathway (PIK3-AKT), which is frequently abnormal in breast cancer [20]. Somatic activating mutations in another gene of the same pathway, *PIK3CA*, are responsible for a spectrum of segmental overgrowth syndromes such as CLOVES syndrome (MIM #612918) [21], associated to a higher risk of cancer. Also, germline mutations in *PIK3CA* were observed in patients with Cowden syndrome (MIM #158350) phenotype, which includes early-onset breast cancer and cerebellar hamartoma (Lhermitte-Duclos), among other findings [22]. Importantly, anaplastic oligodendroglioma was reported at least once in a child with Cowden syndrome phenotype and a germline mutation in *PTEN*, the main gene associated with this disorder [23].

Proband #10, who developed a pediatric osteosarcoma, exhibited the novel mutation p.R168G in *SMO*, in the same codon as the mutation exhibited by patient #41. Mutations in

SMO or on its counterpart genes that result in overbalance of the hedgehog pathway have been observed in tumors such as basal cell carcinoma and medulloblastoma [24]. Osteosarcoma cell lines and biopsy specimens have shown overexpression of the hedgehog pathway target genes, and the use of cyclopamine, a specific inhibitor of *SMO* protein, prevented tumor cell growth *in vitro*. Also, *SMO* knockdown through shRNA inhibited *in vitro* and *in vivo* growth of these cells, suggesting a new target in the treatment of osteosarcoma [25].

Mutation p.R1107I in *PTPRC* was exhibited by proband #01, who developed a pediatric synoviosarcoma, and whose mother had developed bilateral breast cancer. This gene encodes the tyrosine phosphatase CD45, regulator of B- and T-cell receptor signaling. Loss-of-function mutations in this gene have shown to be associated to T-cell acute lymphoblastic leukemia [26].

Further studies are needed to confirm the clinical impact of the mutations found in our work. Until now, no other gene rather than *TP53* was consistently associated to LFS/LFL [27]. Given the complex variability of these phenotypes, we may expect that different genes might sporadically carry pathogenic mutations in *TP53*-negative LFS/LFL cohorts, depending on specific patterns of tumor occurrence. For example, Aury-Landas et al described a frequency of 6.3% of novel copy number variations overlapping genes with chromatin remodelling function in *TP53*-negative patients with the Chompret LFL criteria, and these alterations were strongly associated to brain tumors [28]. Likewise, a pathogenic mutation in *POT1*, which regulates telomere length, was associated to cancer predisposition in four LFL families, three of which had cases of cardiac angiosarcoma [29].

We may also suppose that some of these familial aggregations of cancer may occur by chance, with several variants playing small synergistic effects on cancer predisposition. Either in the context of high impact mutations in sporadic *loci* or small impact variants in several genes, high-throughput technologies will become likely more necessary to identify underlying genetic events associated to particularities in LFS/LFL phenotypes, since a large number of genes will need to be investigated in the absence of *TP53* mutations.

References:

- [1] Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990;250:1233–8.
- [2] Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988;48:5358–62.
- [3] Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994;54:1298–304.
- [4] Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 1995;25:101–24.
- [5] Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugières L, Pagés S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet* 2001;38:43–7.
- [6] Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol* 2009;27:e108–9; author reply e110. doi:10.1200/JCO.2009.22.7967.
- [7] McBride K a, Ballinger ML, Killick E, Kirk J, Tattersall MHN, Eeles R a, et al. Li-Fraumeni syndrome: cancer risk assessment and clinical management. *Nat Rev Clin Oncol* 2014;11:260–71.
- [8] Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 2015;17:405–24. doi:10.1038/gim.2015.30.
- [9] Zhang P, Bhakta KS, Puri PL, Newbury RO, Feramisco JR, Wang JY. Association of ataxia telangiectasia mutated (ATM) gene mutation/deletion with rhabdomyosarcoma. *Cancer Biol Ther* 2003;2:87–91.
- [10] Claes K, Depuydt J, Taylor AMR, Last JJ, Baert A, Schietecatte P, et al. Variant ataxia telangiectasia: clinical and molecular findings and evaluation of radiosensitive phenotypes in a patient and relatives. *Neuromolecular Med* 2013;15:447–57. doi:10.1007/s12017-013-8231-4.
- [11] Stredrick DL, Garcia-Closas M, Pineda MA, Bhatti P, Alexander BH, Doody MM, et al. The ATM missense mutation p.Ser49Cys (c.146C>G) and the risk of breast cancer. *Hum Mutat* 2006;27:538–44. doi:10.1002/humu.20323.
- [12] Fletcher O, Johnson N, dos Santos Silva I, Orr N, Ashworth A, Nevanlinna H, et al. Missense Variants in ATM in 26,101 Breast Cancer Cases and 29,842 Controls. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:2143–51. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0374.
- [13] Iannuzzi CM, Atencio DP, Green S, Stock RG, Rosenstein BS. ATM mutations in female breast cancer patients predict for an increase in radiation-induced late effects. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2002;52:606–13.
- [14] Xie P, Tian C, An L, Nie J, Lu K, Xing G, et al. Histone methyltransferase protein SETD2 interacts with p53 and selectively regulates its downstream genes. *Cell Signal* 2008;20:1671–8. doi:10.1016/j.cellsig.2008.05.012.
- [15] Al Sarakbi W, Sasi W, Jiang WG, Roberts T, Newbold RF, Mokbel K. The mRNA

