

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

JULIANA GIACOMAZZI

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO GERMINATIVA *TP53* p.R337H EM INDIVÍDUOS
COM TUMORES DO ESPECTRO DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

**PORTO ALEGRE – RIO GRANDE DO SUL
2012**

JULIANA GIACOMAZZI

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO GERMINATIVA *TP53* p.R337H EM INDIVÍDUOS
COM TUMORES DO ESPECTRO DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como exigência parcial à
obtenção do título de Doutor.**

Orientadora: Patrícia Ashton-Prolla.

PORTO ALEGRE – RIO GRANDE DO SUL

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

CIP - Catalogação na Publicação

Giacomazzi, Juliana

Prevalência da mutação germinativa TP53 p.R337H em indivíduos com tumores do espectro da Síndrome de Li-Fraumeni / Juliana Giacomazzi. -- 2012.
183 f.

Orientadora: Patricia Ashton Prolla.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto Alegre, BR-RS, 2012.

1. gene TP53. 2. mutação TP53 p.R337H. 3. Síndrome de Li-Fraumeni. 4. câncer de mama. 5. câncer pediátrico. I. Ashton Prolla, Patricia, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JULIANA GIACOMAZZI

**PREVALÊNCIA DA MUTAÇÃO GERMINATIVA *TP53* p.R337H EM INDIVÍDUOS
COM TUMORES DO ESPECTRO DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, como exigência parcial à
obtenção do título de Doutor.**

APROVADA: 28 de agosto de 2012.

Lavínia Schüller-Faccini
**(Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Pós Graduação em
Genética e Biologia Molecular, UFRGS)**

Úrsula da Silveira Matte
**(Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Programa de Pós Graduação em
Genética e Biologia Molecular, UFRGS)**

Daniela Dornelles Rosa
**(Hospital Moinhos de Vento e Programa de Pós Graduação em Medicina:
Ciências Médicas, UFRGS)**

Patrícia Ashton-Prolla
Orientadora

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que se dispuseram a participar da pesquisa, pela confiança depositada no grupo envolvido nesta pesquisa.

A todos os colegas, co-autores dos artigos, e às pessoas que ajudaram para que este trabalho se tornasse possível, citados nas sessões *acknowledgements* de cada manuscrito.

A todos os Serviços/Laboratórios envolvidos em Porto Alegre, São Paulo e Barretos, em especial aos Serviços de Centro de Pesquisa Experimental, Genética Médica e Oncologia Pediátrica e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por toda atenção, paciência, estrutura e suporte oferecidos.

Aos meus amigos de todas as horas, pelo carinho e honestidade.

Ao Prof. Pierre Hainaut pela oportunidade de fazer um doutorado sanduíche junto ao seu grupo. Por ser um exemplo de pesquisador na área de pesquisa básica.

Muito especialmente, à Profa. Patricia Ashton-Prolla, pela confiança depositada em mim e pelo respeito. Por ser exemplo absoluto de seriedade profissional e de que tudo se constrói com muita fibra dando um passo de cada vez.

À minha família, por serem à base de tudo em minha vida. Aos meus irmãos e futuras cunhadas - César Filho e Cassandra, Marcelo e Cristina, obrigada de coração por todo carinho, amizade e companheirismo. Ao meu querido, namorado Leonardo, pelo amor, paciência e atenção, e em especial aos meus pais César e Elizabeth, pela amizade, apoio e amor incondicional.

Não basta fazer da melhor forma aquilo que fazemos,
é preciso fazê-lo sempre com muito amor.

Profa. Elizabethe T. Pitt Giacomazzi, minha mãe

APRESENTAÇÃO

O presente trabalho foi resultado de um estudo colaborativo envolvendo os Serviços de Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Genética Médica, Oncologia Pediátrica, Bioética, Cardiologia e Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e outras instituições no Brasil e no exterior. No país, contou-se com a colaboração do Hospital Moinhos de Vento, Hospital do Câncer AC Camargo e do Hospital do Câncer de Barretos, e de Laboratórios/Serviços de Patologia: Instituto de Patologia, Laboratório Geyer, Laboratório ANATPAT, Laboratório Medicina Digital, Laboratório Patologistas Reunidos, Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) e do Grupo Hospitalar Conceição. No exterior, contou-se com a colaboração da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*, Lyon – França). Os estudos foram orientados pela Profa. Patrícia Ashton-Prolla e supervisionados pelo Prof. Pierre Hainaut durante o doutorado da aluna no exterior. O recrutamento dos indivíduos e/ou amostras biológicas incluídas na pesquisa foi realizado nos hospitais e serviços no país supracitados. A parte experimental do projeto foi realizada no Laboratório de Medicina Genômica (CPE) e na *Section of Mechanisms of Carcinogenesis, IARC*. O presente trabalho foi realizado com fomento recebido do Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA para os projetos 08-022, 08-023 e 08-080), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS (processo PPSUS 09/0103-0) e da GlaxoSmithKline – GSK Oncology Ethnic Research Initiative 2008 (GSK-ERI). Juliana Giacomazzi recebeu uma bolsa de doutorado da CAPES e durante doutorado sanduíche realizado no *IARC*, uma bolsa de doutorado sanduíche CNPq (processo 200888/2011-0).

RESUMO

Introdução: Estudos prévios têm indicado que uma mutação germinativa específica no gene *TP53*, p.R337H está associada a efeito fundador no Brasil e é muito frequente entre certos tipos tumorais. **Objetivos e Metodologia:** O objetivo deste estudo foi verificar a prevalência da mutação germinativa *TP53* p.R337H em indivíduos com tumores do espectro da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e/ou Li-Fraumeni-Like (LFL) divididos em diferentes grupos: (1) mulheres com câncer de mama (CM) subdivididas em 2 subgrupos: (a) com critérios para síndromes de predisposição hereditária ao câncer, exceto para SLF/LFL; (b) não selecionadas para história familiar (HF), diagnosticadas antes dos 45 e após 55 anos de idade em diferentes regiões do país; (2) mulheres com tumores *phylloides* da mama, diagnosticadas em diferentes idades e não selecionadas para HF da doença nas regiões Sul e Sudeste; (3) crianças com tumores do espectro da SLF/LFL, não selecionadas para HF e atendidas em um Serviço de Oncologia Pediátrica do Sul do país. Adicionalmente, foi investigada a presença do haplótipo fundador brasileiro nos portadores da mutação *TP53* p.R337H. No grupo 3 foi ainda avaliada a prevalência de critérios para SLF/LFL e a presença de outras mutações germinativas no gene *TP53*. **Resultados:** No subgrupo 1A foram incluídas 59 mulheres das quais 2 eram portadoras da mutação *TP53* p.R337H, ambas com HF exclusivamente para a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário no momento do recrutamento. No subgrupo 1B foram incluídas 815 mulheres (403 com CM \leq 45 anos e 412 casos com CM \geq 55 anos) provenientes de 25 diferentes Estados do Brasil. A mutação foi encontrada em 8,6% (70/815) dos casos, sendo observada diferença significativa na frequência de acordo com o centro de recrutamento. Em todos centros, a mutação foi mais frequente em mulheres com CM antes dos 45 anos. Análise do tecido tumoral de 15 portadoras evidenciou perda de heterozigosidade (LOH) em apenas 2 casos. Os tumores de mama de mulheres portadoras apresentavam mais frequentemente alguma expressão de HER2 (1+, 2+ ou 3+). No grupo 2, foram incluídas 148 mulheres com tumores *phylloides* da mama e 8 (5,4%) apresentaram a mutação, sendo mais frequente entre os tumores malignos (3/13; 23%) quando comparada aos benignos (5/128; 3,4%). No grupo 3 foram incluídas

292 crianças diagnosticadas com tumores do espectro da SLF/LFL, das quais 25,3% tinham critérios para SLF/LFL. O sequenciamento completo e pesquisa de rearranjos gênicos de *TP53* em 48 das crianças com câncer e critérios estritos para LFL evidenciou apenas um caso com uma mutação clássica – p.G245S. A mutação *TP53* p.R337H foi identificada somente entre os casos com carcinoma adrenocortical (9/11; 81,8%) e de plexo coróide (2/2; 100%), correspondendo a 3,8% da amostra total. Um dos casos de carcinoma adrenocortical apresentou a mutação *TP53* p.R337H em homozigose. Todos tumores de portadores analisados (n=8) apresentaram LOH. **Conclusão:** Conclui-se que a mutação germinativa *TP53* p.R337H ocorre em mulheres brasileiras com CM em diferentes faixas etárias, independente da HF de câncer. Em mulheres com fenótipo de CM hereditário sem critérios para SLF/LFL a mesma também foi observada. A frequência da mutação foi variável de acordo com o centro de recrutamento, sendo identificada em todas as regiões brasileiras. Os tumores de mama de pacientes portadoras da mutação têm um perfil peculiar, com baixa frequência de LOH e presença de alguma expressão de HER2. A mutação p.R337H ocorre em tumores *phylloides* da mama benignos e especialmente malignos, confirmando a hipótese prévia de associação de mutações germinativas em *TP53* com estes tumores. Entre crianças com tumores do espectro SLF/LFL de um centro de referência no Sul do Brasil, um percentual significativo tem indicação para teste de mutações em *TP53*, no entanto, na maioria destes casos não se identifica mutação germinativa no gene. A mutação *TP53* p.R337H ocorre em elevada frequência na linhagem germinativa de crianças com carcinomas adrenocortical e de plexo coróide, como descrito em outras regiões brasileiras. Por fim, o haplótipo fundador foi identificado em todos portadores da mutação analisados, incluindo 3 casos das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do país. A mutação *TP53* p.R337H está associada a efeito fundador no Brasil e tem importante contribuição na gênese de tumores de mama, bem como de carcinomas adrenocortical e de plexo coróide no Sul do país.

Palavras-chave: gene *TP53*, mutação *TP53* p.R337H, Síndrome de Li-Fraumeni, neoplasia da mama, câncer pediátrico, tumor *phylloides*.

ABSTRACT

Introduction: Previous studies have reported that a specific germline mutation in *TP53*, p.R337H, is associated with a founder effect and is common among certain tumor types. **Objectives and Methodology:** Assess the prevalence of *TP53* p.R337H germline mutation in subjects with tumors of the Li-Fraumeni/ Li-Fraumeni-Like (LFS/LFL) spectrum divided into different groups: (1) women diagnosed with breast cancer (BC) subdivided into 2 subgroups: (a) with criteria for hereditary predisposition syndromes, except for LFS/LFL (b) unselected for family history (FH) diagnosed at or before 45 years and at or after 55 years recruited in different regions of the country; (2) women with *phyllodes* breast tumors, diagnosed at different ages and not selected for FH of the disease from the South and Southeast of Brazil; (3) children with tumors of the LFS/LFL spectrum and not selected for FH of the disease from a Pediatric Oncology Service in South Brazil. In addition, presence of the founder Brazilian haplotype in mutation carriers identified in groups 1, 2 and 3 was assessed. Finally, in group 3, prevalence of LFS/LFL criteria and presence of other germline *TP53* mutations were investigated. **Results:** In **subgroup 1A**, 59 women were included and two of these were mutation carriers, both had a FH consistent only with Hereditary Breast and Ovarian Cancer Syndrome at recruitment. In **subgroup 1B**, 815 women (403 cases diagnosed ≤ 45 years and 412 cases, ≥ 55 years) were included from 25 different Brazilian States. The *TP53* p.R377H mutation was found in 8.6% (70/815), and significant differences in mutation frequency were observed according to recruitment center. In all centers the mutation was more frequent in women diagnosed with BC at or before 45 years. Analysis of tumor tissue of 15 carriers showed loss of heterozygosity (LOH) in only 2 cases. Breast tumors of carriers showed, more frequently, some expression of HER2. In group 2 were included 148 women with breast *phyllodes* tumors and 8 (5.4%) were p.R337H carriers, which was most common among malignant *phyllodes* tumors (3/13, 23%) when compared to benign (5/128, 3.4%). In the **group 3**, 292 children with tumors of the LFS/LFL spectrum were included, and 25.3% of these had criteria for LFS/LFL. *TP53* gene sequencing and rearrangement testing in 48 children with the more strict criteria for the syndrome identified a classic germline mutation, p.G245S, in only one proband. The *TP53* p.R337H mutation was identified only among patients with

adrenocortical carcinoma (9/11, 81.8%) and choroid plexus carcinoma (2/2, 100%), corresponding to 3.8% of the total sample. One of the patients with adrenocortical carcinoma was homozygous mutant. All tumors of *TP53* p.R37H carriers analyzed (n=8) showed LOH. **Conclusion:** We conclude that the *TP53* p.R337H germline mutation occurs in Brazilian women with BC in different age groups, regardless of BC FH. In women with hereditary BC without criteria for LFS/LFL criteria, it was also observed. The mutation frequency varied according to the recruiting center and carriers were identified in all Brazilian regions. Breast tumors of carriers have a peculiar profile, with low frequency of LOH and the presence of HER2 expression. The mutation was present, also, in benign and especially malignant *phylloides* tumors, confirming the previous hypothesis of an association between germline mutations in the *TP53* gene and these specific tumors. Among children with tumors of the LFS/LFL spectrum from a Oncopediatrics referral center in South Brazil, a significant percentage fulfills criteria for *TP53* mutation testing, however, in most of these cases, no germline mutations were identified. The *TP53* p.R337H mutation occurs in high frequency in the germline of children with adrenocortical and choroid plexus carcinomas, as described in other Brazilian regions. Finally the founder haplotype was identified in all mutation carriers analyzed, including 3 cases from the Northern, Northeastern and Midwestern Brazilian regions. The *TP53* p.R337H mutation is associated with a founder effect in Brazil and has an important contribution in the genesis of breast tumors in the country, as well as adrenocortical and choroid plexus carcinomas in the Southern region of the country.

Keywords: *TP53* gene, *TP53* p.R337H mutation, Li-Fraumeni Syndrome, breast neoplasm, childhood cancer, *phylloides* tumor

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Linha do tempo descrevendo as principais descobertas em oncogenômica.	21
Figura 2. Número total de casos e principais tumores (%) diagnosticados no ano de 2008 por região.	23
Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas.....	26
Figura 4. Tumores associados a mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	35
Figura 5. Mecanismos ativadores da proteína p53 e suas atividades supressoras tumorais.....	37
Figura 6. Representação dos éxons e íntrons do gene <i>TP53</i> e da proteína p53 com seus respectivos domínios funcionais.	39
Figura 7. Códon atingidos por mutações do tipo <i>missense</i> germinativas e somáticas no gene <i>TP53</i>	40
Figura 8. Perfil de desnaturação das proteínas p53-wt e p53-R337H.....	44
Figura 9. Representação esquemática dos efeitos do pH sobre a estrutura das proteínas p53-wt e p53-R337H.	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer.....	28
Tabela 2. Critérios Clínicos da Síndrome de Li-Fraumeni e da variante Li-Fraumeni-Like.....	31
Tabela 3. Prevalência de mutação germinativa no gene <i>TP53</i> em estudos publicados na literatura.....	33
Tabela 4. Principais estudos de prevalência da mutação <i>TP53</i> p.R337H já publicados.	43
Tabela 5. Haplótipos resultantes do estudo de 29 polimorfismos no gene <i>TP53</i>.	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAC	Carcinoma adrenocortical
CM	Câncer de mama
CO	Câncer de ovário
CPC	Carcinoma de plexo coróide
HAP ID	Identificação do haplótipo
HBCC	Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e colorretal
HBOC	Síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário
HF	História familiar
IHQ	Imuno-histoquímica
LFL	Li-Fraumeni-Like
LLA	Leucemia linfocítica aguda
LOH	Perda de heterozigosidade
N	Número
PB	Pares de base
RE	Receptor de estrogênio
SLF	Síndrome de Li-Fraumeni
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Polimorfismo de base única

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1. O Câncer na História	19
2.2. O Câncer no mundo.....	22
2.3. O Câncer no Brasil.....	24
2.4. Genética e Câncer	27
2.5. Síndrome de Li-Fraumeni.....	28
2.5.1. Histórico e descrição da Síndrome.....	28
2.5.2. Diagnóstico Clínico, Molecular e Espectro Tumoral da Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like	30
2.6. A proteína p53, o gene supressor tumoral TP53 e a Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like.....	36
2.6.1 Caracterização da proteína p53	36
2.6.2. O Gene TP53 e a proteína p53	38
2.6.3. Mutações e polimorfismos no gene TP53	39
2.6.4. A mutação germinativa TP53 p.R337H	42
3. JUSTIFICATIVA.....	48
4. OBJETIVOS.....	49
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
6. MANUSCRITOS.....	65
6.1. TP53 p.R337H mutation and breast cancer in Brazil	65
6.2. A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with <i>phyllodes</i> breast tumors in Brazil.....	86
6.3. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like Syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil.....	96
6.4. TP53 p.R337H is a conditional cancer predisposing mutation:.....	114
further evidence from a homozygous patient.	114
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO.....	132
8. PERSPECTIVAS.....	138
ANEXOS	140
ANEXO A - FICHA CLÍNICA PEDIÁTRICA	140
ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO – AUTORIZAÇÃO POR REPRESENTAÇÃO DE MENOR RELACIONADO AFETADO	145
ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO – ADULTOS RELACIONADOS... 	149
ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO – AUTORIZAÇÃO POR REPRESENTAÇÃO DE MENOR RELACIONADO NÃO AFETADO	153

ANEXO E - LISTA DE POLIMORFISMOS NO GENE <i>TP53</i>.....	157
ANEXO F - PROTOCOLOS DAS ANÁLISES MOLECULARES	160
ANEXO G - PUBLICAÇÕES COMPLEMENTARES NO PERÍODO DO DOUTORADO	171

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma das patologias mais antigas da humanidade e uma das principais causas de óbito no mundo, ao lado das doenças cardiovasculares, respiratórias crônicas e diabetes (Organização Mundial da Saúde, 2012). Sua incidência permanece ascendente tanto no Brasil, quanto no mundo, o que pode ser associado a mudanças na estrutura da vida moderna, tais como a urbanização acelerada, o aumento da longevidade da população, os novos hábitos de vida e de padrões de consumo, e a fatores genéticos, de alta e de baixa penetrância (Instituto Nacional de Câncer, 2011; Organização Mundial da Saúde, 2012).

Nos últimos 40 anos, diversos genes envolvidos no desenvolvimento do câncer foram identificados, sendo um pequeno grupo, o responsável por controlar a maior parte das vias ligadas a carcinogênese. Um protótipo desses genes é o *TP53*. Estima-se que alterações somáticas neste gene ocorrem em mais de 50% de todos os tumores invasivos (Malkin, Li *et al.*, 1990). Por outro lado, estudos na América do Norte e Europa têm identificado que alterações germinativas em *TP53*, associadas à Síndrome de Predisposição Hereditária Li-Fraumeni e sua variante Li-Fraumeni-Like (SLF/LFL), ocorrem em baixa frequência (1 a cada 2.000-5.000 indivíduos). A maioria das mutações germinativas no gene *TP53* localiza-se na região correspondente ao domínio de ligação ao DNA (exons 5-8) (Lalloo, Varley *et al.*, 2003). No entanto, uma mutação específica localizada no domínio de oligomerização (éxon 10) denominada *TP53* p.R337H, tem sido identificada em 1 a cada 300 indivíduos da população geral do Sul e Sudeste do Brasil (Piovezan, 2006; Palmero, Schüler-Faccini *et al.*, 2008).

A mutação *TP53* p.R337H foi inicialmente descrita como tecido-específica, sendo associada apenas à carcinoma adrenocortical (Ribeiro, Sandrini *et al.*, 2001; Figueiredo, Sandrini *et al.*, 2006). Mais recentemente essa mutação foi associada à carcinoma de plexo coróide e câncer de mama (Assumpção, Seidinger *et al.*, 2008; Custodio, Taques *et al.*, 2011; Seidinger, Mastellaro *et al.*, 2011; Gomes, Kotsopoulos *et al.*, 2012) em séries de casos restritas. A mesma mutação também foi identificada em famílias que preenchem critérios para SLF/LFL (Achatz, Olivier *et al.*, 2007), e foi associada a efeito fundador (Pinto, Billerbeck *et al.*, 2004; Garritano, Gemignani *et al.*, 2010). No entanto, os estudos publicados até o momento

envolvendo mulheres diagnosticadas com câncer de mama, incluem um número restrito de casos, provenientes de regiões específicas do país e não abordaram com detalhe características dos tumores associados e análise do haplótipo fundador. Em relação a tumores *phyllodes* da mama, existe apenas um artigo sugerindo que este tumor faça parte do espectro da síndrome, e alguns relatos de casos isolados. Finalmente, em crianças com tumores do espectro da SLF/LFL do Sul do Brasil não há descrição da prevalência da mutação *TP53* p.R337H.

Sendo assim, o presente estudo foi proposto a fim de verificar a prevalência da mutação germinativa *TP53* p.R337H e sua associação com características clínicas e tumorais (tipo e topografia tumoral, idade ao diagnóstico do tumor, perfil imuno-histoquímico do tumor, perda heterozigiosidade no tumor, entre outros) em 3 diferentes grupos: **grupo 1** - mulheres com câncer de mama selecionadas para história familiar de câncer (**grupo 1A**) e não selecionadas para a história familiar da doença (**grupo 1B**) diagnosticadas em diferentes idades; **grupo 2** - mulheres com tumores *phyllodes* da mama diagnosticadas em diferentes idades e não selecionadas para história familiar da doença; **grupo 3** - crianças com tumores do espectro da SLF/LFL (tumores de sistema nervoso central, sarcomas, carcinomas adrenocorticais, tumores de células germinativas, tumores de Wilms e leucemias), não selecionadas para história familiar da doença. Nos portadores da mutação *TP53* p.R337H, o presente trabalho propôs-se a verificar a presença do haplótipo fundador brasileiro. Nos indivíduos incluídos no grupo 3, com critérios para a SLF/LFL, objetivou-se verificar a frequência de história familiar de câncer e de critérios clínicos para SLF/LFL e comparar com a frequência de um grupo controle para história familiar de crianças sem câncer. Por fim, nos casos de câncer pediátrico com critérios clínicos para a SLF/LFL avaliou-se também a presença de outras mutações no gene *TP53*.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. O Câncer na História

A primeira descrição médica do câncer foi encontrada em um papiro de cinco metros de comprimento datado do século 2500 a.C. que contem os ensinamentos de um médico egípcio, Imhotep ao descrever 48 pacientes. Ao relatar um dos casos como tendo uma “*massa saliente no peito... fria, dura, densa como uma fruta e espalhando-se insidiosamente debaixo da pele*”, Imhotep descreveu claramente o câncer de mama. Com relação a esse caso, na seção intitulada “Terapia”, ele escreveu apenas uma frase: “*Não existe*” (Smith, 2012).