- expression of SETD2 in human breast cancer: correlation with clinico-pathological parameters. *BMC Cancer* 2009;9:290. doi:10.1186/1471-2407-9-290.
- [16] Tan J, Ong CK, Lim WK, Ng CCY, Thike AA, Ng LM, et al. Genomic landscapes of breast fibroepithelial tumors. *Nat Genet* 2015;47:1341–5. doi:10.1038/ng.3409.
- [17] Luscan A, Laurendeau I, Malan V, Francannet C, Odent S, Giuliano F, et al. Mutations in SETD2 cause a novel overgrowth condition. *J Med Genet* 2014;51:512–7. doi:10.1136/jmedgenet-2014-102402.
- [18] Lee MS, Green R, Marsillac SM, Coquelle N, Williams RS, Yeung T, et al. Comprehensive Analysis of Missense Variations in the BRCT Domain of BRCA1 by Structural and Functional Assays. *Cancer Res* 2010;70:4880–90. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-4563.
- [19] National Comprehensive Cancer Network (NCCN). Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. Version 4/2013. 2013. http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_screening.pdf.
- [20] Pande M, Bondy ML, Do K-A, Sahin AA, Ying J, Mills GB, et al. Association between germline single nucleotide polymorphisms in the PI3K-AKT-mTOR pathway, obesity, and breast cancer disease-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 2014;147:381–7. doi:10.1007/s10549-014-3081-9.
- [21] Keppler-Noreuil KM, Rios JJ, Parker VER, Semple RK, Lindhurst MJ, Sapp JC, et al. PIK3CA-related overgrowth spectrum (PROS): diagnostic and testing eligibility criteria, differential diagnosis, and evaluation. *Am J Med Genet A* 2015;167A:287–95. doi:10.1002/ajmg.a.36836.
- [22] Orloff MS, He X, Peterson C, Chen F, Chen J-L, Mester JL, et al. Germline PIK3CA and AKT1 mutations in Cowden and Cowden-like syndromes. *Am J Hum Genet* 2013;92:76–80. doi:10.1016/j.ajhg.2012.10.021.
- [23] Staal FJT, van der Luijt RB, Baert MRM, van Drunen J, van Bakel H, Peters E, et al. A novel germline mutation of PTEN associated with brain tumours of multiple lineages. *Br J Cancer* 2002;86:1586–91. doi:10.1038/sj.bjc.6600206.
- [24] Macdonald TJ. Hedgehog Pathway in Pediatric Cancers: They're Not Just for Brain Tumors Anymore. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2012:605–9. doi:10.14694/EdBook_AM.2012.32.605.
- [25] Hirotsu M, Setoguchi T, Sasaki H, Matsunoshita Y, Gao H, Nagao H, et al. Smoothed as a new therapeutic target for human osteosarcoma. *Mol Cancer* 2010;9:5. doi:10.1186/1476-4598-9-5.
- [26] Porcu M, Kleppe M, Gianfelici V, Geerdens E, De Keersmaecker K, Tartaglia M, et al. Mutation of the receptor tyrosine phosphatase PTPRC (CD45) in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 2012;119:4476–9. doi:10.1182/blood-2011-09-379958.
- [27] Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2011;2:475–84. doi:10.1177/1947601911413466.
- [28] Aury-Landas J, Bougeard G, Castel H, Hernandez-Vargas H, Drouet A, Latouche J-B, et al. Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with brain tumours. *Eur J Hum Genet* 2013;21:1369–76. doi:10.1038/ejhg.2013.68.
- [29] Calvete O, Martinez P, Garcia-Pavia P, Benitez-Buelga C, Paumard-Hernández B, Fernandez V, et al. A mutation in the POT1 gene is responsible for cardiac angiosarcoma in TP53-negative Li-Fraumeni-like families. *Nat Commun* 2015;6:8383. doi:10.1038/ncomms9383.