Mais de dois milênios passaram-se desde a descrição de Imhotep até que se voltasse a ouvir falar do câncer. Em 440 a.C., o historiador grego Heródoto registrou o caso de Atossa, rainha da Pérsia, que foi subitamente acometida por um câncer de mama inflamatório, o qual, na época foi tratado com silêncio, motivo de vergonha pessoal (Campbell, 1889).

Por volta de 400 a.C. usou-se pela primeira vez a palavra câncer, originada a partir da palavra grega *Karkinos* que significa caranguejo. Hipócrates usou essa palavra para descrever tumorações que pareciam invadir os tecidos vizinhos e faziam lembrar o comportamento de um caranguejo (Sigerist, 1932).

Diversos estudos encontraram cânceres em espécies mumificadas, que, por formarem um tecido endurecido e calcificado, ficaram preservados por séculos, sendo o mais antigo deles o câncer abdominal de Dahhlesh, no Egito, de cerca de 400 d.C. (Mukherjee, 2012).

Até o final dos anos de 1500 o câncer era tratado como a “bile negra”, fluido que se acreditava ser responsável pela doença. Neste século, métodos primitivos começaram a ser usados para combater a doença. Johannes Scultetus (1595) descreveu uma remoção cirúrgica de um câncer de mama, na qual se usou fogo, ácido e faixas de couro (Doyle, 2004).

Por volta de 1800, pesquisadores começaram a observar que existia uma relação entre o câncer e o meio ambiente. Percivall Pott (1775) observou que o

câncer de testículo ocorria de forma desproporcional em adolescentes que limpavam chaminés e tinham contato com fuligem (Waldron, 1983). Nessa mesma época, novos conceitos também começaram a surgir. Mathias Schleiden e Theodor Schwann (1838) afirmaram que todos os organismos vivos eram formados por blocos fundamentais de construção chamados células. Com base nessa ideia, Rudolf Virchow descreveu a “teoria celular” da biologia humana, baseando-a em dois princípios fundamentais: que os corpos humanos, como o dos animais e plantas, são feitos de células, e que as células só podem surgir de outras células – *omnis cellula e cellula*, nas palavras dele (Mukherjee, 2012).

Esses princípios permitiram a Rudolf Virchow concluir que se as células nascem apenas de outras células, então o crescimento só poderia ocorrer de duas maneiras: pelo aumento do número de células (hiperplasia) ou pelo aumento do tamanho das células (hipertrofia). Esse raciocínio permitiu chegar a uma nova compreensão acerca do crescimento celular. À hiperplasia de forma extrema com crescimento redefinido e incontrolável de células deu-se o nome de neoplasia. Essa aberrante e descontrolada divisão celular, que tinha como característica criar massas de tecidos denominados tumores, invadir órgãos e espalhar-se foi denominada metástase (Mukherjee, 2012).

No final dos anos de 1880, ocorreram vários avanços no conhecimento relativo às neoplasias. Concluiu-se que a leucemia não era uma supuração do sangue, mas uma neoplasia do sangue. William Halsted (1890) introduziu a mastectomia radical como procedimento para extirpação do câncer de mama, retirando o seio, músculos abaixo dele e nódulos linfáticos. No começo dos anos de 1900, com o advento do raio X, utilizando o elemento químico rádio, descoberto por Marie e Pierre Curie, a radiação começou a ser usada como estratégia terapêutica contra o câncer, em pontos localizados (Prêmio Nobel, 1903; Halsted, 1925).

No início dos anos de 1900, a estagnação de fundos de pesquisa em câncer contrastava nitidamente com a rápida proeminência da doença. O câncer assumiu a liderança, ficando acima dos diagnósticos de varíola, febre tifóide e tuberculose.

Entre os anos de 1900 e 1916, a mortalidade relacionada ao câncer cresceu 29,8% e em 1926 tornou-se a segunda causa de morte nos Estados Unidos, precedido apenas por doenças cardíacas (Sepkowitz, 2004). Em resposta a isso, em 1937 foi criado o *National Cancer Institute* (NCI) nos Estados Unidos. No mesmo

ano, no Brasil foi criado o Centro de Cancerologia do Serviço de Assistência Hospitalar do Distrito Federal, no Rio de Janeiro, hoje Instituto Nacional de Câncer (Instituto Nacional de Câncer 2012; Mukherjee, 2012). Neste período uma série de descobertas foram publicadas e revolucionaram a oncologia, reorganizam drasticamente o universo da biologia do câncer e colocaram os genes em posição central. Os principais marcos deste período encontram-se resumidos na linha do tempo da figura 1.

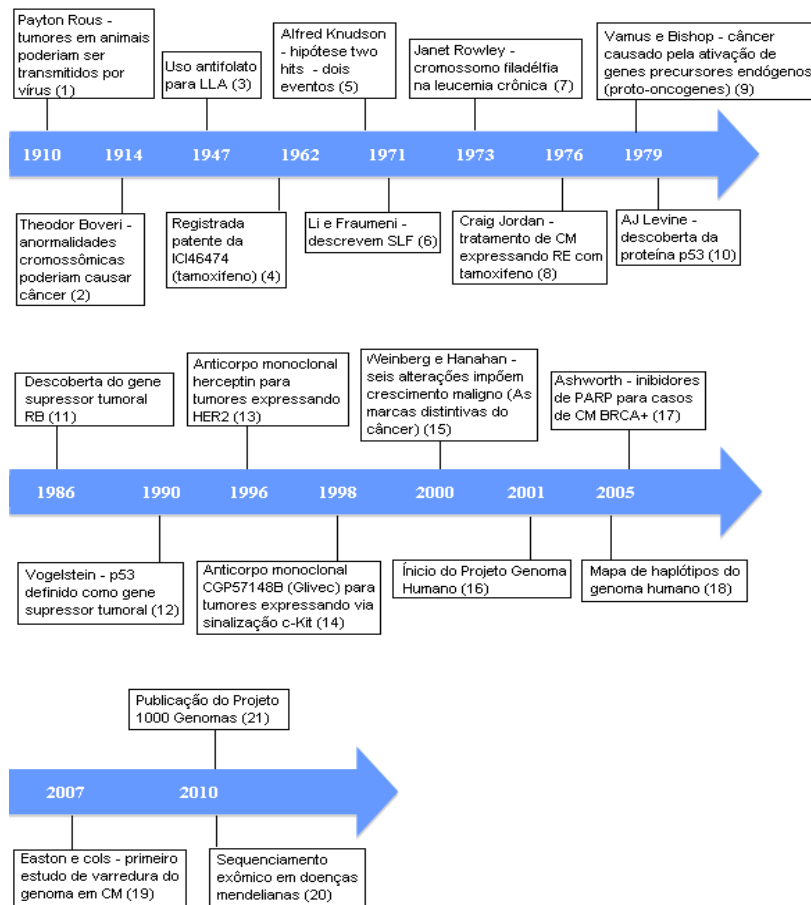


Figura 1. Linha do tempo descrevendo as principais descobertas em oncogenômica.

Legenda: LLA – leucemia linfocítica aguda; SLF – Síndrome de Li-Fraumeni ; CM – câncer de mama; RE – receptor de estrogênio; Referências: (1) Rous, 1910; (2) Boveri, 1929; (3) Farber e Diamond, 1948; (4) Harper e Walpole, 1966; (5) Knudson, 1971; (6) Li e Fraumeni, 1969b; (7) Rowley, 1973; (8) Jordan, 1977; (9) Varmus, Weiss *et al.*, 1972; (10) Linzer e Levine, 1979; (11) Friend, Bernards *et al.*, 1986; (12) Baker, Markowitz *et al.*, 1990; (13) Bazell, 1998; (14) Druker, Tamura *et al.*, 1996; (15) Hanahan e Weinberg, 2000; (16) Lander, Linton *et al.*, 2001; (17) Farmer, McCabe *et al.*, 2005; (18) Consortium, 2005; (19) Easton, Pooley *et al.*, 2007; (20) Ng, Buckingham *et al.*, 2010; (21) Pennisi, 2010.

Modificada de: Weitzel, Blazer *et al.*, 2011.

2.2. O Câncer no mundo

Mudanças na estrutura da vida moderna alteraram radicalmente o espectro de cânceres, de modo a aumentar a incidência de alguns e diminuir a incidência de outros. O câncer de estômago predominou nos países desenvolvidos até o final do século XIX e ainda pode ser observado em altas taxas em países em desenvolvimento e subdesenvolvidos. Nos países desenvolvidos, a incidência diminuiu, provavelmente devido à maior fiscalização de agentes carcinogênicos encontrados em reagentes e conservantes usados no preparo e conservação de alimentos, ao controle da infecção endêmica e contagiosa da bactéria *Helicobacter pylori* e às melhorias de saneamento básico (Mukherjee, 2012).

A incidência do câncer de pulmão aumentou exponencialmente a partir da década de 1950 em homens, como resultado do aumento do consumo de cigarro no começo do século XX, época em que o consumo médio anual de cigarro chegara a 3500 por pessoa (Doll e Hill, 1950). Nas mulheres, grupo que começou a fumar nos anos de 1950, a incidência do câncer de pulmão ainda não atingiu o seu ápice (Instituto Nacional de Câncer, 2011).

Atualmente, o câncer foi identificado como uma das quatro principais ameaças para a saúde e para o desenvolvimento, ao lado das doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas e diabetes. Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde, no ano de 2008 ocorreram 12,66 milhões de novos diagnósticos e 7,56 milhões de óbitos relacionados à doença, correspondendo a cerca de 14% de todas as ocorrências neste período (Organização Mundial da Saúde, 2012).

Os principais tipos de câncer diagnosticados mundialmente neste mesmo ano, seguido pelos respectivos números absoluto e relativo de casos, foram: pulmão (1,61 milhões, 12,7%), mama (1,38 milhões, 10,9%) e colorretal (1,24 milhões, 9,8%). A mortalidade em números absolutos e relativos por diferentes tipos de câncer no mundo em 2008 foi: câncer de pulmão (1,38 milhões, 18,2%), estômago (0,74 milhões, 9,8%), fígado (0,69 milhões, 9,1%), colorretal (0,608 milhões, 8%) e mama (0,458 milhões, 6%) (Ferlay, Shin *et al.*, 2010). Na figura 2 estão resumidas as taxas de incidência dos principais tipos de câncer em diferentes regiões no mundo.

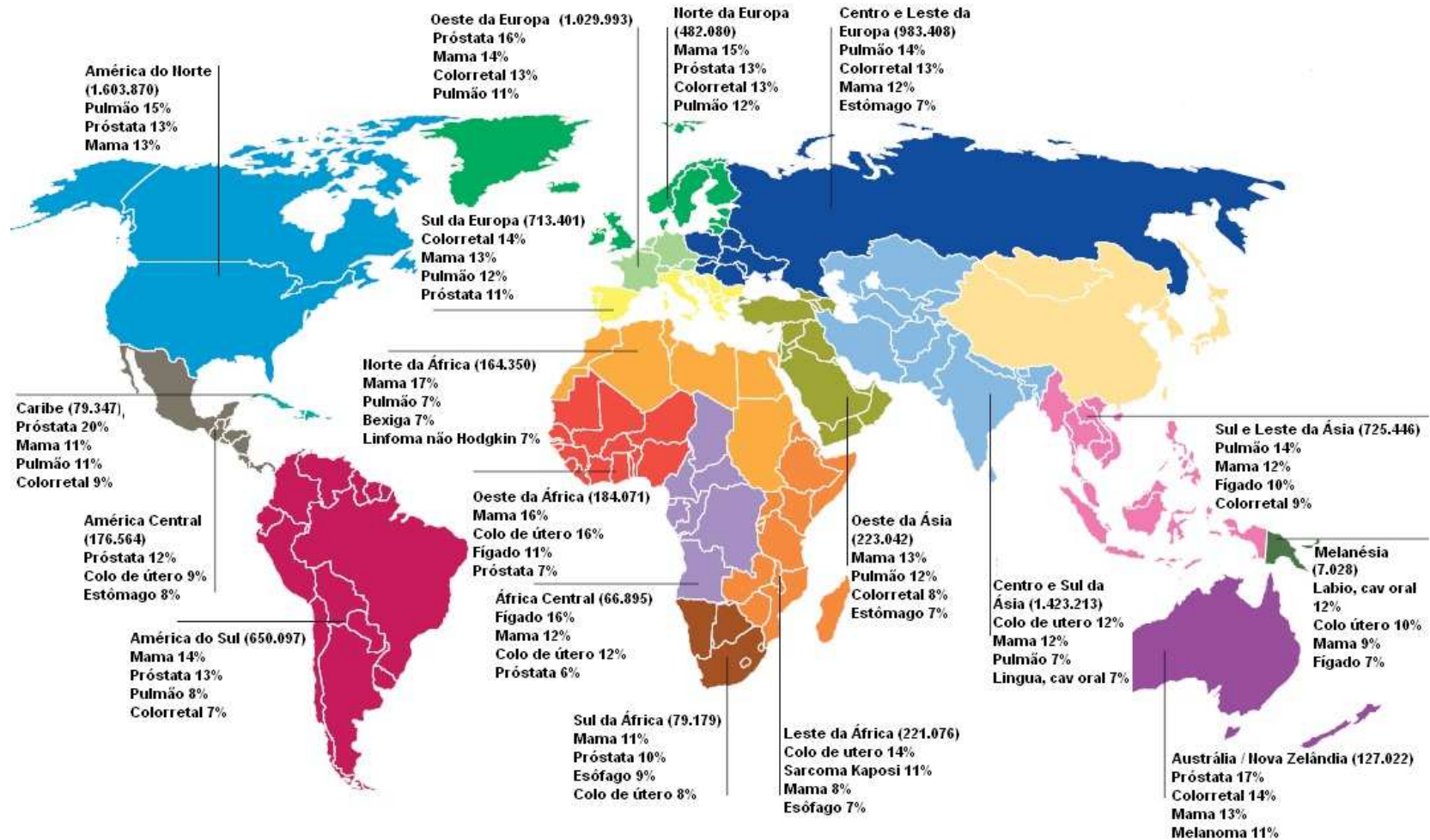


Figura 2. Número total de casos e principais tumores (%) diagnosticados no ano de 2008 por região.

Modificada de: Ferlay, Shin *et al.*, 2010.

Nas regiões em desenvolvimento, observa-se que os cânceres de pulmão e estômago são responsáveis por 42% dos novos casos de câncer e 48% dos óbitos por câncer em homens. Em mulheres, os cânceres de mama e do colo de útero representam 33% dos novos casos de câncer e 25 % dos óbitos por câncer (Ferlay, Shin *et al.*, 2010).

Tanto nas regiões desenvolvidas, quanto nas em desenvolvimento, o câncer de mama é o tumor mais frequente entre as mulheres (Ferlay, Shin *et al.*, 2010). De forma geral, a incidência do câncer de mama é superior a 80 casos por 100.000 nas regiões desenvolvidas (exceto Japão) e em algumas regiões do Brasil e, inferiores a 40 casos por 100.000 na maior parte das demais regiões em desenvolvimento (Ferlay, Shin *et al.*, 2010; Organização Mundial da Saúde, 2012).

A Organização Mundial da Saúde, baseada nos números de incidência atuais e levando em conta o crescimento e envelhecimento populacional ascendentes, estima um aumento nas taxas de incidência de câncer. Para o ano de 2030, essa incidência anual foi estimada em 21,4 milhões de novos diagnósticos de câncer, mais de 13,2 milhões de óbitos pela doença e mais de 75 milhões de pessoas vivendo com a doença (Organização Mundial da Saúde, 2012).

Atualmente, mais da metade dos diagnósticos de câncer no mundo são feitos nos países em desenvolvimento. Sem a implementação de estratégias baseadas em evidências (prevenção, detecção precoce e manejo adequado dos pacientes com câncer) essa proporção tende a aumentar (Tavassoli, 2003).

2.3. O Câncer no Brasil

O Brasil, considerado o quinto maior país do mundo, apresentava em 2010 uma população de 192 milhões de habitantes, sendo as populações das regiões Sul-Sudeste e Norte-Nordeste as responsáveis pela maioria deste contingente, 108 e 69 milhões, respectivamente (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010).

No país, em torno de 48% da população se autodenomina branca, 44% multiracial (branca mista, africana ou etnia indígena), e 7%, negra (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2012). O país apresenta-se disperso entre em centros

urbanos, regiões rurais, e em mata - Região Amazônica. Além das disparidades regionais, apresenta enorme disparidade de renda, afetando a distribuição de determinadas doenças, devido a dificuldades de acesso a cuidados de saúde (The World Bank, 2011).

Atualmente, o país apresenta uma das economias que mais crescem no mundo, e alguns fatores característicos da população foram observados no Censo Nacional (2010). O primeiro, seguindo tendência observada em países desenvolvidos, é a inversão da pirâmide etária, devido ao aumento da expectativa de vida e a diminuição das taxas de fecundidade, especialmente em determinadas regiões do país. O segundo, é uma tendência à diminuição da incidência de doenças infecciosas não-transmissíveis e parasitárias, e progressiva ascensão da incidência e da mortalidade por doenças crônico-degenerativas, tendo como principal fator o envelhecimento da população, fruto do processo de urbanização, avanços tecnológicos e terapêuticos da medicina e de ações de promoção da saúde (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2010; Barreto, Teixeira *et al.*, 2011).

Com base nos 19 registros de câncer de base populacional, alimentados por uma rede de 260 registros de câncer hospitalares, o Instituto Nacional de Câncer estimou para o ano de 2012, a ocorrência de aproximadamente 518.510 novos casos de câncer no Brasil, sendo os tipos mais incidentes os cânceres de pele não-melanoma (63 mil novos casos, 24,4%), próstata (60 mil, 23,2%), pulmão (17 mil, 6,6%), cólon e reto (14 mil, 5,4%) e estômago (13 mil, 5%) para o sexo masculino (257.870 novos casos). E os cânceres de pele não melanoma (71 mil novos casos, 27,2%), mama (53 mil, 20,3%), colo do útero (18 mil, 6,9%), cólon e reto (16 mil, 6,1%) e pulmão (10 mil, 3,8%) para o sexo feminino (260.640 novos casos) (Instituto Nacional de Câncer, 2012).

A incidência de tumores em crianças e em adolescentes até os 19 anos, que representam 33% da população brasileira, prevista para o mesmo ano, é de 11.530 novos casos (aproximadamente 3% do total de casos de câncer). Dados do ano de 2009 relativos à mortalidade, demonstram que os óbitos por câncer, para a faixa etária de 1 a 19 anos, encontraram-se entre as dez principais causas de óbito no Brasil e que a partir dos 5 anos, o câncer corresponde à primeira causa de óbito por doença em meninos e meninas. Os principais tumores nesta faixa etária são leucemias (25-35% dos casos) e tumores de sistema nervoso central (8-15% dos

casos) (Instituto Nacional de Câncer, 2011).

A distribuição de novos casos de câncer mostra-se heterogênea entre Estados e capitais do país, com relação à incidência e ao tipo de tumor, tanto no sexo masculino quanto no feminino, conforme demonstrado na figura 3.

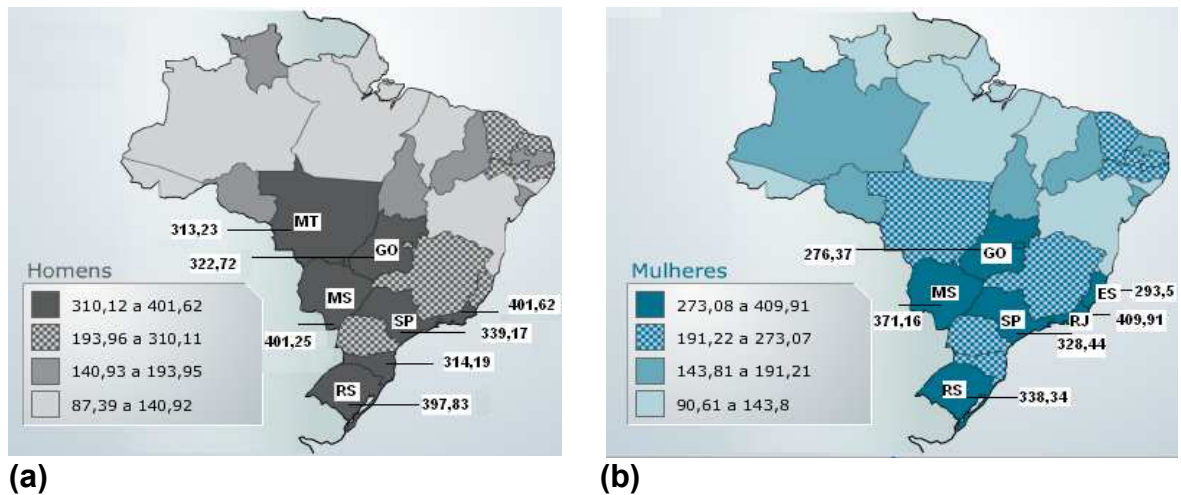


Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência de neoplasias malignas.

Legenda: (a) sexo masculino; (b) sexo feminino. Nas caixas estão demonstradas as estimativas de incidência de câncer (todos os tipos incluídos) a cada 100.000 indivíduos. As incidências dos Estados com maiores índices estão descritas nos mapas pelo número exato de casos a cada 100.000 indivíduos.

Modificado de: Instituto Nacional de Cancer, 2012.

As regiões Sul e Sudeste, de maneira geral, apresentam as maiores taxas, enquanto as regiões Norte e Nordeste, as menores. As taxas da região Centro-Oeste apresentam um padrão intermediário. Não existe uma explicação clara para essas marcadas diferenças regionais de incidência de câncer e para o predomínio de determinados tumores em regiões específicas do Brasil, como por exemplo, nas regiões Sul e Sudeste. No entanto, a origem étnica heterogênea com grande influência européia, nestas últimas regiões principalmente, leva a marcadas diferenças regionais em aspectos culturais, sociais e econômicos, o que pode estar associado às diferenças brutais na incidência e fatores de risco associados à doença.

2.4. Genética e Câncer

Embora a maioria das neoplasias seja resultado de interações complexas entre múltiplos fatores, incluindo aspectos sociais, culturais, ambientais e genéticos, um percentual dos casos decorre principalmente de alterações herdadas que conferem uma maior predisposição ao desenvolvimento de tumores.

Estima-se que, para a maior parte dos tumores malignos conhecidos, 5 a 10% sejam hereditários e 20 a 30% correspondam a agrupamentos de tumores ocorridos em uma mesma família, ou tumores familiares, causados pela interação de genes de baixa penetrância e interações destes com o meio ambiente (Lindor, 2008).