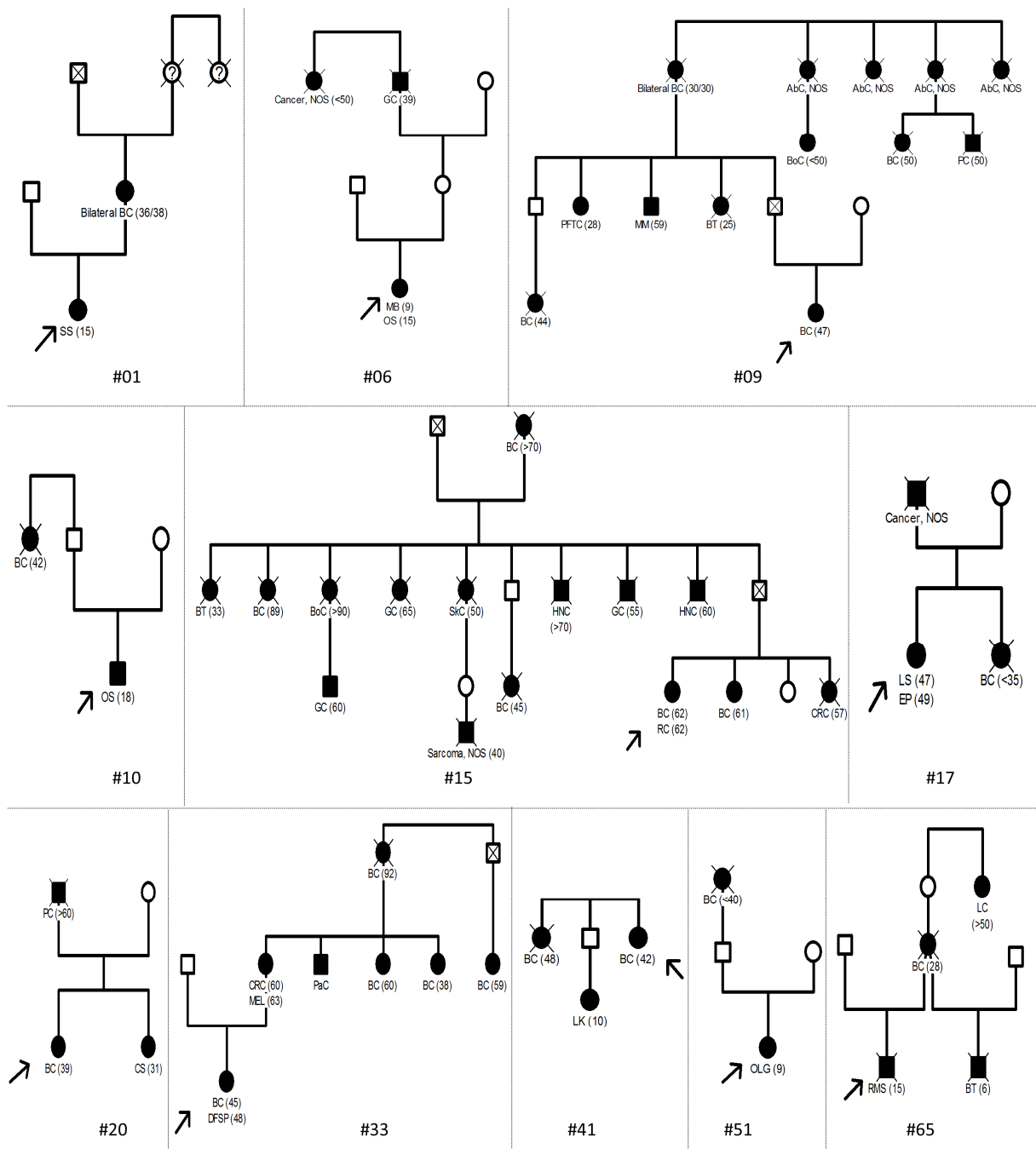
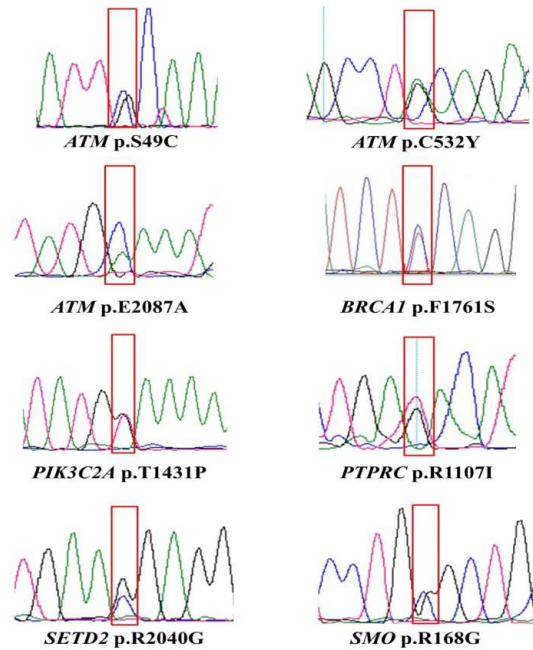