Tumores hereditários ocorrem a partir de uma predisposição herdada, que tem como origem alterações germinativas em genes ligados ao controle celular, genes supressores de tumor (podem originar tumores quando inativados), genes de reparo (cuja inativação leva ao acúmulo de mutações somáticas) e oncogenes (podem predispor ao câncer quando superexpressos), que conferem a seu portador um risco de câncer significativamente maior que o da população (Tucker e Friedman, 2002).

A maioria das síndromes de predisposição hereditária ao câncer está associada a mutações em genes supressores tumorais e tem herança autossômica dominante, conferindo um risco de 50% aos familiares de primeiro grau de um indivíduo afetado (Tucker e Friedman, 2002).

Tumores hereditários podem ser identificados devido às características específicas que os diferem de tumores esporádicos, tais como: (1) história familiar incluindo vários casos de um mesmo tipo de câncer e/ou vários casos de diversos tipos de câncer na família; (2) diagnóstico de câncer em idade jovem; (3) ocorrência de múltiplos tumores primários em um mesmo indivíduo; (4) presença de multifocalidade ou bilateralidade do tumor (Hartmann, Schaid *et al.*, 1999; Rebbeck, Lynch *et al.*, 2002; Alpert e Haffty, 2004; Narod e Offit, 2005).

Na tabela 1 estão listadas algumas das principais síndromes de predisposição hereditária ao câncer, suas incidências estimadas, principais neoplasias associadas, gene(s) envolvido(s) e sua localização cromossômica.

Tabela 1. Principais Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer.

Síndrome de predisposição hereditária (OMIM)	Incidência estimada	Principal gene associado	Cromossomo	Principais tumores associados	Referências
Li-Fraumeni / Li-Fraumeni-Like (SLF/LFL) (#151623)	1/2.000-5.000	<i>TP53</i>	17q13	Sarcomas, mama, sistema nervoso central, adrenocortical	Li e Fraumeni, 1969a; Malkin, Li <i>et al.</i> , 1990
Câncer de mama e ovário (HBOC) (#113705 e #600185)	1/500 – 1.000	<i>BRCA1</i> <i>BRCA2</i>	17q21 13q12-13	Mama, ovário, próstata, pâncreas	Lynch e Krush, 1971; Whittemore, Gong <i>et al.</i> , 2004
Lynch (#120435)	1:660 - 2.000	Mismatch repair genes: <i>MSH2</i> , <i>MLH1</i> , <i>MSH6</i> , <i>PMS2</i>	2p21, 3p21.3 2p16, 7p22.2	Colorretal, endométrio, estômago, ovário, mama	De La Chapelle, 2005
Câncer de mama e colorretal (HBC) (#604373)	Indeterminada	<i>CHEK2</i>	22q12.1	Mama, colorretal	Meijers-Heijboer, Wijnen <i>et al.</i> , 2003
Retinoblastoma hereditário #180200	1/13.500-25.000	<i>RB</i>	13q14	Retinoblastoma, osteossarcoma	Doz, 2006
Melanoma familiar (#606719)	Indeterminada	<i>CDKN2A</i>	9p21	Melanoma, pâncreas	Whelan, Bartsch <i>et al.</i> , 1995
Neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e tipo 2 (#171400 e #162300)	1-100.000 e 1/30.000	<i>MEN1</i> e <i>RET</i>	11q13 e 10q11.2	Medular de tireóide, feocromocitoma	Lindor, 2008
Cowden (#158350)	1/200.000	<i>PTEN</i> (MMAC1 ou TEP1)	10q23.3	Mama, tireóide, endométrio	Nelen, Kremer <i>et al.</i> , 1999

Legenda: #: refere-se ao número da doença cadastrado no *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM)

A confirmação de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer poderá ser feita, na maioria dos casos, a partir da identificação de uma mutação germinativa patogênica em gene(s) relacionado(s) à síndrome.

2.5. Síndrome de Li-Fraumeni

2.5.1. Histórico e descrição da Síndrome

Ao revisar 280 prontuários e 418 atestados de óbito de crianças norte-americanas diagnosticadas com rhabdomyosarcoma na infância, Li e Fraumeni (1969) observaram que 4 das famílias estudadas apresentavam um perfil de alta ocorrência de sarcomas na infância e câncer de mama em idade jovem (Li e Fraumeni, 1969a). A partir da observação deste agrupamento de tumores pouco

frequentes e diagnosticados em idade precoce em relação a população geral, foi proposta uma nova síndrome de predisposição hereditária - a Síndrome de Li-Fraumeni. Inicialmente, a síndrome foi denominada como SBLA (do inglês *sarcoma, breast, leukemia and adrenocortical tumor syndrome*) (Lynch e Guirgis, 1979) e hoje sua denominação é dada pelos nomes daqueles que a descreveram pela primeira vez, tendo a sigla SLF (Li e Fraumeni, 1969b).

A caracterização inicial do espectro de tumores associados à SLF foi realizada a partir de critérios específicos, também chamados de “SLF - clássicos”, condizentes com a definição original da síndrome baseada na história familiar: um indivíduo portador de sarcoma em idade jovem e dois familiares de primeiro e/ou segundo grau portadores de osteossarcomas, sarcomas de partes moles, câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, tumores de sistema nervoso central, carcinomas adrenocorticais e leucemias agudas. Estudos posteriores caracterizaram a SLF pela concentração familiar de sarcomas de partes moles, sarcomas ósseos, tumores de sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical e câncer de mama, diagnosticados antes dos 45 anos de idade, que foram descritos como tumores centrais da síndrome e denominados como “*core tumors*” do fenótipo (Li e Fraumeni, 1982; Malkin, Li *et al.*, 1990).

No entanto, a ocorrência de outros tumores, além daqueles identificados inicialmente, foi descrita em portadores da SLF e está incluída nas formas variantes, coletivamente denominadas de Síndrome de Li-Fraumeni-Like (LFL) e que incluem casos de: câncer de próstata, pulmão, pâncreas e melanoma. Outros tumores, além dos citados acima, foram associados à SLF/LFL, mas não constam em nenhum critério clínico por terem sido encontrados em poucas famílias e a frequência exata não ser conhecida (Strong, Stine *et al.*, 1987; Li, Fraumeni *et al.*, 1988; Hartley, Birch *et al.*, 1993; Varley, Evans *et al.*, 1997; Birch, Alston *et al.*, 2001; Nichols, Malkin *et al.*, 2001).

Apesar do mecanismo molecular associado à SLF e sua variante LFL (SLF/LFL) não ser conhecido até o final da década de 80, dois estudos sugeriram que a doença tinha etiologia genética. O primeiro, ao encontrar mutações inativadoras no gene *TP53* em osteossarcomas esporádicos, carcinomas de mama, leucemias e sarcomas de partes moles (Nigro, Baker *et al.*, 1989). O segundo, ao evidenciar que camundongos transgênicos com p53 mutante também apresentavam

incidência aumentada para os “*core tumors*” da síndrome (Lavigueur, Maltby *et al.*, 1989).

Mediante sequenciamento genômico do gene *TP53* (exons 5-8) de indivíduos provenientes de 5 famílias com critérios clínicos da SLF, Malkin e colaboradores descreveram pela primeira vez que uma alteração genética germinativa poderia explicar a ocorrência da SLF, ao encontrarem mutações germinativas no gene *TP53* em todas as famílias estudadas (Malkin, Li *et al.*, 1990).

Com a descoberta do gene causador da SLF e com intuito de definir o diagnóstico clínico de famílias que apresentavam tumores típicos em idade precoce, um critério diagnóstico adicional ao SLF - Clássico foi proposto, sendo menos restritivo e denominado Li-Fraumeni variante ou Li-Fraumeni-like (LFL) – critérios de Birch (Birch, Hartley *et al.*, 1994). Nas décadas posteriores outros critérios mais abrangentes para a variante LFL foram definidos, tais como os critérios de Eeles, Chompret e Chompret Modificado (primeira versão e versão atual sugerindo a inclusão de “caso isolado de carcinoma de plexo coróide” no critério modificado (Eeles, 1995; Frebourg, Abel *et al.*, 2001; Bougeard, Sesboué *et al.*, 2008; Tinat, Bougeard *et al.*, 2009).

2.5.2. Diagnóstico Clínico, Molecular e Espectro Tumoral da Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like

O diagnóstico da síndrome (SLF e variante LFL) é inicialmente clínico, sendo em geral realizado a partir da análise de heredograma observando-se a ocorrência de determinados tumores e idades ao diagnóstico. Os critérios para determinação do diagnóstico clínico, listados detalhadamente na tabela 2, são o clássico - SLF e suas variantes LFL - Birch, Eeles (Eeles 1 e Eeles 2) e Chompret (Chompret e Chompret Modificado) (Li, Fraumeni *et al.*, 1988; Birch, Hartley *et al.*, 1994; Eeles, 1995; Frebourg, Abel *et al.*, 2001; Bougeard, Sesboué *et al.*, 2008; Tinat, Bougeard *et al.*, 2009).

Tabela 2. Critérios Clínicos da Síndrome de Li-Fraumeni e da variante Li-Fraumeni-Like.

Critério clínico	Descrição
SLF – Clássico (Li, Fraumeni <i>et al.</i> , 1988)	I- sarcoma na infância ou em idade jovem (≤ 45 anos) e II- familiar de 1° grau com qualquer câncer em idade jovem (≤ 45 anos) e III- familiar de 1° ou 2° graus com diagnóstico de câncer em idade jovem (≤ 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade;
LFL – Birch (Birch, Hartley <i>et al.</i> , 1994)	I- câncer na infância (qualquer idade) ou sarcoma, tumor SNC ou CAC (≤ 45 anos) e II- familiar de 1° ou 2° graus com câncer típico da SLF (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC ou leucemia) em qualquer idade e III- familiar de 1° e 2° graus com qualquer câncer < 60 anos;
LFL - Eeles (Eeles, 1995)	1 I- presença de 2 familiares de 1° e 2° graus com tumor típico da SLF em qualquer idade (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC, leucemia, melanoma, câncer de próstata, câncer de pâncreas); 2 I- diagnóstico de sarcoma em qualquer idade e II- diagnóstico de pelo menos outros 2 tumores em familiares de 1° e 2° graus (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): CM < 50 anos, tumor de SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata, câncer de pâncreas < 60 anos ou sarcoma em qualquer idade;
LFL - Chompret (Freboung, Abel <i>et al.</i> , 2001)	I- diagnóstico de sarcoma, tumor SNC, CM ou CAC < 36 anos e II- familiar de 1° e 2° graus com câncer (qualquer um dos descritos acima, exceto CM se o probando teve CM) ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade ou III- múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo: sarcoma, tumor SNC, CM ou CAC, com o primeiro tumor diagnosticado < 36 anos independente da história familiar ou IV- CAC em qualquer idade, independente da história familiar;
LFL - Chompret Modificado (Bougeard, Sesboué <i>et al.</i> , 2008; Tinat, Bougeard <i>et al.</i> , 2009)	I- caso índice com câncer típico da SLF (sarcoma, CM, tumor SNC, CAC, leucemia e carcinoma brônquio alveolar de pulmão < 46 anos) e II- familiar de 1° e 2° graus com câncer típico da SLF < 56 anos (exceto CM se o caso índice tiver esse tumor) ou múltiplos tumores ou III- paciente índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da SLF e o primeiro com < 46 anos ou IV- CAC ou carcinoma de plexo coróide em qualquer idade ou CM < 36 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> ;

Legenda: SNC- sistema nervoso central; CM- câncer de mama; CAC- carcinoma adrenocortical; SLF- Síndrome de Li-Fraumeni; LFL- Li-Fraumeni-Like;

A SLF é uma síndrome de alta penetrância com fenótipo variável de acordo com o gênero. Estima-se que pacientes com SLF apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, comparado a ocorrência de 1% em indivíduos da população geral na mesma faixa etária, e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 60 anos de idade (Birch, Alston *et al.*, 2001).

Em estudo recente, foi evidenciado que a penetrância para ocorrência de um câncer primário é de 12, 35, 52 e 80% nas idades de 20, 30, 40 e 50 anos, respectivamente. Nesse mesmo estudo, quando a análise foi realizada por sexo, as

mulheres apresentaram um risco maior do que os homens de desenvolver câncer ao longo da vida (93% *versus* 68% aos 50 anos de idade) e idade ao diagnóstico do primeiro câncer mais precoce (29 anos *versus* 40 anos) (Hwang, Lozano *et al.*, 2003).

Diversos estudos evidenciaram que indivíduos afetados com SLF apresentam um risco aumentado de ocorrência de múltiplos tumores primários (Strong, Stine *et al.*, 1987; Garber, Goldstein *et al.*, 1991; Hisada, Garber *et al.*, 1998). De acordo com um estudo envolvendo 200 indivíduos com um tumor primário provenientes de 24 famílias com critérios para SLF, observou-se que 30 (15%) desenvolveram um segundo tumor primário, 8 (4%) desenvolveram um terceiro tumor primário, e 4 (2%) desenvolveram um quarto tumor primário (Hisada, Garber *et al.*, 1998). Outros estudos evidenciaram que a chance de desenvolver múltiplos tumores primários é inversamente proporcional a idade ao diagnóstico do primeiro tumor, sendo os riscos relativos de incidência de um segundo tumor de 83; 9,7 e 1,5 para indivíduos com diagnóstico de câncer nas faixas etárias de 0 a 19 anos, 20 a 44 anos e mais de 45 anos, respectivamente. Em sucessivas gerações de portadores, a antecipação da idade ao diagnóstico também foi observada (Hisada, Garber *et al.*, 1998; Trkova, Hladikova *et al.*, 2002).

O diagnóstico molecular da SLF/LFL, realizado através da análise do gene *TP53*, é indicado para pacientes que preencham os critérios diagnósticos clínicos (descritos na tabela 2) (Olivier, Eeles *et al.*, 2002). Os critérios clínicos para SLF/LFL vão desde os mais estritos, como o clássico, Birch e Chompret, até os menos estritos como os de Eeles 1, ao passo que a identificação de mutações germinativas nestas famílias é mais freqüente em indivíduos com critérios mais estritos e menos freqüente em famílias com critérios mais abrangentes e menos rigorosos.

Ao longo das últimas décadas diversos estudos avaliaram a prevalência de mutações germinativas em *TP53* em diferentes grupos fenotípicos, incluindo indivíduos com critérios clínicos para SLF/LFL, casos isolados de câncer de mama em idade jovem, casos com história familiar para outras síndromes e casos com história familiar de diversos tipos de tumores. As prevalências de mutações germinativas no gene *TP53* encontradas nos principais estudos estão descritas na tabela 3.

Tabela 3. Prevalência de mutação germinativa no gene *TP53* em estudos publicados na literatura.

Descrição do grupo por critério ou fenótipo	Casos "n"	Casos com mutação germinativa em <i>TP53</i> "n"	Prevalência de mutação no gene <i>TP53</i> (%)	Referência
SLF - Clássico	12	6	50,0	Birch, Hartley <i>et al.</i> , 1994 Varley, McGown <i>et al.</i> , 1997 Evans, Birch <i>et al.</i> , 2002 Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009 Ruijs <i>et al.</i> 2010
	21	15	71,5	
	30	23	77,0	
	54	30	56,0	
	11	8	73,0	
LFL - Birch	9	1	11,1	Birch, Hartley <i>et al.</i> , 1994 Varley, McGown <i>et al.</i> , 1997 Evans, Birch <i>et al.</i> , 2002 Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009 Ruijs, Verhoef <i>et al.</i> , 2010
	18	4	22,2	
	18	9	50,0	
	102	16	16,0	
	36	10	28,0	
LFL - Chompret	195	69	35,0	Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009 Bougeard, Limacher <i>et al.</i> , 2001
	232	67	29,0	
LFL - Chompret Modified	105	22	21,0	Tinat, Bougeard <i>et al.</i> , 2009; Ruijs, Verhoef <i>et al.</i> , 2010
LFL - Eeles	205	29	14	Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009
CM e sarcoma (CM no probando ou em familiar de 1º grau)	21	1	4,8	Evans, Birch <i>et al.</i> , 2002
CM < 30 anos, com HF para HBOC ou LFL	37	2	5,0	Laloo, Varley <i>et al.</i> , 2006
CM < 30 anos, sem HF para SLF	64	2	3,1	Laloo, Varley <i>et al.</i> , 2006
CM < 30 anos, sem mutação em BRCA1/2 e sem HF para SLF/LFL	95	2	2,1	Ginsburg, Akbari <i>et al.</i> , 2009
CM < 30 anos, sem HF de câncer em 1º ou 2º grau	14	1	7,1	Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009
CM < 36 anos, sem mutações em BRCA1/2	161	12	7,4	Tinat, Bougeard <i>et al.</i> , 2009
CM < 36 anos, sem HF para SLF/LFL	128	5	4,0	Tinat, Bougeard <i>et al.</i> , 2009
CM < 36 anos, com HF para SLF/LFL	8	1	12,5	Evans, Birch <i>et al.</i> , 2002

Tabela 3 (continuação)

Descrição do grupo por critério ou fenótipo	Casos "n"	Casos com mutação germinativa em TP53 "n"	Prevalência de mutação no gene TP53 (%)	Referência
CM entre 30-39 anos com 2 ou mais familiares de 1° ou 2° grau com CM ou CO	42	3	7,1	Mouchawar, Korch <i>et al.</i> , 2010
Probando com HF de câncer	525	91	17,3	Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009
Probando com 2 ou mais familiares com diferentes tipos de câncer	122	37	30,3	Gonzalez, Noltner <i>et al.</i> , 2009
Carcinoma de plexo coróide	18	8	44,4	Tabori, Baskin <i>et al.</i> , 2010
Papiloma plexo coróide	6	0	0	Tabori, Baskin <i>et al.</i> , 2010
Mulheres com CM expressando HER2	12 11 32 30	10 8 20 20	83,0 63,0* 62,5** 67,0	Wilson, Bateman <i>et al.</i> , 2010 Masciari, Dillon <i>et al.</i> , 2012 Melhem-Bertrandt, Bojadzieva <i>et al.</i> , 2012

Legenda: *carcinomas; ** carcinomas *in situ*; n- número SLF- Síndrome de Li-Fraumeni; LFL- Li-Fraumeni-Like; CM- câncer de mama; HF- história familiar; HBOC- Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário; CO- câncer de ovário;

Além do espectro tumoral "clássico" incluído nos critérios clínicos para SLF/LFL, estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de tipos tumorais adicionais em famílias com o diagnóstico clínico ou molecular da síndrome. Frebourg e colaboradores descreveram a ocorrência de melanoma, tumores de células germinativas, tumores de estômago e tumores de Wilms nas famílias portadoras da síndrome (Frebourg, Abel *et al.*, 2001). Birch e colaboradores realizaram um estudo envolvendo 28 famílias britânicas com critérios para SLF/LFL, no qual compararam o espectro tumoral dos membros destas famílias com os registros de tumores da população do Reino Unido. Isto permitiu a identificação de tumores associados à síndrome. Alguns fortemente associados, como o câncer de mama, sarcoma de partes moles, sarcoma ósseo, carcinoma adrenocortical, tumor de Wilms e tumor *phyllodes* maligno da mama; outros associados moderadamente à síndrome como câncer de pâncreas e outros levemente associados à síndrome como leucemia e

neuroblastoma, câncer de pulmão, bexiga, próstata, ovário e colo de útero (Birch, Alston *et al.*, 2001).

No mesmo ano, Nichols e colaboradores, ao avaliar o espectro tumoral em indivíduos com a SLF/LFL, observaram que os seis tumores inicialmente descritos como típicos da SLF (câncer de mama, sarcoma de partes moles, sarcoma ósseo, tumor de sistema nervoso central, leucemia e carcinoma adrenocortical) correspondiam a 77% dos tumores diagnosticados em famílias portadoras das mutações germinativas no gene *TP53* (Nichols, Malkin *et al.*, 2001).

Até Julho de 2012, 1165 tumores foram descritos no banco de dados R15 do IARC em mais de 30 sítios tumorais distintos em portadores de mutações germinativas do gene *TP53*, conforme demonstra a figura 4 (*International Agency for Research on Cancer*, 2012).

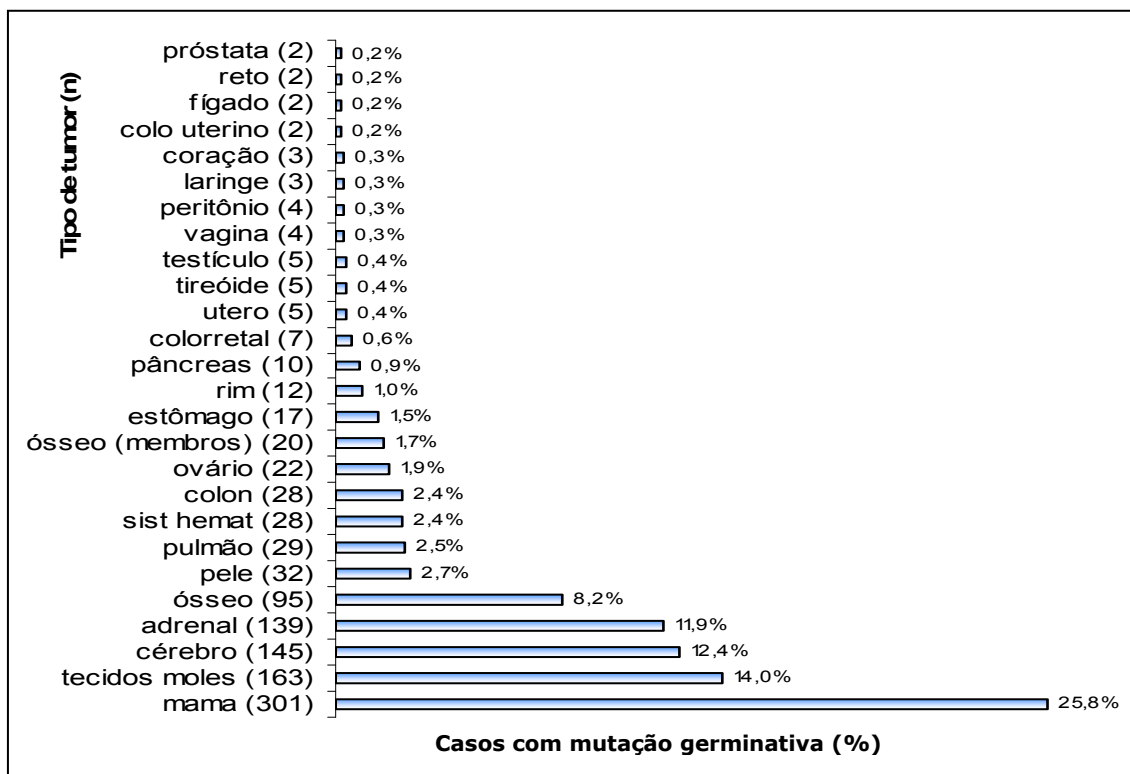


Figura 4. Tumores associados a mutações germinativas no gene *TP53*.

Legenda: número total de casos- 1165; 45 casos (3,7%)- tipo tumoral não informado; 35 casos (2,8%)- outros tipos de câncer na frequência de 0,1%;

Modificada de: IARC, R15 *TP53* database, 2012.

2.6. A proteína p53, o gene supressor tumoral *TP53* e a Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like

2.6.1 Caracterização da proteína p53

“Guardiã do Genoma” (Lane, 1992), “Uma Acrobata na Tumorigênese” (Moll e Schramm, 1998), “A Estrela da Morte” (Vousden, 2000), “Policia! Bom e Mau” (Sharpless e Depinho, 2002) e “a tomada de decisão por p53: vida, morte e câncer” (Oren, 2003), são algumas das citações relacionadas à proteína p53 nas décadas após sua descoberta em 1979, através de estudos envolvendo abordagens virológicas (Lane e Crawford, 1979; Linzer e Levine, 1979) e sorológicas (Deleo, 1979). “A Molécula do Ano” foi o título atribuído à proteína p53 pela Revista Science em 1993, quando as primeiras alterações na estrutura do seu gene, denominado *TP53*, foram encontradas em cânceres humanos (Harris, 1993). Além disso, a perda de *TP53* ou a presença de mutações que inativam o gene foi evidenciada em mais da metade dos tumores analisados de uma ampla gama de sítios (Baker, Fearon *et al.*, 1989; Nigro, Baker *et al.*, 1989; Hollstein, Sidransky *et al.*, 1991; Marshall, 1991; Caron De Fromentel e Soussi, 1992; *International Agency for Research on Cancer*, 2012).

A p53 é uma proteína nuclear expressa na maioria das células de forma latente, cuja função é impedir a proliferação de células que sofreram alguma alteração em seu material genético. Seu principal mecanismo de ação é como fator de transcrição que, em condições fisiológicas, apresenta uma meia-vida relativamente curta que dura de 5 a 20 minutos (Nigro, Baker *et al.*, 1989; Hollstein, Sidransky *et al.*, 1991; Levine, 1997).

Conforme demonstrado na figura 5, a proteína p53 é ativada por diferentes tipos de estresse, tais como: dano ao DNA, hipóxia, estresse oxidativo, sinalização oncogênica, encurtamento telomérico, estresse ribossomal e deprivação de nutrientes, entre outros e, de acordo com natureza e intensidade do estresse, tipo celular e “background genético” irá determinar o tipo de resposta celular a ser desencadeado (apoptose, parada de ciclo celular, reparo ao DNA, processos metabólicos e antioxidantes, senescência, inibição da angiogênese, metástase,

entre outros). Adicionalmente, cada uma das vias de sinalização mediadas pela proteína p53 poderá ser ativada pela expressão de diferentes proteínas associadas a p53 (Oren, Damalas *et al.*, 2002; Vousden e Lane, 2007; Murray-Zmijewski, Slee *et al.*, 2008).

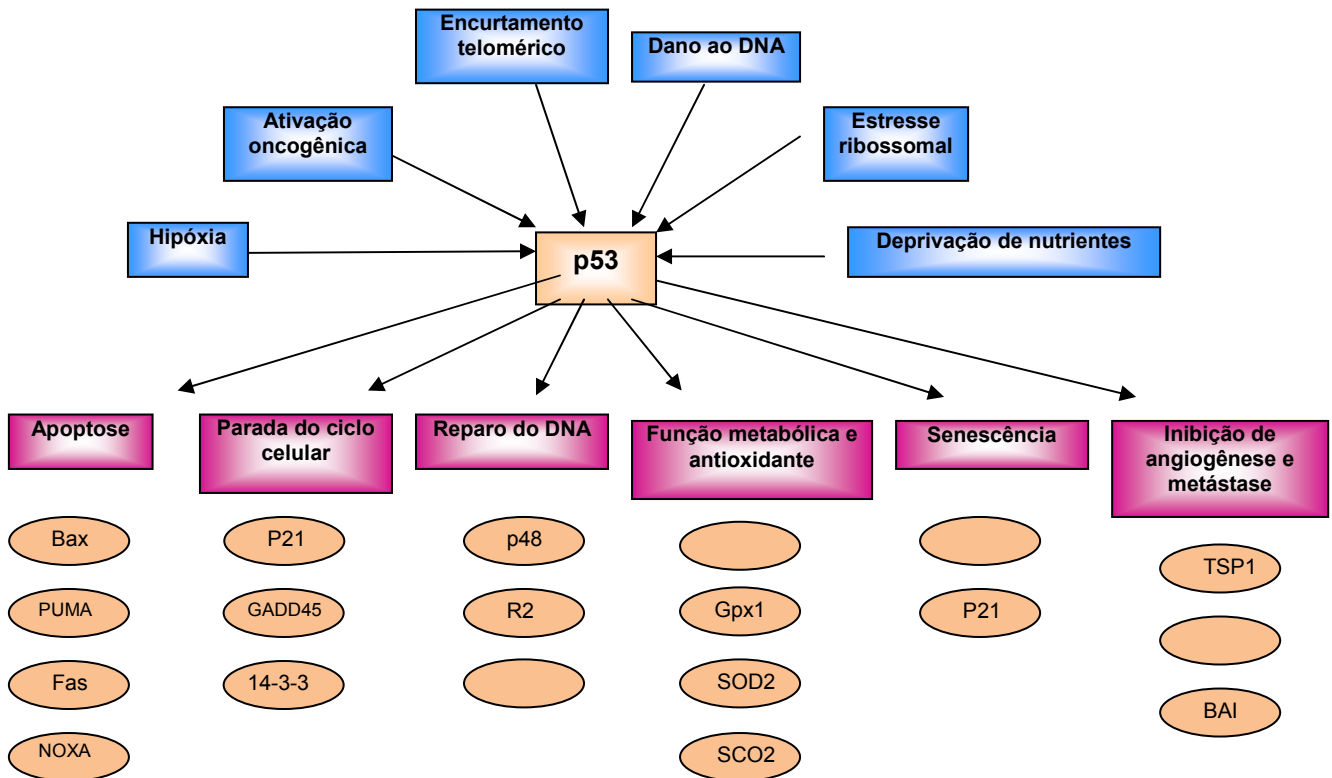


Figura 5. Mecanismos ativadores da proteína p53 e suas atividades supressoras tumorais.

Legenda: a proteína p53 tem como função integrar respostas celulares (em roxo) a diferentes tipos de estresse (em azul). Cada uma das vias de sinalização mediadas por p53 é ativada pela expressão de diferentes proteínas (em laranja);

Modificada de: Vousden e Lane, 2007.

Em condições normais, a proteína p53 encontra-se em baixos níveis celulares, e seu principal regulador é a proteína mdm2, formando um complexo p53/mdm2. Este complexo possibilita o redirecionamento da p53 do núcleo para o citoplasma, onde a mdm2 age como uma ubiquitina-ligase, possibilitando a degradação de p53 pelos proteossomos. O complexo p53/mdm-2 é regulado por p14Arf (*Alternative*

Reading Frame), uma proteína de 14 kD codificada por uma leitura alternativa da matriz de leitura aberta do gene *CDKN2A*, que também codifica o gene supressor de tumor *p16* (Ashcroft e Vousden, 1999).

Na presença de situações de estresse celular que levam ao dano do DNA, a p53 é rapidamente induzida e as células normais aumentam sua expressão para que o ciclo celular seja bloqueado até que haja o reparo do DNA. Por outro lado, proteínas p53 mutantes podem se tornar mais estáveis ou escapar ao mecanismo regulatório de mdm2, se acumulando na célula. Nesta situação, pode ocorrer o chamado efeito dominante-negativo, no qual a proteína mutante liga-se a p53 selvagem produzida pelo alelo normal e, como a forma mutante é produzida de forma mais abundante que a forma selvagem, ou degradada de forma menos eficiente, esta ligação inativa a atividade residual do alelo selvagem, não havendo necessidade de um segundo evento (mutação) para inativá-la, como geralmente ocorre na carcinogênese relacionada a genes supressores de tumor em outras síndromes hereditárias (Srivastava, Wang *et al.*, 1993).

2.6.2. O Gene *TP53* e a proteína p53

O gene supressor tumoral *TP53* (OMIM #191170) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) com tamanho aproximado de 20 Kb e sua região codificante é dividida em 11 éxons, sendo o primeiro deles não codificante.

O gene *TP53* codifica a fosfoproteína de massa nuclear de 53 Kilodaltons (KDa) denominada p53 (figura 6), que funciona como fator de transcrição tetramérico (quatro subunidades idênticas constituem a forma ativa da molécula). Cada monômero de p53 é composto por 393 aminoácidos organizados em domínios distintos, sendo a seqüência codificante composta por 5 domínios, cada um deles responsável por funções específicas (May e May, 1999).

Os primeiros 73 aminoácidos da proteína p53 constituem o domínio amino-terminal ou N-terminal de transativação (aminoácidos 1-42; 43-62), uma região proteica que interage com a maquinaria de transcrição de genes regulados positivamente. A seguir, há um domínio rico em prolinas (aminoácidos 63-97) envolvido na interação proteína-proteína e na função pró-apoptótica de p53. Na

região central (aminoácidos 102-292), há um domínio de ligação ao DNA, altamente conservado evolutivamente, que interage diretamente com sequências nucleotídicas específicas, alvo da maioria das mutações somáticas encontradas nos tumores esporádicos e de mutações germinativas observadas em famílias com a SLF/LFL. Por fim, há uma região carboxi-terminal ou C-terminal com um domínio de oligomerização (aminoácidos 323-356) fundamental para a configuração espacial da proteína p53, primeiramente para a dimerização e posteriormente para dimerização de dímeros resultando em tetrâmeros. O domínio final da proteína é o de domínio de regulação (aminoácidos 363 a 393) (Børresen, Andersen *et al.*, 1992; Levine, 1997; Liptenko e Prives, 2006).

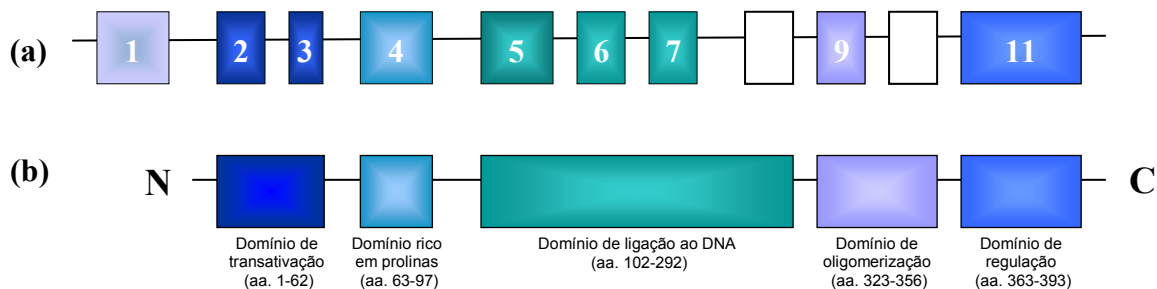


Figura 6. Representação dos éxons e íntrons do gene *TP53* e da proteína p53 com seus respectivos domínios funcionais.

Legenda: (a) Representação dos éxons 1 a 11 do gene *TP53* e (b) Representação da proteína p53 e seus domínios funcionais. As diferentes cores correspondem aos domínios da proteína e seus respectivos éxons codificantes;

Modificado de: Børresen, Andersen *et al.*, 1992.

2.6.3. Mutações e polimorfismos no gene *TP53*

No banco de dados R15 do *IARC*, até o momento, foram descritas 597 mutações germinativas, 27.580 mutações somáticas e 85 polimorfismos (*International Agency for Research on Cancer*, 2012).

Estima-se que mutações germinativas no gene *TP53* ocorrem em baixa frequência, segundo estudos conduzidos na América do Norte e na Europa, acometendo 1 a cada 2.000-5.000 indivíduos na população geral. No entanto,

mutações somáticas no gene *TP53* são encontradas em mais de 50% dos tumores humanos (Laloo, Varley *et al.*, 2003; Garber e Offit, 2005).

Aproximadamente 84% das mutações observadas em *TP53*, tanto somáticas quanto germinativas, ocorrem no domínio de ligação ao DNA (éxons 5-8), responsável pela interação da proteína com o DNA. Destas, aproximadamente 90% são mutações do tipo *missense*. As mutações que ocorrem fora deste domínio, são na sua maioria do tipo *nonsense*. Além disso, aproximadamente 30% das mutações *missense* germinativas ou somáticas, ocorrem em seis códons preferenciais (175, 245, 248, 249, 273 e 282), também chamados de “*hotspots*”, conforme demonstrado na figura 7) (Hollstein, Sidransky *et al.*, 1991).

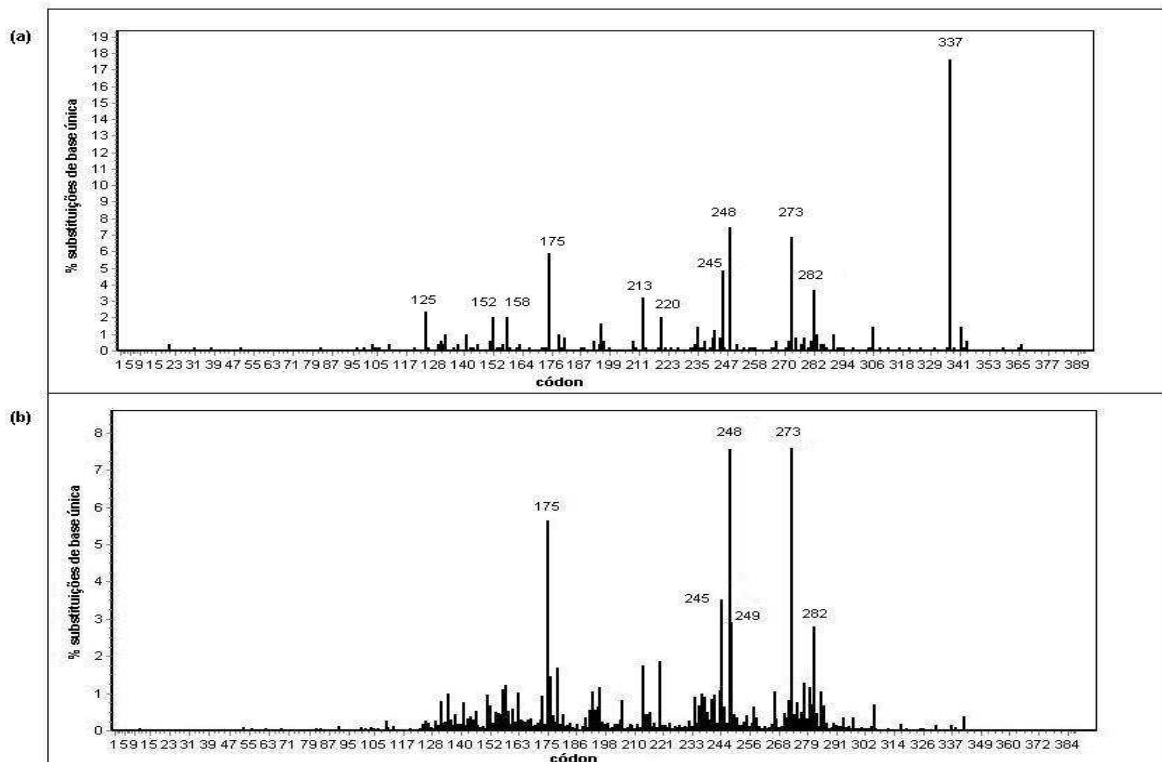


Figura 7. Códons atingidos por mutações do tipo *missense* germinativas e somáticas no gene *TP53*.

Legenda: (a) mutações germinativas; (b) mutações somáticas;

Modificado de: IARC, R15 TP53 database, 2012.

A frequência de mutações germinativas e somáticas de ponto do tipo “*missense*” é muito maior em *TP53* (na frequência total de 73,6% e 72,8%, respectivamente) do que na maioria dos genes supressores tumorais envolvidos em

síndromes hereditárias ligadas ao câncer, tais como *BRCA1*, *APC*, *RB1* ou *ATM*, nos quais os tipos predominantes de mutação são “*nonsense*” ou perda de sentido, pequenas deleções ou inserções, que resultam em proteínas truncadas, ocasionando parada prematura da tradução. Esta diferença com relação a outras síndromes de predisposição evidencia o potencial das formas mutantes de p53 de conferir vantagens seletivas para a carcinogênese (Hussain e Harris, 1998).

Entre os 85 polimorfismos identificados no gene *TP53* (anexo E), a grande maioria está localizada em íntrons. As conseqüências funcionais da maioria destes polimorfismos é desconhecida, mas acredita-se que, de alguma forma, afetem a função da proteína p53 (Lozano e Levine, 1991). Os polimorfismos mais conhecidos no gene *TP53* são: PIN2 (g.11117; rs1642785), PIN3 (duplicação de 16pb a partir de g.11259; rs17878362) e PEX4 (g.11446; rs1042522) (*International Agency for Research on Cancer*, 2012).

Entre os estudos envolvendo estes polimorfismos, destacam-se dois estudos: (1) estudo de Marcel e colaboradores, demonstrando que a ocorrência do polimorfismo PIN3 altera a estrutura *G- quartet* (ou G-quadruplex) que regula o processamento do mRNA de p53, alterando as taxas de síntese de diferentes isoformas da proteína p53 (Marcel, Tran *et al.*, 2011); (2) outro estudo de Marcel e colaboradores analisando o impacto dos polimorfismos PIN2, PIN3, PEX4 e SNP309 (rs2279744) do gene *MDM2* sobre a idade ao diagnóstico de câncer entre portadores e não portadores de mutações germinativas no gene *TP53*. Entre os resultados evidenciados, destaca-se: (1) os indivíduos com mutação germinativa no gene *TP53* e sem a duplicação de 16bp tiveram o diagnóstico de câncer 19 anos mais cedo que indivíduos com a duplicação e que todos os casos de câncer diagnosticados com menos de 35 anos não apresentavam a duplicação de 16bp; (2) os polimorfismos PIN2 e PEX 4 não apresentaram-se como modificadores de risco em pacientes com mutações no gene *TP53*; (3) o efeito do polimorfismo SNP309 do gene *MDM2* é significativo somente na determinação da idade ao diagnóstico de sarcomas de partes moles em portadores de mutações germinativas em *TP53* (Marcel, Palmero *et al.*, 2009).

2.6.4. A mutação germinativa *TP53* p.R337H

Em 2001, um grupo de pesquisadores do Estado do Paraná, coordenados por Raul Ribeiro detectaram a troca de uma arginina por uma histidina no códon 337 do éxon 10 do gene *TP53*, p.R337H, em incomum frequência: 35 de 37 crianças com carcinoma adrenocortical, provenientes de 25 famílias da região da periferia de Curitiba, apresentavam essa alteração (Ribeiro, Sandrini *et al.*, 2001). A mutação havia sido descrita em 1998 em apenas uma família na França (Bougeard, Limacher *et al.*, 2001; Olivier, Eeles *et al.*, 2002). Os autores relataram não haver história familiar documentada de outros tumores nas famílias das crianças portadoras. A partir destes achados, os autores sugeriram que esta era uma mutação tumor-específica (Ribeiro, Sandrini *et al.*, 2001).

No entanto, diversos estudos subsequentes envolvendo famílias brasileiras demonstraram que outros tumores além de carcinoma adrenocortical ocorriam em portadores da mutação, tais como: carcinoma de plexo coróide, osteossarcoma e câncer de mama (Latronico, Pinto *et al.*, 2001; Assumpção, Seidinger *et al.*, 2008; Custodio, Palmero, Schüler-Faccini *et al.*, 2008; Taques *et al.*, 2011; Seidinger, Mastellaro *et al.*, 2011; Gomes, Kotsopoulos *et al.*, 2012). A mutação *TP53* p.R337H, também foi identificada em famílias brasileiras preenchendo critérios clínicos para LFL, onde foi observado, em alguns casos, idade tardia de acometimento dos tumores e variação no espectro tumoral, com o aparecimento de tumores de papila duodenal e Ampola de Vater, que nunca haviam sido descritos como parte do espectro da síndrome (Achatz, Olivier *et al.*, 2007). Um resumo dos principais achados destes estudos está descrito na tabela 4.

Tabela 4. Principais estudos de prevalência da mutação TP53 p.R337H já publicados.

Amostra estudada	n	n portadores p.R337H (%)	Observações/Evidências	Referências
Crianças com CAC e familiares	36	35 (97,2)	(1) Nenhum caso de mutação <i>de novo</i> ; (2) Sem história familiar para SLF/LFL; (3) LOH em 5/5 (100%) casos; (4) Acúmulo de p53 nas células tumorais (8/11= 72,7%);	(Ribeiro, Sandrini <i>et al.</i> , 2001)
Adultos e crianças com CAC, respectivamente	37 e 18, respectivamente	14 (37,8) e 5 (27,7), respectivamente	(1) Nenhum caso de mutação <i>de novo</i> ; (2) Sem história familiar para SLF/LFL; (3) 1 paciente apresentava p.R337H em homozigose; (4) LOH em 8/11 (72,7%) casos;	(Latronico, Pinto <i>et al.</i> , 2001)
Adultos e crianças com CAC, respectivamente	5 e 21, respectivamente	1 (20) e 20 (75), respectivamente	(1) Nenhum caso de mutação <i>de novo</i> ; (2) 15/19 (78,9%) casos apresentavam a mutação no tumor;	(Sandrini, Villani <i>et al.</i> , 2005)
Crianças com CAC, familiares do lado não portador e do lado portador de p.R337H	40, 292 e 695, respectivamente	40 (100), 0 e 240 (34,5), respectivamente	(1) Nenhum caso com critério clínico de SLF; (2) 7 (17,5%) com critério clínico de LFL; (3) Penetrância de CAC de 9,9%;	(Figueiredo, Sandrini <i>et al.</i> , 2006)
Famílias com critérios clínicos para SLF e/ou LFL	45	6 (13,3)	(1) LOH em 1 caso de adenocarcinoma de mama; (2) As 6 famílias apresentavam critérios para LFL; (3) 3/6 (50%) casos apresentavam múltiplos tumores primários; (4) 3/6 (50%) casos tiveram o tumor primário < 45 anos;	(Achatz, Olivier <i>et al.</i> , 2007)
Mulheres sem câncer participantes de um programa de rastreamento mamográfico	750	2 (0,3)	(1) As portadoras apresentavam parentesco em 4º grau; (2) As portadoras apresentavam história familiar de diversos tumores, mas não preenchiam critérios para SLF/LFL no momento do recrutamento;	(Palmero, Schüler-Faccini <i>et al.</i> , 2008)
Mulheres com e sem câncer de mama	123 e 223, respectivamente	3 (4,5) e 0, respectivamente	(1) 2/3 (66,7%) portadoras apresentavam critérios para SLF/LFL; (2) LOH nos 3 casos portadores da mutação p.R337H;	(Assumpção, Seidinger <i>et al.</i> , 2008)
Crianças com carcinoma e papiloma de plexo coróide Crianças com CAC, tumores de SNC, leucemias, linfomas e sarcomas	22 e 7, respectivamente 493	14 (63,3) e 0, respectivamente 70/86 (93) com CAC, 9/13 (69) com carcinoma de plexo coróide e 3/41 (7,3) com osteossarcoma	(1) 7/14 (50%) apresentaram critérios para LFL; (1) Os casos de osteossarcoma em portadores apresentaram mau prognóstico; (2) LOH foi confirmada em 21/21 (100%) CAC, 2/2 (100%) carcinomas de plexo coróide e 2/3 (66,7%) osteossarcomas; (3) CPC e osteossarcomas apresentaram IHQ para p53 positiva;	(Custodio, Taques <i>et al.</i> , 2011) (Seidinger, Mastellaro <i>et al.</i> , 2011)
Mulheres com e sem câncer de mama	390 e 324, respectivamente	2 (0,5) e 0, respectivamente	(1) Ambos os casos tiveram diagnóstico de câncer de mama com < 40 anos e critérios clínicos para LFL;	(Gomes, Kotsopoulos <i>et al.</i> , 2012)

Legenda: CAC- carcinoma adrenocortical; SLF- Síndrome de Li-Fraumeni; LFL- Li-Fraumeni-Like; CPC- carcinoma de plexo coróide; LOH- perda de heterozigidade; IHQ- imuno-histoquímica;

Ribeiro e colaboradores demonstraram que p53 mutante (p53-R337H) apresentava uma atividade muito similar a de p53 selvagem (p53-wt) quando expressa em fibroblastos e em células de osteossarcoma (Ribeiro, Sandrini *et al.*, 2001).