Figure 1. Pedigrees of the 11 LFS/LFL probands negative for *TP53* mutations. AbC: Abdominal cancer; BC: Breast cancer; BoC: Bone cancer; BT: Brain tumor; CRC: Colorectal cancer; CS: Chondrosarcoma; DFSP: Dermatofibrosarcomaprotuberans; EP: Ependymoma; GC: Gastric cancer; LC: Lung cancer; LK: Leukemia; LS: Liposarcoma; MB: Medulloblastoma; MEL: Melanoma; MM: Multiple myeloma; ODG: Oligodendroglioma; OS: Osteosarcoma; PaC: Pancreatic cancer; PC: Prostate cancer; PFTC: Primary fallopian tube cancer; RC: Renal cancer; RMS: Rhabdomyosarcoma; SkC: Skin Cancer; SS: Synovial sarcoma; ThC: Throat cancer; ThyC: Thyroid cancer; US: Unspecified sarcoma. NOS: No otherwise specified. ×: deceased individuals. ?: uncertain occurrence of cancer. Ages at diagnosis, when available, are presented in parentheses.

Supplementary box 1. Mutations predicted pathogenic in 11 LFS/LFL probandos with no *TP53* mutations detected.

Patient	Personal history of cancer (Dx)	Chromosome	PosGRCh37	dbSNP ID	Populational frequency of the variant	Gene	DNA change	AA change	SIFT	Poly Phen2	PhyloP	Phast Cons	Classification
#01	STS (15)	chr1	198721490	-	-	<i>PTPRC</i>	c.3320G>T	p.R1107I	D	D	C	C	USV
		chr2	29940456	rs771593278	-	<i>ALK</i>	c.775C>T	p.R259C	D	D	C	C	USV
		chr5	180050951	rs148329571	-	<i>FLT4</i>	c.1532T>C	p.V511A	D	D	C	C	USV
		chr6	160482929	rs8191844	0,0080	<i>IGF2R</i>	c.3551C>G	p.T1184S	D	D	C	C	USV
		chr6	117642531	rs144529412	0,0006	<i>ROS1</i>	c.5668A>G	p.K1890E	D	D	C	NC	USV
		chr13	32953529	rs4987047	0,0090	<i>BRCA2</i>	c.8830A>T	p.I2944F	D	D	NC	C	B
		chr13	25030481	rs113934879	-	<i>PARP4</i>	c.2560G>A	p.E854K	D	D	C	C	USV
#06	BT (9) OS (15)	chr16	3820879	rs145733598	0,0016	<i>CREBBP</i>	c.2572C>T	p.P858S	-	D	C	C	USV
		chr10	43609994	rs148935214	0,0004	<i>RET</i>	c.1946C>T	p.S649L	D	D	C	C	USV
		chr11	108188161	-	-	<i>ATM</i>	c.6260A>C	p.E2087A	T	D	C	C	USV
		chr13	32914839	rs55953736	0,0068	<i>BRCA2</i>	c.6347A>G	p.H2116R	T	D	C	NC	B
		chr14	81558901	rs772600260	-	<i>TSHR</i>	c.494C>T	p.T165M	T	D	C	C	USV
#09	Breast (47)	chr22	41574638	rs759647202	-	<i>EP300</i>	c.6923G>A	p.R2308H	D	D	C	C	USV
		chr4	55972946	rs34231037	0,0090	<i>KDR</i>	c.1444T>C	p.C482R	T	D	C	C	USV
#10	OS (18)	chrX	63410516	rs201092215	0,0016	<i>WTX</i>	c.2651C>T	p.P884L	D	D	C	C	USV
#15	Breast (62); Renal (62)	chr7	128843395	-	-	<i>SMO</i>	c.502C>G	p.R168G	D	B	C	C	USV
		chr4	55127448	rs36035373	0,0040	<i>PDGFRA</i>	c.236G>A	p.G79D	T	D	C	C	LB
#17	STS (47); BT (49)	chr17	41203130	rs80356905	-	<i>BRCA1</i>	c.1970T>C	p.F1761S	D	D	C	C	LP