Foi então que DiGiammarino e colaboradores, ao avaliar a estrutura e estabilidade da p53-R337H por análise cromatográfica em estudo *in vitro*, verificaram que ela é muito similar estruturalmente à p53-wt. No entanto, a proteína mutante apresentava estabilidade dependente de pH, sendo a conformação em tetrâmero menos estável em condições de pH alcalino. Em pH 8 a 37°C aproximadamente 70% das p53-R337H encontravam-se desnaturadas, enquanto que a p53-wt só desnaturava em temperaturas acima de 50°C seja qual fosse o pH. Adicionalmente, foi verificado que, na proteína selvagem, uma ponte de sal formava-se entre a Arg337 e Asp352, fundamental para a dimerização e posterior formação do tetrâmero e que a substituição de uma arginina (R) por uma histidina (H) na posição 337 introduzia diferenças químicas nesta região, levando a uma desestabilização da ponte de sal e desestruturação do tetrâmero, conforme demonstrado na figura 8 (Digiammarino, Lee *et al.*, 2002).

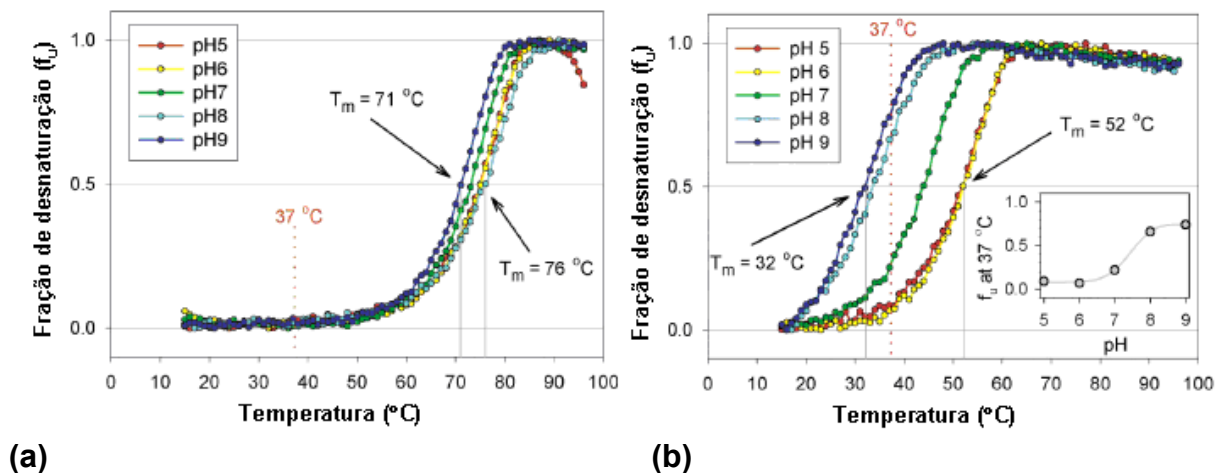


Figura 8. Perfil de desnaturação das proteínas p53-wt e p53-R337H.

Legenda: **(a)** Gráfico representando a estabilidade de p53-wt, evidenciando que a proteína só é desnaturada em temperaturas superiores a 50°C seja qual for o pH; **(b)** Gráfico representando a estabilidade de p53-R337H, evidenciando que à 37°C em pH 8, aproximadamente 70% dos tetrâmeros de p53-R337H estão desnaturados;

Modificado de: Digiammarino, Lee *et al.*, 2002.

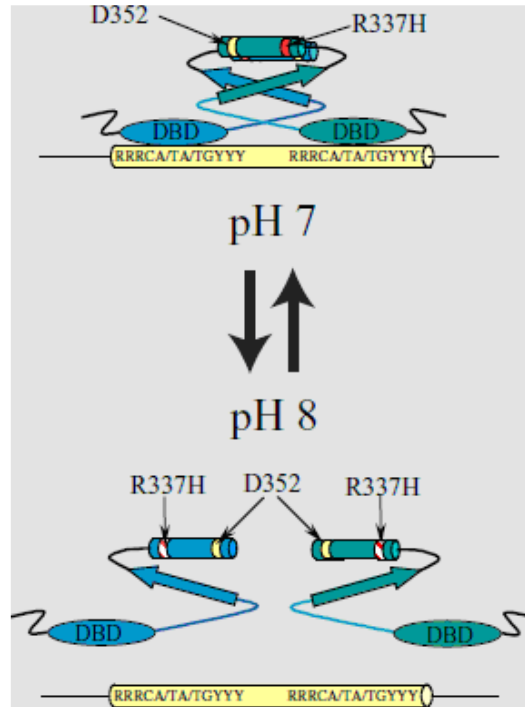


Figura 9. Representação esquemática dos efeitos do pH sobre a estrutura das proteínas p53-wt e p53-R337H.

Legenda: a figura superior demonstra um dímero de *TP53* ligado a uma sequência alvo em pH 7 em que a histidina na posição 337 (337H) está protonada (em vermelho), e mantém a ponte de sal com Asp352 (D352). Na figura inferior, em pH 8,0, a histidina (337H) é desprotonada e a ponte de sal com Asp352 (D352) é perdida, induzindo os dímeros de *TP53* a desnaturar provocando perda da afinidade de ligação do domínio de ligação ao DNA;

Modificado de: Hainaut, 2002.

Suspeitando de que havia um fundador comum a todos os portadores da mutação *TP53* p.R337H, Pinto e colaboradores realizaram a análise de dois *loci* polimórficos intragênicos (VNTRp53 e p53CA) no braço curto do cromossomo 17 em 22 portadores da mutação *TP53* p.R337H e em 60 não portadores da mesma. Dois diferentes alelos, ambos com 122 bp, foram encontrados em 56,8% (VNTRp53) e 54,5% (p53CA) de 44 alelos dos portadores e em 18,3% e 14,2% dos 120 alelos dos não portadores, respectivamente. A partir dos resultados obtidos, os autores propuseram que a ocorrência freqüente desta mutação no estado do Paraná parecia estar associada a efeito fundador (Pinto, Billerbeck *et al.*, 2004).

Estudo posterior de Garritano e colaboradores utilizando 29 polimorfismos de base única no gene *TP53* demonstrou mais claramente que em todos os portadores da mutação incluídos no estudo, provenientes do Sul e Sudeste do Brasil e de uma

família de Portugal, a mutação incide em um mesmo haplótipo. Mais freqüente em eurodescendentes, esse haplótipo (denominado A3 ou *Haplotype ID 3*, destacado em verde na tabela abaixo) difere em apenas um polimorfismo de base única (SNP na posição 28 da tabela abaixo, conhecido como SNP 179, destacado em amarelo) do haplótipo mais comumente encontrado na população (denominado A1 ou *Haplotype ID 1*) (tabela 5). A probabilidade de um portador de p.R337H ter ao acaso este haplótipo foi estimada em $3,8 \times 10^{-6}$, estabelecendo a existência de efeito fundador (Garritano, Gemignani *et al.*, 2010). No entanto, há poucos meses, Hermann e colaboradores (Herrmann, Heinze *et al.*, 2012) publicaram um estudo em que verificavam a prevalência de mutações germinativas em *TP53* em 103 adultos caucasianos com carcinoma adrenocortical cadastrados no Registro Alemão de Carcinomas Adrenocorticais (Nebbennierenkarzinom-Register, 2012). Entre os 4 pacientes com mutações em *TP53*, foi encontrado um paciente portador da mutação p.R337H no qual a mutação aparentemente não incide no mesmo haplótipo descrito por Garritano e colaboradores. Esse resultado indica a possibilidade de ocorrência independente desta mutação germinativa.

Tabela 5. Haplótipos resultantes do estudo de 29 polimorfismos no gene *TP53*.

SNP	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	n	frequência
Hap. ID																															
1	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	C	C	A	63	0.31
2	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	T	T	C	A	29	0.14
3	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	C	T	A	26	0.13
4	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	C	T	C	C	T	A	C	T	A	A	G	C	C	T	A	10	0.049
5	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	C	C	C	A	8	0.039
6	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	A	C	A	A	C	C	G	C	T	G	A	A	T	T	C	A	4	0.019
7	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	T	T	C	A	3	0.015
8	C	C	A	T	T	G	A	G	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	C	C	C	A	3	0.015
9	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	T	C	A	3	0.015
+47 haplótipos raros																														57	0.28

Legenda: SNP: polimorfismo de base única; Hap ID: identificação do haplótipo, n: número; Descrição dos SNPs: **1:** SNP1- 2287499; **2:** SNP6- 17551157; **3:** SNP19- 17883353; **4:** SNP20- 17882227; **5:** SNP21- 17885845; **6:** SNP23- 9903378; **7:** SNP27- 17881035; **8:** SNP29- 11656607; **9:** SNP48- 5819163; **10:** SNP54- 2078486; **11:** SNP68- sem identificação, posição no cromossomo 7179117; **12:** SNP77- 1642782; **13:** SNP83- 12944939; **14:** SNP87- 8079544; **15:** SNP93- 1642785; **16:** SNP95- 17878362; **17:** SNP96- 17883323; **18:** SNP99- 1800370; **19:** SNP102- 1794287; **20:** SNP112- 1625895; **21:** SNP116- 12947788; **22:** SNP129- 12949655; **23:** SNP137- 1641548; **24:** SNP138- 1641549; **25:** SNP152- 6503048; **26:** SNP174- 17880560; **27:** SNP176- 1614984; **28:** SNP179- 9894946; **29:** SNP182- 17886760;

Modificado de: Garritano, Gemignani *et al.*, 2010.

Recentemente, o grupo liderado por Figueiredo iniciou um estudo populacional visando a avaliação da ocorrência de p.R337H em todos os recém-

nascidos do Estado do Paraná. O projeto incluiu a análise da mutação no programa de triagem neonatal do Estado do Paraná, tendo sido aprovado pelo congresso como projeto de lei (número 268/2008) e recebendo apoio do governo do Estado (Lei número 2300/2011). Dados referentes ao primeiro ano do estudo foram publicados na forma de dissertação de mestrado por Piovezan, indicando que a mutação havia sido identificada em 64 recém nascidos entre os primeiros 30.098 testados, o que corresponde a uma prevalência média de 2,12 portadores em 1000 recém-nascidos vivos. A prevalência foi estimada com maior precisão em sete regionais de saúde do Estado de Curitiba, variando de 1,52 a 3,9/1000 (Piovezan, 2006). Estimativa de frequência similar da mutação p.R337H foi evidenciada em estudo de Palmero e colaboradores, que verificou a presença da mutação p.R337H em 2 de 750 mulheres sem câncer, acompanhadas anualmente na Coorte de Rastreamento Mamográfico Núcleo Mama Porto Alegre (frequência estimada em 0,3%), no Estado do Rio Grande do Sul (Palmero, Schüler-Faccini *et al.*, 2008).

Apesar das evidências de que mutação p.R337H é frequente no Sul do país, Achatz e colaboradores (Achatz, Hainaut *et al.*, 2009) avaliaram criticamente a realização do teste preditivo no contexto de triagem neonatal e concluíram que atualmente ainda não são preenchidos todos os critérios necessários para a inclusão do teste na triagem neonatal, como realizado no Paraná (Wilson e Jungner, 1968). Limitações no conhecimento atual acerca da mutação e do fenótipo associado dificultam a justificativa para inclusão deste teste genético preditivo em programas de triagem de massa. Atualmente, o teste preditivo de mutações de *TP53* em menores de idade deveria ser unicamente considerado em um contexto de aconselhamento genético para famílias em risco. É necessário que haja um conhecimento mais detalhado da prevalência da mutação, de sua penetrância e de efeitos de modificadores genéticos para que uma abordagem mais ampla, de teste populacional possa ser considerada.

3. JUSTIFICATIVA

Considerando que:

a) a Síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome com alta penetrância, na qual os portadores de mutação têm um risco de cerca de 50% de desenvolver algum tipo de câncer até os 40 anos de idade (comparado a 1% na população em geral) e um risco de até 90% até os 60 anos de idade;

b) no Sul e Sudeste do Brasil uma das mutações causadoras da síndrome, *TP53* p.R337H, é mais freqüente do que outras mutações germinativas no gene *TP53* no mundo (1 em 300 indivíduos comparado a 1 em 2000-5000 indivíduos, respectivamente);

c) os portadores da síndrome apresentam risco aumentado para a ocorrência de tumores na infância, múltiplos tumores primários ao longo da vida, são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores secundários;

d) familiares de um indivíduo afetado pela mutação *TP53* p.R337H podem ter um risco igualmente aumentado para o câncer (tratando-se de uma doença genética com padrão de herança autossômico dominante);

e) a real incidência da Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like não é conhecida no Brasil;

f) o espectro de tumores que caracterizam a síndrome não está definido na população brasileira,

g) a mutação *TP53* p.R337H parece estar associada a um efeito fundador;

o presente estudo se justifica a partir da existência dessas diversas perguntas acerca da epidemiologia, penetrância e fenótipos associados à mutação *TP53* p.R337H. O estudo da prevalência da mutação em alguns dos principais tumores do espectro da síndrome e a caracterização detalhada dos tumores e história familiar associadas são passos fundamentais. Estas informações trarão uma importante contribuição para definir a relevância desta mutação no país e sua contribuição para os tumores estudados.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo principal

Avaliar a prevalência da mutação germinativa *TP53* p.R337H em indivíduos com tumores do espectro da Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like, divididos nos seguintes grupos:

Grupo 1 – mulheres com câncer de mama subdivididas em 2 subgrupos: (a) com critérios para síndromes de predisposição hereditária, exceto para Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like com diagnóstico da doença em diferentes idades; (b) não selecionadas para história familiar com diagnóstico da doença com idades ≤ 45 anos e ≥ 55 anos;

Grupo 2 – mulheres com tumores *phylloides* da mama, diagnosticadas em diferentes idades e não selecionadas para história familiar da doença;

Grupo 3 - crianças com tumores do espectro da Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like e não selecionadas para história familiar da doença.

4.2. Objetivos específicos

Verificar a presença do haplótipo fundador brasileiro nos portadores da mutação *TP53* p.R337H nos indivíduos incluídos nos grupos 1, 2 e 3;

Verificar a prevalência de história familiar para Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like no grupo 3, em comparação com um grupo controle de crianças sem câncer;

Verificar a existência de outras mutações no gene *TP53* nos indivíduos com critérios clínicos para a Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like identificados no grupo 3.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHATZ, M. I.; HAINAUT, P.; ASHTON-PROLLA, P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol**, v. 10, n. 9, p. 920-5, Sep 2009. ISSN 1474-5488. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19717094> >.

ACHATZ, M. I. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett**, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, Jan 2007. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16494995> >.

ALPERT, T. E.; HAFFTY, B. G. Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. **Clin Breast Cancer**, v. 5, n. 1, p. 37-42, Apr 2004. ISSN 1526-8209. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15140283> >.

ASHCROFT, M.; VOUSDEN, K. H. Regulation of p53 stability. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7637-43, Dec 1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618703> >.

ASSUMPÇÃO, J. G. et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer**, v. 8, p. 357, 2008. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19046423> >.

BAKER, S. J. et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. **Science**, v. 244, n. 4901, p. 217-21, Apr 1989. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2649981> >.

BAKER, S. J. et al. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. **Science**, v. 249, n. 4971, p. 912-5, Aug 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2144057> >.

BARRETO, M. L. et al. Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. **Lancet**, v. 377, n. 9780, p. 1877-89, May 2011. ISSN 1474-547X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21561657> >.

BAZELL, R. **Her-2: the Making of Herceptin, a Revolutionary Treatment for Breast Cancer.** Nova York: Random House. 1998.

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, Aug 2001. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11498785> >.

BIRCH, J. M. et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res**, v. 54, n. 5, p. 1298-304, Mar 1994. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118819> >.

BOUGEARD, G. et al. 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**, v. 38, n. 4, p. 253-7, Apr 2001. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11370630> >.

BOUGEARD, G et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **J Med Genet**, v. 45, n. 8, p. 535-8, Aug 2008. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18511570> >.

BOVERI, M. **The Origin of Malignant Tumours.** Boveri M, trans. London: Baillière, Tindall Cox. 1929.

BØRRESEN, A. L. et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. **Cancer Res**, v. 52, n. 11, p. 3234-6, Jun 1992. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1591732> >.

CAMPBELL, G. **The History of Herodotus: Translated into English.** London: MacMillan and Co., Vol. II. 1889.

CARON DE FROMENTEL, C.; SOUSSI, T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 4, n. 1, p. 1-15, Jan 1992. ISSN 1045-2257. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1377002> >.

CONSORTIUM, I. H. A haplotype map of the human genome. **Nature**, v. 437, n. 7063, p. 1299-320, Oct 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16255080> >.

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, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21445348> >.

DE LA CHAPELLE, A. The incidence of Lynch syndrome. **Fam Cancer**, v. 4, n. 3, p. 233-7, 2005. ISSN 1389-9600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16136383> >.

DELEO, A. E. J., G. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.76, n°5, p.2420-4. 1979.

DIGIAMMARINO, E. L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, v. 9, n. 1, p. 12-6, Jan 2002. ISSN 1072-8368. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11753428> >.

DOLL, R.; HILL, A. B. Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. **Br Med J**, v. 2, n. 4682, p. 739-48, Sep 1950. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14772469> >.

DOYLE, A. **Um estudo em vermelho**. Whitefish: Kessinger, p.107. 2004.

DOZ, F. [Retinoblastoma: a review]. **Arch Pediatr**, v. 13, n. 10, p. 1329-37, Oct 2006. ISSN 0929-693X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16930963> >.

DRUKER, B. J. et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. **Nat Med**, v. 2, n. 5, p. 561-6, May 1996. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8616716> >.

EASTON, D. F. et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. **Nature**, v. 447, n. 7148, p. 1087-93, Jun 2007. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17529967> >.

EELES, R. A. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv**, v. 25, p. 101-24, 1995. ISSN 0261-2429. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8718514> >.

EVANS, D. G. et al. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet**, v. 39,

n. 12, p. 941-4, Dec 2002. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12471212> >.

FARBER, S.; DIAMOND, L. K. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid. **N Engl J Med**, v. 238, n. 23, p. 787-93, Jun 1948. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18860765> >.

FARMER, H. et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 917-21, Apr 2005. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15829967> >.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int J Cancer**, v. 127, n. 12, p. 2893-917, Dec 2010. ISSN 1097-0215. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21351269> >.

FIGUEIREDO, B. C. et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, v. 43, n. 1, p. 91-6, Jan 2006. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16033918> >.

FREBOURG, T. et al. [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. **Bull Cancer**, v. 88, n. 6, p. 581-7, Jun 2001. ISSN 0007-4551. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459705> >.

FRIEND, S. H. et al. A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. **Nature**, v. 323, n. 6089, p. 643-6, 1986 Oct 16-22 1986. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2877398> >.

GARBER, J. E. et al. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res**, v. 51, n. 22, p. 6094-7, Nov 1991. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1933872> >.

GARBER, J. E.; OFFIT, K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 2, p. 276-92, Jan 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15637391> >.

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.

Hum Mutat, v. 31, n. 2, p. 143-50, Feb 2010. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19877175> >.

GINSBURG, O. M. et al. The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30. **Fam Cancer**, v. 8, n. 4, p. 563-7, 2009. ISSN 1573-7292. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19714488> >.

GOMES, M. C. et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 10, n. 1, p. 3, Mar 2012. ISSN 1897-4287. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22455664> >.

GONZALEZ, K. D. et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1250-6, Mar 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19204208> >.

HAINAUT, P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. **Nat Med**, v. 8, n. 1, p. 21-3, Jan 2002. ISSN 1078-8956. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11786899> >.

HALSTED, W. **Willian Steward Halsted, an appreciation**. Matas, Bulletin of the Johns Hopkins Hospital, n.2. 1925.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, Jan 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10647931> >.

HARPER, M. J.; WALPOLE, A. L. Contrasting endocrine activities of cis and trans isomers in a series of substituted triphenylethylenes. **Nature**, v. 212, n. 5057, p. 87, Oct 1966. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5965580> >.

HARRIS, C. C. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, v. 262, n. 5142, p. 1980-1, Dec 1993. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8266092> >.

HARTLEY, A. L. et al. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 67, n. 2, p. 133-5, Jun 1993. ISSN 0165-4608. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8392435> >.

HARTMANN, L. C. et al. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. **N Engl J Med**, v. 340, n. 2, p. 77-84, Jan 1999. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9887158> >.

HERRMANN, L. J. et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 97, n. 3, p. E476-85, Mar 2012. ISSN 1945-7197. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22170717> >.

HISADA, M. et al. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 90, n. 8, p. 606-11, Apr 1998. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9554443> >.

HOLLSTEIN, M. et al. p53 mutations in human cancers. **Science**, v. 253, n. 5015, p. 49-53, Jul 1991. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1905840> >.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. **Cancer Res**, v. 58, n. 18, p. 4023-37, Sep 1998. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9751603> >.

HWANG, S. J. et al. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. **Am J Hum Genet**, v. 72, n. 4, p. 975-83, Apr 2003. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12610779> >.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2012. Estimativa de Câncer 2012. Acessada em 1 de Junho de 2012. Disponível em: < www.inca.gov.br/estimativa/2012 >.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA), 2012. História da Oncologia Clínica do Instituto Nacional de Câncer. Acessada em 1 de Junho de 2012. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/publicacoes/historia_oncologia.pdf >.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC), 2012. IARC TP53 Database, R15. Acessada em 1 de Junho de 2012. Disponível em: < <http://www-p53.iarc.fr/> >.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2010. Censo 2010. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br/censo2010/> >. Acessado em 30 de Maio de 2012.

JORDAN, V. C. Effects of tamoxifen in relation to breast cancer. **Br Med J**, v. 1, n. 6075, p. 1534-5, Jun 1977. ISSN 0007-1447. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/871651> >.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 68, n. 4, p. 820-3, Apr 1971. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5279523> >.

LALLOO, F. et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. **Lancet**, v. 361, n. 9363, p. 1101-2, Mar 2003. ISSN 0140-6736. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12672316> >.

LALLOO F., et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 8, p. 1143-50, May 2006. ISSN 0959-8049. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16644204> >.

LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, Feb 2001. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11237011> >.

LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. **Nature**, v. 358, n. 6381, p. 15-6, Jul 1992. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1614522> >.

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, Mar 1979. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/218111> >.

LAPTENKO, O.; PRIVES, C. Transcriptional regulation by p53: one protein, many possibilities. **Cell Death Differ**, v. 13, n. 6, p. 951-61, Jun 2006. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16575405> >.

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. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 10, p. 4970-3,

Oct 2001. ISSN 0021-972X. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11600572> >.

LAVIGUEUR, A. et al. High incidence of lung, bone, and lymphoid tumors in transgenic mice overexpressing mutant alleles of the p53 oncogene. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 3982-91, Sep 1989. ISSN 0270-7306. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2476668> >.

LEVINE, A. J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**, v. 88, n. 3, p. 323-31, Feb 1997. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9039259> >.

LI, F. P.; FRAUMENI, J. F. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 43, n. 6, p. 1365-73, Dec 1969a. ISSN 0027-8874. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5396222> >.

LI, F.P.; FRAUMENI, J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med**, v. 71, n. 4, p. 747-52, Oct 1969b. ISSN 0003-4819. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5360287> >.

LI, F.P.; FRAUMENI, J. F. Prospective study of a family cancer syndrome. **JAMA**, v. 247, n. 19, p. 2692-4, May 1982. ISSN 0098-7484. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7077763> >.

LI, F. P. et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res**, v. 48, n. 18, p. 5358-62, Sep 1988. ISSN 0008-5472. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3409256> >.

LINDOR, N. E. A. Greene MH. **Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes Second Edition**. Journal of the National Cancer Institute Monographs, No. 38. 2008.

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, May 1979. ISSN 0092-8674. Disponível em: <
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/222475> >.

LOZANO, G.; LEVINE, A. J. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. **Mol Carcinog**, v. 4, n. 1, p. 3-9, 1991. ISSN 0899-1987. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1848986> >.

LYNCH, H. T.; GUIRGIS, H. A. Childhood cancer and the SBLA syndrome. **Med Hypotheses**, v. 5, n. 1, p. 15-22, Jan 1979. ISSN 0306-9877. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/459966> >.

LYNCH, H. T.; KRUSH, A. J. Carcinoma of the breast and ovary in three families. **Surg Gynecol Obstet**, v. 133, n. 4, p. 644-8, Oct 1971. ISSN 0039-6087. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4328854> >.

MALKIN, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-8, Nov 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1978757> >.

MARCEL, V. 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**, v. 46, n. 11, p. 766-72, Nov 2009. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19542078> >.

MARCEL, V. et al. G-quadruplex structures in TP53 intron 3: role in alternative splicing and in production of p53 mRNA isoforms. **Carcinogenesis**, v. 32, n. 3, p. 271-8, Mar 2011. ISSN 1460-2180. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21112961> >.

MARSHALL, C. J. Tumor suppressor genes. **Cell**, v. 64, n. 2, p. 313-26, Jan 1991. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1988150> >.

MASCIARI, S. et al. Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort. **Breast Cancer Res Treat**, Mar 2012. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22392042> >.

MAY, P.; MAY, E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**, v. 18, n. 53, p. 7621-36, Dec 1999. ISSN 0950-9232. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10618702> >.

MEIJERS-HEIJBOER, H. et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet**, v. 72,

n. 5, p. 1308-14, May 2003. ISSN 0002-9297. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12690581> >.

MELHEM-BERTRANDT, A. et al. Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations. **Cancer**, v. 118, n. 4, p. 908-13, Feb 2012. ISSN 1097-0142. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21761402> >.

MOLL, U. M.; SCHRAMM, L. M. p53--an acrobat in tumorigenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**, v. 9, n. 1, p. 23-37, 1998. ISSN 1045-4411. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9488246> >.

MOUCHAWAR, J. et al. Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. **Cancer Res**, v. 70, n. 12, p. 4795-800, Jun 2010. ISSN 1538-7445. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20501846> >.

MUKHERJEE, S. **O Imperador de Todos os Males: uma biografia do cancer**. São Paulo: Companhia das Letras, 1º Edição. 2012.

MURRAY-ZMIJEWSKI, F.; SLEE, E. A.; LU, X. A complex barcode underlies the heterogeneous response of p53 to stress. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 9, n. 9, p. 702-12, Sep 2008. ISSN 1471-0080. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719709> >.

NAROD, S. A.; OFFIT, K. Prevention and management of hereditary breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 8, p. 1656-63, Mar 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755973> >.

NEBBENNIERENKARZINOM-REGISTER, 2012. Registro Alemão de Carcinomas Adrenocorticais. Acessado em 21 de Junho de 2012. Disponível em < <http://www.nebennierenkarzinom.de> >.

NELEN, M. R. et al. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. **Eur J Hum Genet**, v. 7, n. 3, p. 267-73, Apr 1999. ISSN 1018-4813. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10234502> >.

NG, S. B. et al. Exome sequencing identifies the cause of a mendelian disorder. **Nat Genet**, v. 42, n. 1, p. 30-5, Jan 2010. ISSN 1546-1718. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19915526> >.

NICHOLS, K. E. et al. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 10, n. 2, p. 83-7, Feb 2001. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11219776> >.

NIGRO, J. M. et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature**, v. 342, n. 6250, p. 705-8, Dec 1989. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2531845> >.

OLIVIER, M. et al. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat**, v. 19, n. 6, p. 607-14, Jun 2002. ISSN 1098-1004. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007217> >.

ONLINE MENDELIAN INHERITANCE IN MAN (OMIM), 2012. Acessado em 02 de Junho de 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> >.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS), 2012. CANCER Mundial. Acessado em 20 de Maio de 2012. Disponível em: < <http://www-dep.iarc.fr/> >.

OREN, M. Decision making by p53: life, death and cancer. **Cell Death Differ**, v. 10, n. 4, p. 431-42, Apr 2003. ISSN 1350-9047. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12719720> >.

OREN, M. et al. Regulation of p53: intricate loops and delicate balances. **Ann N Y Acad Sci**, v. 973, p. 374-83, Nov 2002. ISSN 0077-8923. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12485897> >.

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 Lett**, v. 261, n. 1, p. 21-5, Mar 2008. ISSN 0304-3835. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18248785> >.

PENNISI, E. Genomics. 1000 Genomes Project gives new map of genetic diversity. **Science**, v. 330, n. 6004, p. 574-5, Oct 2010. ISSN 1095-9203. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21030618> >.

PINTO, E. M. et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 5, p. 647-50, Oct 2004. ISSN 0004-2730. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761534> >.

PIOVEZAN, G. **Prevalência do alelo TP53 R337H no Estado do Paraná.** [dissertação] Curitiba (Paraná): Universidade Federal do Paraná (UFPR); 2006.

PREMIO NOBEL. The Nobel Prize in Physics 1903 - Henri Becquerel, Pierre Curie, Marie Curie 1903. Acessado em 20 de Maio de 2012. Disponível em: < http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/1903/index.html >.

REBBECK, T. R. et al. Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **N Engl J Med**, v. 346, n. 21, p. 1616-22, May 2002. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12023993> >.

RIBEIRO, R. C. 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**, v. 98, n. 16, p. 9330-5, Jul 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11481490> >.

ROUS, P. A Transmissible avian neoplasm (sarcoma of the common fowl.). **J Exp Med**, v. 12, n. 5, p. 696-705, Sep 1910. ISSN 0022-1007. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19867354> >.

ROWLEY, J. D. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. **Nature**, v. 243, n. 5405, p. 290-3, Jun 1973. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4126434> >.

RUIJS, M. W. 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**, v. 47, n. 6, p. 421-8, Jun 2010. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20522432> >.

SANDRINI, F. et al. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Horm Metab Res**, v. 37, n. 4, p. 231-5, Apr 2005. ISSN 0018-5043. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15952083> >.

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, May 2011. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21192060> >.

SEPKOWITZ, K. **The 1947 Smallpox Vaccination Campaign in New York City, Revisited**". *Emerging Infectious Diseases* 10, n.5, 2004.

SHARPLESS, N. E.; DEPINHO, R. A. p53: good cop/bad cop. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 9-12, Jul 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12150992> >.

SIGERIST, H. **The Historical Development of the Pathology and Therapy of Cancer**. *Bulletin of the New York Academy of Medicine*, 8, n.11, 1932.

SMITH, E. The Edwin Smith Papyrus: Some Preliminary Observations. Acessado em 30 de Maio de 2012. Disponível em: < <http://www.touregypt.net/edwinsmithsurgical.htm> >.

SRIVASTAVA, S. et al. Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. **Cancer Res**, v. 53, n. 19, p. 4452-5, Oct 1993. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8402611> >.

STRONG, L. C.; STINE, M.; NORSTED, T. L. Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives. **J Natl Cancer Inst**, v. 79, n. 6, p. 1213-20, Dec 1987. ISSN 0027-8874. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3480372> >.

TABORI, U. et al. Universal poor survival in children with medulloblastoma harboring somatic TP53 mutations. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 8, p. 1345-50, Mar 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20142599> >.

TAVASSOLI, F. E. D., P. **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs**. *IARC Press*: Lyon. 2003.

THE WORLD BANK, 2011. Acessado em: 13 de setembro de 2011. Disponível em: < <http://data.worldbank.org/indicator~~HEAD=NNS> >.

TINAT, J. et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 26, p. e108-9; author reply e110, Sep 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19652052> >.

TRKOVA, M. et al. Is there anticipation in the age at onset of cancer in families with Li-Fraumeni syndrome? **J Hum Genet**, v. 47, n. 8, p. 381-6, 2002. ISSN 1434-5161. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12181637> >.

TUCKER, T.; FRIEDMAN, J. M. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. **Clin Genet**, v. 62, n. 5, p. 345-57, Nov 2002. ISSN 0009-9163. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12431247> >.

VARLEY, J. M.; EVANS, D. G.; BIRCH, J. M. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. **Br J Cancer**, v. 76, n. 1, p. 1-14, 1997. ISSN 0007-0920. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9218725> >.

VARLEY, J. M. et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res**, v. 57, n. 15, p. 3245-52, Aug 1997. ISSN 0008-5472. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9242456> >.

VARMUS, H. E. et al. Detection of avian tumor virus-specific nucleotide sequences in avian cell DNAs (reassociation kinetics-RNA tumor viruses-gas antigen-Rous sarcoma virus, chick cells). **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 69, n. 1, p. 20-4, Jan 1972. ISSN 0027-8424. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4333039> >.

VOUSDEN, K. H. p53: death star. **Cell**, v. 103, n. 5, p. 691-4, Nov 2000. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11114324> >.

VOUSDEN, K. H.; LANE, D. P. p53 in health and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v. 8, n. 4, p. 275-83, Apr 2007. ISSN 1471-0072. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17380161> >.

WALDRON, H. A brief history of scrotal cancer. **Br J Ind Med**. 40(4):390-401. 1983.

WEITZEL, J. N. et al. Genetics, genomics, and cancer risk assessment: State of the Art and Future Directions in the Era of Personalized Medicine. **CA Cancer J Clin**, Aug 2011. ISSN 1542-4863. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21858794> >.

WHELAN, A. J.; BARTSCH, D.; GOODFELLOW, P. J. Brief report: a familial syndrome of pancreatic cancer and melanoma with a mutation in the CDKN2 tumor-suppressor gene. **N Engl J Med**, v. 333, n. 15, p. 975-7, Oct 1995. ISSN 0028-4793. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7666917> >.

WHITTEMORE, A. S. et al. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 13, n. 12, p. 2078-83,

Dec 2004. ISSN 1055-9965. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15598764> >.

WILSON, J. M.; JUNGNER, Y. G. [Principles and practice of mass screening for disease]. **Bol Oficina Sanit Panam**, v. 65, n. 4, p. 281-393, Oct 1968. ISSN 0030-0632. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4234760> >.

WILSON, J. R. et al. A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations. **J Med Genet**, v. 47, n. 11, p. 771-4, Nov 2010. ISSN 1468-6244. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20805372> >.

6. MANUSCRITOS

(Formato de acordo com normas dos periódicos a que serão submetidos).

6.1. *TP53* p.R337H mutation and breast cancer in Brazil

Giacomazzi J^{1,2}, Graudenz MS³, Osorio CATB⁴, Koehler-Santos P⁵, Palmero EI⁶, Zagonel-Oliveira M⁷, Micheli RD⁶, Scapulatempo Neto C⁶, Fernandes G⁶, Achatz MI⁸, Martel-Planche G⁹, Soares FA⁴, Caleffi M¹⁰, Goldim JR¹¹, Hainaut P¹², Camey SA¹³, Ashton-Prolla P^{1,2,7,14*}

1. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; 2. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 3. Pathology Service, HCPA, Brazil and Instituto de Patologia, Porto Alegre Brazil; 4. Pathology Service, Hospital do Câncer AC Camargo (HCACC), São Paulo, Brazil; 5. Protein and Molecular Analysis Laboratory, Experimental Research Center, HCPA, Brazil; 6. Molecular Oncology Research Center, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, Brazil; 7. National Institute of Populational Medical Genetics (INAGEMP), UFRGS, Brazil; 8. Oncogenetics Department, HCACC, Brazil; 9. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France; 10. Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil, 11. Bioethics Research Laboratory, HCPA, Brazil; 12. International Prevention Research Institute, Lyon, France; 13. Department of Statistics, Institute of Mathematics, UFRGS, Brazil; 14. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, UFRGS, Brazil;

ABSTRACT

Background: Germline *TP53* mutations predispose to multiple early-onset cancers, including breast cancer (BC) and are associated with Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like Syndromes (LFS/LFL). Recent data show that a particular mutant, *TP53* p.R337H, may be present in a significant number of subjects in Southern and Southeastern Brazil. The aim of this study was to assess the frequency of *TP53* p.R337H in two groups of BC-affected women: (1) women with a familial history of BC suggestive of a hereditary cancer syndrome, but with no features of LFS/LFL; (2) women unselected for a family history (FH) of cancer, diagnosed with BC ≤ 45 and ≥ 55 years of age. **Methods:** Group 1 consisted of a prospective series of 59 women identified in a public hospital in Southern Brazil (Porto Alegre, Rio Grande do Sul); group 2 consisted of a retrospective, unidentified and consecutive series of 815 BC-affected

women retrieved from 3 pathology laboratories in the Southern, Southeastern and Northern regions of Brazil. **Results:** Among the 59 patients from group 1, two (3.4%) were carriers of the *TP53* p.R337H mutation in the germline (probands were diagnosed with BC at 31 and 57 years). Among the 815 patients included in Group 2, the mutation was present in the germline of 70 (8.6%) women, and 2 of these (2.85%) were p.R337H homozygotes. Mutation frequency varied significantly among the 3 recruiting centers and, as expected, was higher in the group of women diagnosed with BC \leq 45 years (12.1%) when compared with the group of women diagnosed \geq 55 years (5.1%, $p < 0.001$). The Brazilian founder haplotype was present in all p.R337H mutation-carriers analyzed ($n=22$), including carriers residing outside Southern and Southeastern Brazil. Analysis of the breast tumors of p.R337H mutation carriers revealed that loss of heterozygosity (LOH) was not a frequent event and that *TP53* p.R337H mutation carriers more likely showed some HER2 expression. **Conclusions:** In Southern and Southeastern Brazil, a significant proportion of BC-affected women, regardless of a family history of cancer, carries the founder mutation *TP53* p.R337H mutation in the germline. Breast tumors of mutation carriers usually expressed HER2 and were LOH-negative. Identification of the germline *TP53* p.R337H mutation in Brazilian women affected with BC has important implications for individual and familial management of cancer risk. Further characterization of the mechanisms of breast tumorigenesis in these patients is essential to identify targeted therapies.

Keywords: *TP53* p.R337H mutation, breast cancer, Li-Fraumeni Syndrome, HER2 expression

***Corresponding author:** Patricia Ashton-Prolla. Departamento de Genética, UFRGS e Serviço de Genética Médica e Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3359-8010. e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br

INTRODUCTION

Germline *TP53* mutations are the underlying genetic defect in Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant, Li-Fraumeni-Like Syndrome (LFL), autosomal

dominant disorders characterized by predisposition to multiple early-onset cancers [1-3]. The core tumors of the syndrome are adrenocortical carcinoma, soft tissue and bone sarcomas, brain tumors and breast cancer (BC), which is the single most common cancer diagnosis in adult women [4].

In Europe and North America, germline *TP53* mutations are estimated to occur in 1:2000-1:5000 individuals of the general population. Among BC-affected women, mutations have been described in no more than 0.25% of those diagnosed at any age and unselected for cancer family history [5-7], and in up to 7% of those with very early onset (<30 years) BC [1, 8-12]. Three studies including relatively small numbers of BC-affected women from mutation-positive LFS/LFL families have suggested that tumors in these patients are more frequently HER2-positive [13-15]. In a recent study involving a multi-ethnic Asian cohort of 100 patients with BC diagnosed at or before 35 years, germline *BRCA1*, *BRCA2* and *TP53* mutations were identified in 11, 6 and, 5% of the patients, respectively, suggesting that *TP53* mutation screening should be offered together with *BRCA1/2* testing in women with the early onset BC phenotype [11].

In Brazil, a specific mutation in codon 337 (c.1010G>A; g.16901G>A; p.R337H) within the oligomerization domain of the *TP53* gene has been reported at a high frequency in Southern and Southeastern regions, both in the general population and in cancer risk assessment clinics [16-20]. Initially, the alteration was considered a tumor-specific mutant associated only with childhood adrenocortical carcinoma, both in familial and isolated cases [16, 18]. Further studies indicated that it occurs in about one third of Brazilian LFS/LFL families affected with a wide range of cancers [21] and at an estimated frequency of 0.3% of the general population of Southern Brazil [20, 22]. Recent reports from Brazilian cohorts of cancer affected patients indicate that the mutation is strongly associated with choroid plexus carcinoma, osteosarcoma and BC [17-19, 23-25].

As with other *TP53* DNA-binding domain mutations, BC is the most common cancer in women from p.R337H mutation-positive families, representing about 25% of all diagnoses [19, 20]. However, observations in these families indicate that lifetime risk of BC is lower than in carriers of classic *TP53* DNA-binding domain mutations [26]. In two recent case-control studies including BC women recruited from Southeastern Brazil, p.R337H was detected in heterozygosity in 2.4% and 0.5% of the cases [23, 27]. In the first study, undertaken in a University Hospital in the

State of São Paulo, 3 carriers were identified among 123 BC-affected women, while none of the 223 age- and sex-matched control subjects were positive for the mutation. All three carriers had been diagnosed with BC before age 45 and two had familial histories matching LFL criteria. Interestingly, breast tumors of the three p.R337H carriers retained the wild-type allele, suggesting that the mechanism of breast tumorigenesis in p.R337H carriers is not associated with LOH, contrary to what has been described in p.R337H-associated adrenocortical tumors [16, 23]. In the second study, which examined mutation frequency in 390 unselected BC cases and 324 controls diagnosed between the ages of 20 and 60 years in clinics from the State of Rio de Janeiro, two p.R337H carriers were identified. Both were diagnosed with BC before age 40 years and had a family history of LFL (the first fulfilling Eeles 1 criteria and Chompret Modified criteria and the second exclusively Eeles 1 criteria). Overall, p.R337H was identified in 0.5% of BC-affected women diagnosed under age 40 years in this series of patients which overlaps with a previously reported series from the same group of investigators which had been tested for germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations with a mutation detection rate of 2.3% [28].

The aim of this study was to assess the frequency of the germline p.R337H in BC-affected women of different ages, with and without a strong family history of the disease and from different Brazilian regions, providing a detailed characterization of the mutation and the breast tumors in carriers.

METHODS

Recruitment. Two subgroups of BC-affected women were included in this study. The first group consisted of a prospective series of 59 BC-affected women identified in a public hospital in Porto Alegre (Rio Grande do Sul) who had a familial history of BC suggestive of hereditary breast and ovarian cancer syndrome (HBOC) and/or hereditary breast and colon cancer syndrome (HBCC), with no features of Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-Like syndromes at recruitment, according to international established criteria [29, 30].

The second group consisted of a retrospective, unidentified and consecutive series of 815 BC-affected women (diagnosed between 1997 and 2010) retrieved from 3 pathology laboratories in Porto Alegre (State of Rio Grande do Sul, recruitment center = RC 1), São Paulo (State of São Paulo, RC 2) and Barretos (State of São Paulo, RC 3) with catchment areas including the Southern,

Southeastern and Northern regions of Brazil. The laboratory in the State of Rio Grande do Sul was a community-based commercial laboratory. The other two laboratories in the State of São Paulo were based in cancer hospitals, the first in an Institution with the largest cancer genetics clinic in the country. The only selection criterion used for inclusion in the study was age at BC diagnosis, with two pre-determined groups: BC diagnosed at or before 45 years (the age limit currently considered in most LFS/LFL criteria) and at or after 55 years of age (when most women are already post-menopausal). The sample in this group was unselected for cancer family history. Before inclusion, hematoxylin-eosin (H&E) slides of all potential cases were reanalyzed by a pathologist to confirm BC diagnosis. Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) non-tumoral tissue (lymph nodes or normal breast tissue), fresh frozen tumoral tissue whenever available and histopathological reports containing information on tumor type, grade and immunohistochemistry were obtained, relabeled and had its original identifiers removed before genotyping analyses. H&E slides from all FFPE tissues were then reviewed independently by two pathologists to confirm tumor status and normal breast or lymph node tissue areas, which were marked for posterior DNA extraction. Tissues submitted to DNA extraction were obtained by 1.0 mm punch excision directly from previously marked non-tumoral FFPE tissues in all cases and also from tumoral FFPE tissues in p.R337H positive cases, whenever possible.