		chr6	117642531	rs144529412	0,0006	<i>ROS1</i>	c.5668A>G	p.K1890E	D	B	C	NC	USV
		chr9	36882090	rs35077960	0,0026	<i>PAX5</i>	c.923C>T	p.A308V	T	D	C	C	USV
#20	Breast (39)	chr12	117768670	rs777633286	-	<i>NOS1</i>	c.205G>A	p.G69S	T	D	C	C	USV
		chr6	117715381	rs56274823	0,0010	<i>ROS1</i>	c.1108T>C	p.S370P	T	D	NC	C	USV
#33	Breast (45) STS (48)	chr16	3831230	rs61753381	0,0064	<i>CREBBP</i>	c.1651C>A	p.L551I	T	D	C	C	LB
#41	Breast (42)	chr11	108098576	rs1800054	0,0042	<i>ATM</i>	c.146C>G	p.S49C	D	D	C	NC	USV
		chr1	198676048	rs762697900	-	<i>PTPRC</i>	c.871C>T	p.P291S	T	D	C	NC	USV
		chr3	47103828	-	-	<i>SETD2</i>	c.6118C>G	p.R2040G	D	D	C	C	USV
		chr5	180058761	rs113995355	0,0062	<i>FLT4</i>	c.76T>G	p.S26A	T	D	C	C	USV
		chr7	128843396	rs61746143	0,0096	<i>SMO</i>	c.503G>A	p.R168H	D	D	C	C	USV
		chr11	108121787	rs35963548	0,0002	<i>ATM</i>	c.1595G>A	p.C532Y	D	D	C	C	USV
		chr13	32953550	rs11571769	0,0100	<i>BRCA2</i>	c.8851G>A	p.A2951T	D	D	C	C	B
#51	BT (9)	chr14	81610123	rs61742289	0,0012	<i>TSHR</i>	c.1721C>G	p.T574S	D	D	C	C	USV
		chr11	17118639	-	-	<i>PIK3C2A</i>	c.4291A>C	p.T1431P	T	D	C	C	USV
#65	STS (15)	chr3	47164946	rs368465960	-	<i>SETD2</i>	c.1180T>C	p.C394R	D	B	C	C	USV
		chr13	32911418	rs276174831	-	<i>BRCA2</i>	c.2926_2927delTCinsAT	p.S976I	D	D	NC/C	NC/NC	B

AA: aminoacid; B: Benign; D: Deleterious; C: conserved base; NC: not conserved base; T: Tolerated; USV: uncertain significance variant; LB: likely benign; LP: likely pathogenic. STS: Soft tissue sarcoma; BT: brain tumor; OS: Osteosarcoma. Novel variants, as well as variants in *BRCA1* and *ATM*, are in bold.



Supplementary Figure 1. Sanger sequencing validation of the mutations found in priority cancer-predisposing genes (*ATM* and *BRCA1*) and the novel mutations detected in this study.

Supplementary Box 2. Primer sequences used for validation by Sanger sequencing of the eight priority mutations found in this study.

Mutation	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>ATM</i> S49C	athtaagcgctgattcgag	tgccaaattcatatgcaagg	238
<i>ATM</i> C532Y	ttggcttacttgagccataa	aagtcttctcgccaacaa	246
<i>ATM</i> E2087A	ttaggccttcgagaattgg	tacctgacggaagtgcaatg	156
<i>BRCA1</i> F1761S	aagctcttccttttgaaagtc	gtagagaaatagaatagcctct	298
<i>PIK3C2A</i> T1431P	caaatgctgcaacttagcag	acaaccttgctcagcttctgt	250
<i>PTPRC</i> R1107I	tactggggagaaggaaagca	ggccttgctgcatagagta	195
<i>SETD2</i> R2040G	ctgggtagatgacggaggag	tgagtttgctgtctgggtct	242
<i>SMO</i> R168G	tgccaagtgtgagaatgac	cagagagcctggacctgtgc	181