Immunohistochemical analyses. RC 1. Immunostaining was performed by manual technique. HercepTest (Dako, Denmark) was used for determination of HER2 expression. For epitope retrieval citrate buffer was used at 96°C, during 40 minutes for HER2 (rabbit polyclonal, Dako) in waterbath, and microwave oven for ER (clone 6F11, Novocastra) and PR (clone 16, Novocastra). Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ at room temperature. Tissue slides were rinsed between steps with wash buffer. Slides were incubated overnight with primary antibody for ER (1/100) and PR (1/200), and for 30 minutes for HER2 (1/1500) followed by application of LSAB + Kit (Dako, Denmark) for ER/PR detection for 30 minutes. Diaminobenzidine was used as a chromogen and haematoxylin as a nuclear stain.

RC 2. Immunostaining was performed by manual technical. For epitope retrieval citrate buffer pH 6,0 was used at 96°C, during 40 minutes for HER2 (polyclonal, Dako) in water bath, and electric pressure cooker for ER (clone SP1, Dako) and PR

(clone PgPR636, Dako) during 10 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with 3% H₂O₂ three times for 5 minutes at room temperature. Tissue slides were rinsed between steps with wash buffer. Slides were incubated with primary antibody during 2 hours for ER (1/500), RP (1/1000) and HER2 (1/1500) followed by application of Advance HRP Kit (30 minutes). Diaminobenzidine was used as a chromogen and haematoxylin as a nuclear stain. **RC 3.** Fully automated immunostaining was performed by Ventana BenchMark XT Automated IHC Stainer (Ventana Medical System, Arizona, USA), using the Ultraview Universal DAB detection kit (Ventana). For epitope retrieval CC1: Tris -EDTA buffer pH 8.0 (Ventana) was used at 95°C to 100°C for 30 minutes. Endogenous peroxidase was blocked with UV-Inhibitor 3% H₂O₂ (Ventana) for 4 minutes at 37°C. Tissue slides were rinsed between steps with Ventana Tris-based reaction buffer (Ventana). Slides were incubated at 37°C with primary antibody (ready-to-use during 32 minutes for ER and PR antibodies and 12 minutes for HER2) followed by application of Ventana Ultraview HRP Universal Multimer. Diaminobenzidine was used as a chromogen and haematoxylin as a nuclear stain. **Immunohistochemical scoring.** Analyses of HER2 were based on the membrane staining pattern. The results were classified according to the Herceptest criteria (Dako): no staining, or weak staining in fewer than 10% of the tumor cells (0); weak staining in part of the membrane in more than 10% of the tumor cells (1+); complete staining of the membrane with weak or moderate intensity in more than 10% of the neoplastic cells (2+); and strong staining in more than 10% (3+). After publication of the ASCO/CAP-2007 HER2 guidelines in 2007, strong membranous positivity in more than 30% of tumour cells was considered positive for HER2 [31]. An equivocal result (2+) is complete membrane staining that is either non uniform or weak in intensity but with obvious circumferential distribution in at least 10% of cells. In the RC 1, 2 and 3, positivity for ER and PR was scored according to the Allred scoring system, which is a semi quantitative system that takes into consideration the proportion of positive cells (scored on a scale of 0-5) and staining intensity (scored on a scale of 0-3). The proportion and intensity were then summed to produce total scores of 0 or 2 through 8. A score of 0 -2 was regarded as negative while 3 - 8 as positive [32].

Genotyping. Genomic DNA from group 1 was obtained from peripheral blood samples using a commercial DNA extraction kit (Illustra Blood genomicPrep Mini

Spin Kit, GE Healthcare, UK); genomic DNA from group 2 was obtained from non-tumoral and tumoral tissues using the DNA FFPE Kit (Qiagen, Germany). All samples were quantified using NanoDrop technology (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). *TP53* p.R337H was performed in all cases by allelic discrimination using a qPCR-TaqMan (Applied Biosystems, USA). All mutation-positive cases and an aleatory sample of 20% of the mutation-negative cases were submitted to *TP53* exon 10 direct sequencing (for detailed sequencing protocols and primers refer to reference [33]) or to a second independent qPCR analysis. A third genotyping methodology, PCR-RFLP, was employed for confirmation of homozygous mutant results as previously described [20]. Genotyping of tumor DNA by sequencing using the same protocols as described above was performed to assess loss of heterozygosity (LOH) for p.R337H. The presence of the Brazilian founder p.R337H haplotype (A3) was verified in mutation-positive samples as previously described [26] by ASO-PCR and Nested-PCR analyzing SNP28 (rs9894946) of a panel of 29 intragenic SNPs. Since this SNP is identical in haplotypes A1 and A3, all cases were further genotyped for SNP15 (rs1642785) and SNP18 (rs1800370) by direct sequencing.

Geo-mapping. All women included in group 1 were from the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Women included in group 2, were from different Brazilian regions and were geo-coded using informed residence zip codes, which were associated with a base map provided by the Brazilian Institute of Geography and Statistics (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística; IBGE) [34] containing the state and municipal boundaries after standardization of cartographic databases. Corresponding statistical certainty geo-maps were produced using the software ArcGIS 10.0 ESRI®.

Ethical aspects. The study was approved by the Institutional Research and Ethics Committees (protocol # 08-023) of the coordinating center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and of the collaborating institutions (Hospital de Câncer de Barretos and Hospital do Câncer A. C. Camargo).

Statistical Analyses. SPSS version 16.0 was used for data handling and statistical analyses. For descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies and quantitative variables were expressed as

mean and standard deviation (SD) or median and minimum-maximum (Min-Max). For analytical statistics, t test for independent groups was used to compare mean values. The associations were described by the absolute and/or relative frequencies and they were tested by Fisher's exact test. In all analyses a significance level of 0.05 was adopted.

RESULTS

The mean age at BC diagnosis among patients included in group 1 was 43 years (SD=11.9). At recruitment, all fulfilled at least one criterion for hereditary BC: 5 had criteria for HBOC and HBCC syndromes. Fifty-four fulfilled HBOC criteria exclusively and among these, 2 p.R337H carriers were identified. Ages at BC diagnosis in these carriers were 31 and 57 years and pedigrees are depicted in Figure 1. Interestingly, follow-up of the families after genotyping revealed that in the second family, a recent diagnosis of adrenocortical carcinoma had been made, resulting in modification of the familial cancer phenotype (which now fulfills also LFL criteria).

In group 2, 403 and 412 patients with BC ≤ 45 and ≥ 55 years were included, respectively. Mean ages at diagnosis in these groups were 38 (± 5) and 66 (± 9) years, respectively. The majority of patients had invasive carcinomas (n=738; 90.5%), followed by *in situ* carcinomas (n=55; 6.7%). Genotyping identified the *TP53* p.R337H mutation in 70 (8.6%) women. Mutation frequency was significantly higher among women with early-onset BC: 49 of 403 (12.1%) diagnosed ≤ 45 years and 21 of 412 (5.1%) diagnosed ≥ 55 years ($p < 0.001$). In women with very early onset BC (diagnosis ≤ 30 years) carrier rate was 20% (8/40, 5 from RC 1 and 3 from RC 2). Of the mutation-positive cases, 68 (97.1%) were heterozygotes (c.1010 AG) and 2 (2.85%), mutant homozygotes (c.1010 AA) (Table 1). Confirmatory genotyping analyses were done on all 70 p.R337H carrier samples and on a random sample of 150 mutation-negative cases by a second independent qPCR analysis. In addition, *TP53* exon 10 direct sequencing was performed on 35 p.R337H carriers and 30 non-carriers. Results from the primary analysis were confirmed in all. The two p.R337H AA homozygous genotypes were confirmed by RFLP-PCR (Figure 2) and the Brazilian founder haplotype A3 proposed by Garritano et al. [26] was present in all p.R337H carriers analyzed (n=22).

Plots of the geographical distribution of BC-affected women, according to the mutation status and RC, were created with the information on city of residence whenever available (657 of 815 women; 80.5%) and are depicted in Figure 3 and in Supplementary Figure S1, respectively. The plot in figure 1 shows that mutation carriers were identified in all Brazilian regions. When region of residence was considered, the mutation was identified in 14/220 (6,4%), 34/321 (10,6%), 1/61 (1.6%), 1/8 (12,5%) and 3/44 (6,8%) women residing in the Southern, Southeastern, Midwestern, Northern and Northeastern Brazilian regions. Haplotyping analysis was performed in three of the five patients residing in the Northern and Northeastern regions and confirmed that the mutation occurred on the Brazilian founder allele. When recruiting center was used to construct the geographical distribution plot, mutation frequency was significantly different among the 3 recruiting centers, with higher frequencies observed in women diagnosed in RC 2 (city of São Paulo) (Table 1).

Breast tumors were available for p.R337H genotyping in 15 carriers. Loss of the wild-type “G” allele was observed in only 2 of these cases. An analysis of ER, PR and HER2 status according to recruiting center showed that IHC profiles were distinct among the centers (Table 2). Furthermore, among the 678 cases for which pathology reports with complete IHC analyses were available (including 57 p.R337H carriers), ER and PR status was not significantly different between p.R337H carriers and non-carriers ($p > 0.99$ and $p = 0.55$, respectively). Similarly, distribution of triple negative tumors was similar between these two groups ($p = 0.37$; data not shown). However, when HER2 status was analysed separately, breast tumors of p.R337H mutation carriers more frequently showed some HER2 expression (either HER2 +1, +2 or +3) (Table 3). The same pattern was observed in the overall sample and after stratification of groups according to age at BC diagnosis (≤ 45 and ≥ 55 years).

DISCUSSION

The *TP53* gene has been recognized for over two decades as a key player in both somatic and inherited cancer. Somatic mutations of the *TP53* gene are consistently associated with a poor prognosis in different tumors [1, 35], and germline mutations result in increased predisposition to a wide spectrum of early-onset cancers. The results observed in this study reinforce previous reports showing that one specific germline *TP53* mutation, p.R337H, is exceedingly frequent in Brazilian

women affected with BC [19, 23, 27]. The mutation is particularly frequent in those diagnosed with pre-menopausal BC and residing in Southern and Southeastern regions of the country. This is likely due to the previously established nature of this particular mutant, associated to a founder effect in Brazil, and classifies it as the most common germline *TP53* mutation ever described in any population. Interestingly, presence of the mutation is not restricted to pre-menopausal BC (the classic, LFS-associated presentation), but is also observed among women with post-menopausal BC. Furthermore, the mutation also occurs in families with multiple BC patients, fulfilling criteria for hereditary BC syndromes other than LFS or LFL, such as HBOC and HBCC.

Other Brazilian BC cohorts have been previously tested for the p.R337H mutation [19, 25]. However, inclusion criteria in these studies differed and there is not much detail on their family histories of cancer or on the geographic localization of the patients. Results presented here show that significant geographic variation in mutation frequency may exist, and different hypotheses for this observation must be considered. First, there may be a geographical variation in frequency due to differential dissemination or fixation of the founder haplotype in certain regions of the country. This must be confirmed with studies of larger samples including patients from all Brazilian regions. Second, one cannot exclude an ascertainment bias in our study. The recruiting center with the highest mutation frequency (RC2) is also the one with the largest cancer genetics clinic in the country, and is considered a reference center for treatment of high risk cancer patients, including Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like Syndrome. On the other hand, the identification of carriers outside the Southern and Southeastern regions, within geographical distances of thousands of miles, raises new questions about the age and dissemination pattern of the mutation and suggests that p.R337H-associated BC risk may not be a regional issue. To further clarify this, studies on the age of the mutation and potential mechanisms of dissemination should be performed.

Another important question raised by our results refers to the mechanisms of breast carcinogenesis related to the p.R337H mutation, since tumor genotyping revealed that LOH is not common in these cases. Absence of LOH had been previously reported in breast tumors of a few mutation carriers [23]. In contrast, in virtually all adrenocortical and choroid plexus carcinomas of pediatric p.R337H carriers, LOH is described with loss of the wild-type allele, consistent with the classic

two-hit model proposed for carcinogenesis associated with tumor suppressor genes [16, 17]. These results suggest that the mechanism of p.R337H-associated carcinogenesis differs between tumors of the Li-Fraumeni Syndrome spectrum.

BC is the most common adult-onset tumor in Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like Syndrome families affected with classic, DNA-binding domain mutations [4]. In families with the p.R337H mutation, it is also the most common adult tumor, representing about 25% of all diagnosed cancers [19, 20]. However, cancers in p.R337H carriers, overall, tend to occur at a later age than in carriers of other mutations, with only 15% of them developing any cancer by the age of 30 years, compared to a risk of nearly 50% by age 35 years in carriers of pathogenic (“classic”) *TP53* mutations within the DNA binding domain [19]. Our study indicates that the p.R337H mutation rate in Brazilian women with very early onset BC (during the first three decades) may be higher than observed in other similar international series that have assessed presence of germline *TP53* DNA-binding domain mutations [9, 36, 37], but that a significant, albeit lower residual risk exists after the third decade that persists beyond menopause. If confirmed, this pattern may have important implications in the establishment of BC risk reduction strategies for carrier women.

Three recent studies have proposed an association between germline *TP53* mutations (in an LFS/LFL setting) and early onset HER2-positive BC. In the first study, Wilson *et al.* (2010) reported that mutation carriers showed a significantly higher likelihood of developing a breast tumor overexpressing HER2 when compared to the cohort of early-onset mutation-negative BC cases [13]. In the second study, Melhem-Bertrandt *et al.* (2011) described HER2 amplification and/or overexpression in tumors of *TP53* mutation carriers more frequently than in a control group of non-carriers. In their series of young women diagnosed with BC, HER2-positive status increased the odds of having a germline *TP53* mutation by nearly 7-fold [14]. In the third study, Masciari *et al.* (2012) showed that 63% of invasive (8 of 11 cases) and 73% of *in situ* carcinomas (20 of 32 cases) in women with germline *TP53* mutations were positive for HER2, and that the most common immunophenotype was ER+/HER2+ [15].

HER2 analysis in our samples is limited by the retrospective design of the study. Results on tumor IHC were not available in all cases and scoring was performed with different methods in each center, without a centralized review of the results. Results from this analysis showed that IHC profiles were distinct in each

center and at this point, we cannot determine if this difference is due to the distinct IHC methodologies used, or due to a differential patient profile in each center. However, when we looked only at presence or absence of HER2 expression, an information that would be less affected by the IHC method used, our results indicate that p.R337H mutation carriers more likely showed some HER2 expression. This finding should be used with caution and results confirmed in an independent, prospective and controlled study.

In conclusion, we have analyzed a large group of BC-affected women from different regions of Brazil, both selected and unselected for a BC family history, and showed that p.R337H is frequent among women from the Southern and Southeastern regions, but not restricted to this group. This is likely explained by a founder effect, but other factors of positive selective pressure cannot be excluded at this point. This specific germline *TP53* mutation seems to contribute to a significant proportion of the health burden associated with BC in Brazil and its identification has important implications for disease management and cancer risk counseling for the individual woman and her family.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

The authors wish to thank Magali Olivier for stimulating discussions, and Carlos Ferreira Nascimento, Severino da Silva Ferreira, Glauber Jesus, Fábio Vieira, Zeli Fogaça, Marta Recktenvald, Maria Teresinha Manuel, Alexandre Marques Machado and Silvana Soares dos Santos for laboratory and database support. The work of JG was supported by fellowships from CAPES and CNPQ (Brazil). Genotyping analyses were performed in the Experimental Research Center of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil and at the International Agency for Research in Cancer, Lyon, France. The study was supported in part by grants from GlaxoSmithKline Oncology (Ethnic Research Initiative Grant Award 2009), U.K.; CNPq to PA-P (Grant 307779 2009-2), Brazil; FAPERGS-PPSUS (grant # 09/0103-0), FAPERGS PRONEX (Grant #10/0051-9) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG # 08080), Brazil.

REFERENCES

1. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA: **Germ line p53 mutations in a familial**

- syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.** *Science* 1990, **250**(4985):1233-1238.
2. Li FP, Fraumeni JF: **Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome.** *J Natl Cancer Inst* 1969, **43**(6):1365-1373.
 3. Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW: **A cancer family syndrome in twenty-four kindreds.** *Cancer Res* 1988, **48**(18):5358-5362.
 4. **IARC Database, 2012 (accessed July 1, 2012) [<http://www-p53.iarc.fr/>]**
 5. Børresen AL, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piroux N, Thorlacius S, Eyfjörd J, Ottestad L, Smith-Sørensen B, Hovig E, Malkin D: **Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients.** *Cancer Res* 1992, **52**(11):3234-3236.
 6. Prosser J, Porter D, Coles C, Condie A, Thompson AM, Chetty U, Steel CM, Evans HJ: **Constitutional p53 mutation in a non-Li-Fraumeni cancer family.** *Br J Cancer* 1992, **65**(4):527-528.
 7. Sidransky D, Tokino T, Helzlsouer K, Zehnbauer B, Rausch G, Shelton B, Prestigiacomo L, Vogelstein B, Davidson N: **Inherited p53 gene mutations in breast cancer.** *Cancer Res* 1992, **52**(10):2984-2986.
 8. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, Antoniou A, Hartley R, Shenton A, Seal S *et al*: **BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives.** *Eur J Cancer* 2006, **42**(8):1143-1150.
 9. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS *et al*: **Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations.** *J Clin Oncol* 2009, **27**(8):1250-1256.
 10. Ginsburg OM, Akbari MR, Aziz Z, Young R, Lynch H, Ghadirian P, Robidoux A, Londono J, Vasquez G, Gomes M *et al*: **The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30.** *Fam Cancer* 2009, **8**(4):563-567.
 11. Lee DS, Yoon SY, Looi LM, Kang P, Kang IN, Sivanandan K, Ariffin H, Thong MK, Chin KF, Mohd Taib NA *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 Res* 2012, **14**(2):R61.
12. McCuaig JM, Armel SR, Novokmet A, Ginsburg OM, Demsky R, Narod SA, Malkin D: **Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time?** *Fam Cancer* 2012.
 13. Wilson JR, Bateman AC, Hanson H, An Q, Evans G, Rahman N, Jones JL, Eccles DM: **A novel HER2-positive breast cancer phenotype arising from germline TP53 mutations.** *J Med Genet* 2010, **47**(11):771-774.
 14. Melhem-Bertrandt A, Bojadzieva J, Ready KJ, Obeid E, Liu DD, Gutierrez-Barrera AM, Litton JK, Olopade OI, Hortobagyi GN, Strong LC *et al*: **Early onset HER2-positive breast cancer is associated with germline TP53 mutations.** *Cancer* 2012, **118**(4):908-913.
 15. Masciari S, Dillon DA, Rath M, Robson M, Weitzel JN, Balmana J, Gruber SB, Ford JM, Euhus D, Lebensohn A *et al*: **Breast cancer phenotype in women with TP53 germline mutations: a Li-Fraumeni syndrome consortium effort.** *Breast Cancer Res Treat* 2012.
 16. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G *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**(16):9330-9335.
 17. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB: **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**(10):4970-4973.
 18. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J *et al*: **Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation.** *J Med Genet* 2006, **43**(1):91-96.
 19. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR *et al*: **The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families.** *Cancer Lett* 2007, **245**(1-2):96-102.

20. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP *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**(1):21-25.
21. Achatz MI, 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**(9):920-925.
22. **Piovezan GC. Prevalência do alelo R337H no Estado do Paraná. Masters degree dissertation. Universidade Federal do Paraná, 2006.**
23. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, Srivastava K, Shurtleff S, Pei D, Zeferino LC *et al*: **Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil.** *BMC Cancer* 2008, **8**:357.
24. Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, Gugelmin ES, Oliveira Figueiredo MM, Watanabe F, Pontarolo R, Lalli E, Torres LF: **Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil.** *PLoS One* 2011, **6**(3):e18015.
25. Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, Godoy Assumpção J, Aparecida Cardinali I, Aparecida Ganazza M, Correa Ribeiro R, Brandalise SR, Dos Santos Aguiar S, Yunes JA: **Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil.** *Cancer* 2011, **117**(10):2228-2235.
26. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P *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**(2):143-150.
27. Gomes MC, Kotsopoulos J, Leao de Almeida G, Costa MM, Vieira R, de A G Filho F, Pitombo MB, Leal PR, Royer R, Zhang P *et al*: **The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil.** *Hered Cancer Clin Pract* 2012, **10**(1):3.
28. Gomes MC, Costa MM, Borojevic R, Monteiro AN, Vieira R, Koifman S, Koifman RJ, Li S, Royer R, Zhang S *et al*: **Prevalence of BRCA1 and BRCA2**

- mutations in breast cancer patients from Brazil. *Breast Cancer Res Treat* 2007, **103**(3):349-353.**
29. Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A, Elstrodt F, van den Bos R, de Snoo A, Fat GT *et al*: **The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype.** *Am J Hum Genet* 2003, **72**(5):1308-1314.
30. Naseem H, Boylan J, Speake D, Leask K, Shenton A, Lalloo F, Hill J, Trump D, Evans DG: **Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of CHEK2 compared with high-penetrance genes.** *Clin Genet* 2006, **70**(5):388-395.
31. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A *et al*: **American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer.** *J Clin Oncol* 2007, **25**(1):118-145.
32. Phillips T, Murray G, Wakamiya K, Askaa J, Huang D, Welcher R, Pii K, Allred DC: **Development of standard estrogen and progesterone receptor immunohistochemical assays for selection of patients for antihormonal therapy.** *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2007, **15**(3):325-331.
33. **IARC Protocols, 2012 (accessed July 1, 2012) [http://www-p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf. In].**
34. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - Unidades da Federação, 2012 (accessed July 1, 2012) [<http://www.ibge.gov.br/estadosat/>]**
35. Lane DP: **Cancer. p53, guardian of the genome.** *Nature* 1992, **358**(6381):15-16.
36. Lalloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, Evans DG, Group EOBCS: **Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history.** *Lancet* 2003, **361**(9363):1101-1102.
37. Mouchawar J, Korch C, Byers T, Pitts TM, Li E, McCredie MR, Giles GG, Hopper JL, Southey MC: **Population-based estimate of the contribution of TP53 mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study.** *Cancer Res* 2010, **70**(12):4795-4800.

Table 1. TP53 p.R337H mutation status by age at breast cancer diagnosed and recruitment center (n=815).

	RC 1 (n=293)	RC 2 (n=238)	RC 3 (n=284)	Total (n=815)
p.R337H carriers				
Age at BC diagnosis	n carriers/n total (%)			
≤ 45 ys	14 /136 (10.3%)	33/123 (26.8%)	2/144 (1.4%)	49/403 (12.1%)
≥ 55 ys	3 /157 (1.9%)	17/115 (14.8%)	1/140 (0.7%)	21/412 (5.1%)
p.R337H non-carriers				
Age at BC diagnosis	n non-carriers/n total (%)			
≤ 45 ys	122/136 (89.7%)	90/123 (73.2%)	142/144 (98.6%)	354/403 (87.4%)
≥ 55 ys	154/157 (98.1%)	98/115 (85.2%)	139/140 (99.3%)	391/412 (94.9%)

Legend: n- number; RC- recruitment center : 1- Porto Alegre, 2- São Paulo and 3- Barretos; BC- breast cancer;

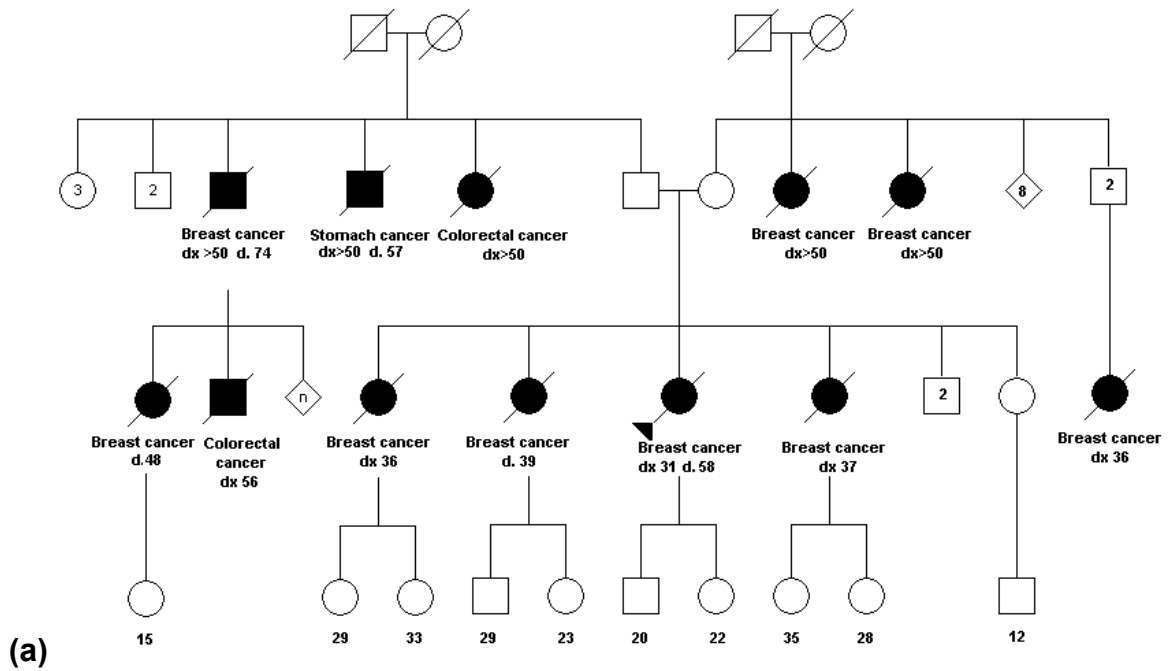
Table 2. Immunohistochemistry (IHC) scoring for estrogen and progesterone receptor status, and HER2 immunophenotype in breast cancer-affected women of group 2, according to recruiting center.

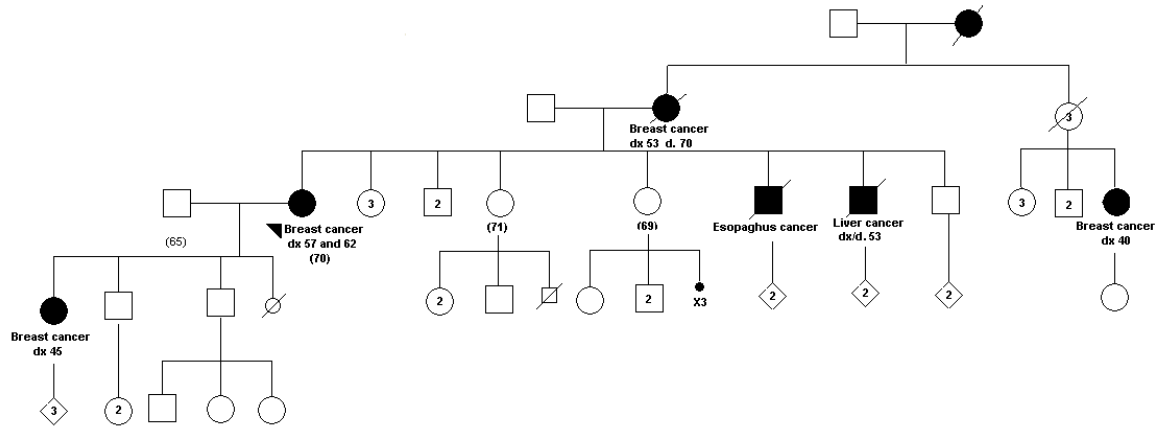
IHC	Score	Overall n (%)	RC1	RC2	RC3	p-value*
ER (n= 678)	0	183 (27.0)	45 (21.5)	53 (26.4)	85 (31.7)	0.045
	1	495 (73.0)	164 (78.5)	148 (73.6)	183 (68.3)	
Total	-	678	209	201	268	
PR (n=678)	0	255 (37.6)	62 (29.7)	76 (37.8)	117 (43.6)	0.007
	1	423 (62.4)	147 (70.3)	125 (62.8)	151 (56.4)	
Total	-	678	209	201	268	
HER2 (n=718)	0	351 (48.9)	139 (65.3)	59 (25.1)	153 (56.7)	<0.001
	1+	101 (14.1)	35 (16.4)	66 (28.1)	0	
	2+	105 (14.6)	7 (3.3)	52 (22.1)	46 (17.0)	
	3+	161 (22.4)	32 (15.0)	58 (24.7)	71 (26.3)	
Total	-	718	213	235	270	

Legend: ER: estrogen receptor; PR: progesterone receptor; RC: recruitment center, RC1= Porto Alegre, RC 2= São Paulo and RC 3= Barretos; For ER and PR: score 0: negative (Allred scoring 0-2); 'score 1: Allred scoring 3-8;

Table 3. *TP53* p.R337H mutation status and tumor HER-2 immunophenotype in breast cancer-affected women of group 2.

HER2 Scores	p.R337H carriers (n=64)	p.R337H non-carriers (n=654)	p-value
Total sample (n=718)	n (%)	n (%)	<0.001
0	17 (26.5)	334 (51.1)	-
1+, 2+, 3+	47 (73.5)	320 (48.9)	-
Breast Cancer ≤ 45 ys (n=349)			<0.001
0	11 (25.6)	151 (49.3)	-
1+, 2+, 3+	32 (74.4)	155 (50.7)	-
Breast Cancer ≥ 55 ys (n=369)			0.03
0	6 (28.6)	183 (52.6)	-
1+, 2+, 3+	15 (71.4)	165 (47.4)	-





(b)

Figure 1. Pedigrees of mutation-positive probands from group 1.

Legend: Cancer-affected relatives are shown in blackened symbols. Arrow indicates proband. Dx: age at diagnosis; WT: wild-type;

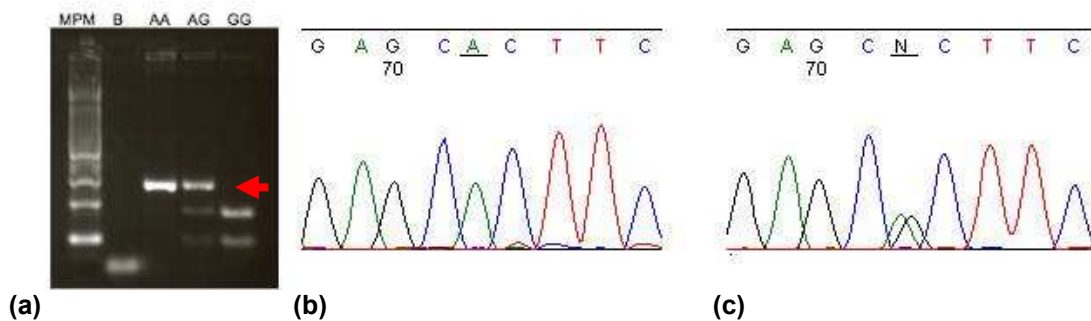


Figure 2. Detection of p.R337H by PCR-RFLP (*Restriction length fragment polymorphism*) and sequencing results in a homozygous and heterozygous p.R337H BC-affected women.

Legend: DNA was amplified by PCR to generate a 238-base pair product encompassing exon 10 and flanking splice sites. (a) RFLP analysis with *HhaI* (MPM = molecular weight marker; B = blank, arrow indicates the uncleaved 238-base pair PCR product corresponding to the A allele). (b) Sequencing of a homozygous p.R337H carrier and (c) a heterozygous p.R337H carrier (the underlined base corresponds to nucleotide 16901 of the *TP53* gene);

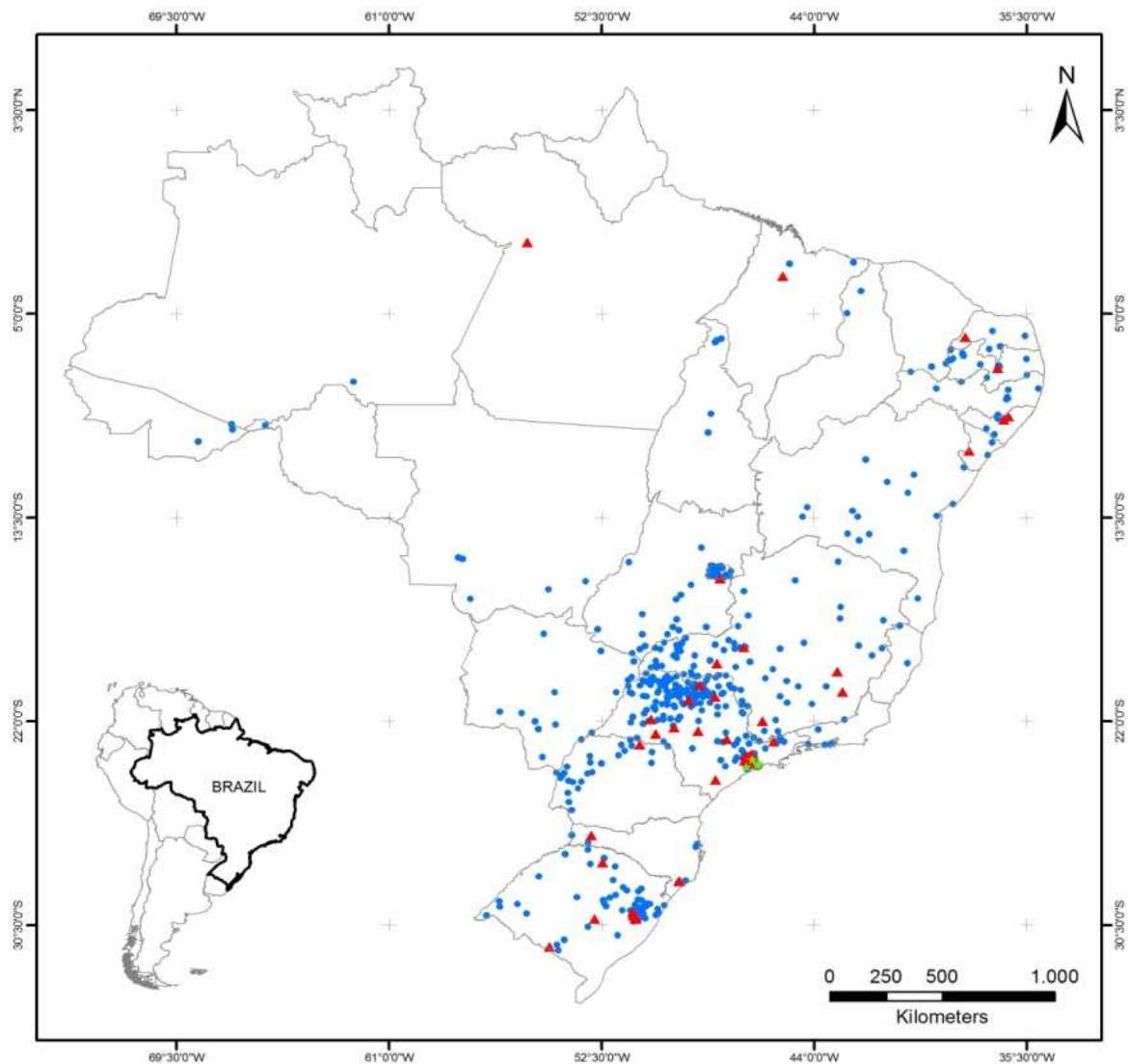


Figure 3. Geographic distribution of breast cancer-affected women of group 2 for which information on city of residence was available (n=657).

Legend: Blue dots, red triangles and green stars represent the city of residence of the homozygous normal, heterozygous and homozygous mutant p.R337H, respectively;

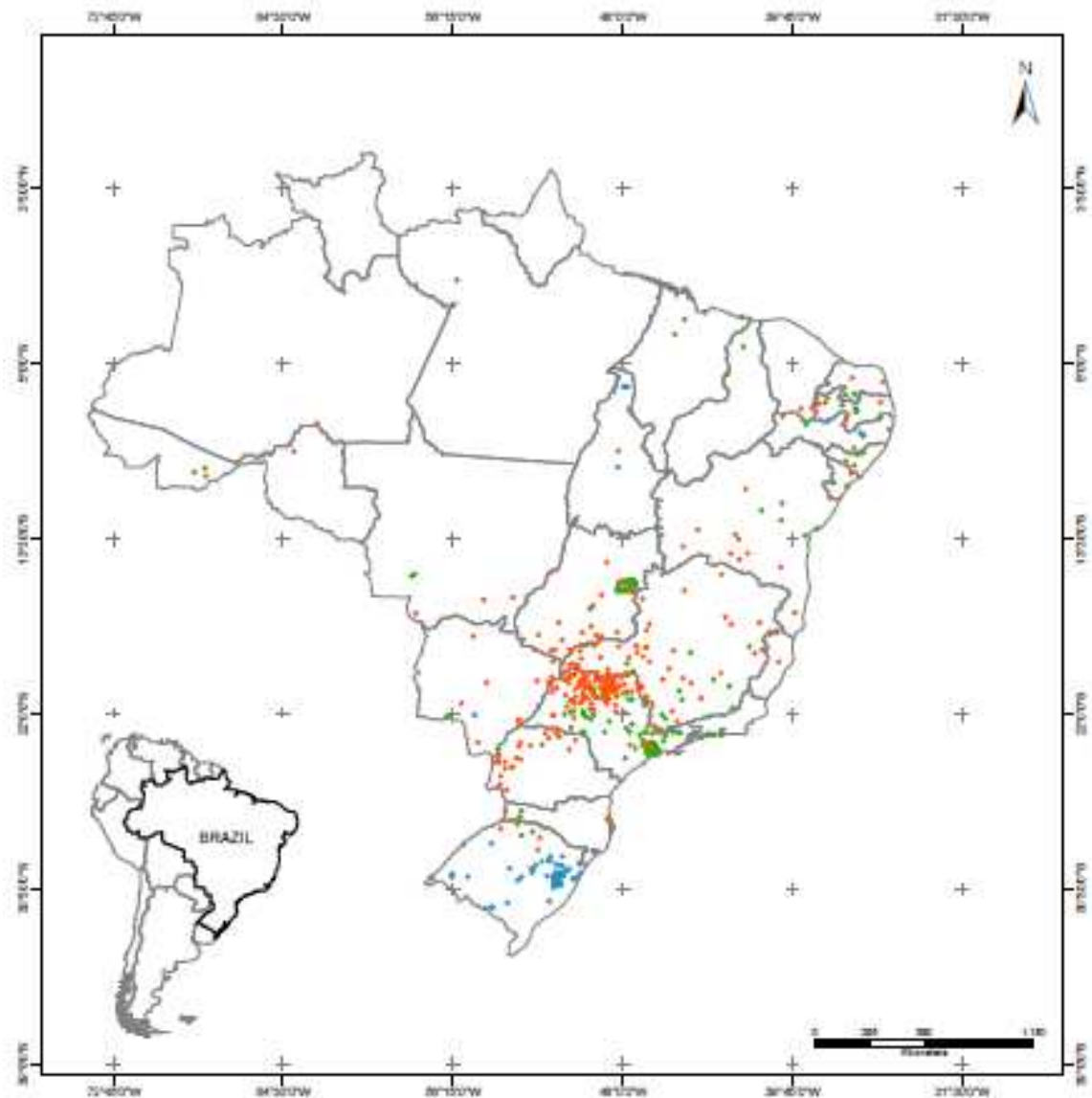
Supplementary materials

Figure S1. Geographic distribution of breast cancer-affected women of group 2 for which information on city of residence was available (n=657) according to the recruiting center.

Legend: Blue, green and orange dots represent women from the recruiting center 1, 2 and 3, respectively;

6.2. A *TP53* founder mutation, p.R337H, is associated with *phyllodes* breast tumors in Brazil

Juliana Giacomazzi^{1,2}, Patricia Koehler-Santos^{1,3}, Edenir Inez Palmero⁴, Marcia S. Graudenz^{5,6}, Luis Fernando Rivero^{5,6}, Rodrigo Depieri Michelli⁴, Cristovam Scapulatempo Neto⁴, Mariana Fitarelli-Kiehl^{1,7}, Geraldo Geyer⁸, Eduardo Lima⁹, Antonio Carlos Kruehl Pütten⁵, Luise Meurer¹⁰, Ana Geiger¹¹, Monica Blaya Azevedo¹², Vinicius Duval da Silva¹³, Pierre Hainaut¹⁴, Suzi Alves Camey¹⁵, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,7,16}

1. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; 2. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 3. Protein and Molecular Analysis Laboratory, Experimental Research Center, HCPA, Brazil; 4. Molecular Oncology Research Center, Hospital do Câncer de Barretos, Barretos, Brazil; 5. Pathology Service, HCPA, Brazil; 6. Instituto de Patologia, Porto Alegre, Brazil; 7. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 8. Laboratório Geyer, Porto Alegre, Brazil; 9. Pathology Service, Hospital Conceição, Porto Alegre, Brazil; 10. Laboratório Medicina Digital, Porto Alegre, Brazil; 11. Laboratório Patologistas Reunidos, Porto Alegre, Brazil; 12. Laboratório ANATPAT, Porto Alegre, Brazil; 13. Pathology Service, Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; 14. International Prevention Research Institute, Lyon, France; 15. Department of Statistics, Institute of Mathematics, UFRGS, Brazil; 16. Medical Genetics Service, HCPA, Brazil;

ABSTRACT

A few studies have associated *phyllodes* tumors (PT) of the breast with germline *TP53* mutations. Given this potential association and the high frequency of the *TP53* p.R337H in Southern and Southeastern of Brazil, the aim of this study was to assess whether p.R337H occurs among women diagnosed with such rare tumors in this specific region. Benign, borderline, and malignant breast PT were retrieved from eight pathology laboratories and DNA was extracted from tumor tissue to perform p.R337H mutation analysis. Overall, 128 cases classified as benign, 7 as borderline and 13 as malignant PT were included in the study. Mean age at diagnosis in these groups were 39, 52 and 57 years, respectively. The *TP53* p.R337H mutation was identified in 8 (5.4%) cases. Mutation frequency was significantly higher among malignant (3 of 13; 23%) when compared to benign tumors (5 of 128; 3.4%)

($p=0.004$). Mean age at PT diagnosis was not significantly different between mutation carriers and non-carriers. However when subgroups were analyzed, the difference in age at diagnosis of carriers versus non-carriers within the group of benign tumors, reached borderline significance (Table 2). Analysis of the Brazilian founder haplotype was possible in two p.R337H-positive tumors, and in both cases the founder haplotype was present. Although we cannot exclude that this particular alteration is somatic and not constitutive in the tumors analyzed, our findings reinforce previous evidence that *TP53* mutations have an important role in the development in PT.

(*) Corresponding author: Juliana Giacomazzi. Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3359-8010. e-mail: jugiacomazzi@gmail.com

INTRODUCTION

Phyllodes tumors (PT) of the breast are fibroepithelial biphasic tumors composed of variable proportions of epithelial and stromal cells and encompass the entire spectrum from benign to malignant cystosarcoma *phyllodes*. They can present clinically as fibroadenomas, but differ histologically from these by increased stromal cellularity and atypia, and clinically, by their potential for local recurrence and metastatic spread [1-5].

PT represent 2–3% of all fibroepithelial breast tumors and less than 1% of all breast tumors. Population-based estimates indicate an incidence of malignant PT of 2.1 cases per million women, with the highest frequencies in Asian and white Latin women. There are currently no established evidence-based treatment or follow-up guidelines for the disease. They most commonly occur in women between the ages of 30 and 55 years, with a median age at diagnosis of 45 years [6, 7].

A few studies have associated PT of the breast with germline *TP53* mutations. Birch *et al.* (2001) reported an association of germline mutations with the disease based on the analyses of two cases of malignant PT from 2 families with Li-Fraumeni Syndrome [8]. Mazoyer *et al.* (1994) reported a constitutional mutation in codon 257 of the *TP53* gene in a proband with family history of Li-Fraumeni

Syndrome, who developed multiple independent malignant tumors, including a PT of the breast [9]. Shiseki *et al.* (1993) described a germline missense mutation at codon 282 of the *TP53* gene in a proband who developed osteogenic sarcoma, stromal sarcoma of the breast and gastric carcinoma at the ages of 13, 19, and 22, respectively [10]. However, due to the small number of cases described, a definitive association and inclusion of PT in the spectrum of LFS-associated cancers have not been definitively established. In the general population, germline *TP53* mutations are estimated to occur in 1:2000-5000 individuals [8, 11-13]. However, studies from Southern and Southeastern Brazil have shown that a specific germline *TP53* mutation in codon 337 (c.1010G>A; p.R337H), occurs in 1 in 300 live births in the region, due to a founder effect. The p.R337H mutation has been identified among Brazilian Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like families, among children with adrenocortical carcinoma, choroid plexus carcinoma and osteosarcoma and women with breast cancer [14-19].

Given a potential association of PT of the breast with germline *TP53* mutations, and the high frequency of the p.R337H in Southern and Southeastern of Brazil, the aim of this study was to assess whether *TP53* p.R337H occurs in tumors of women diagnosed with PT in this specific region.

METHODS

All diagnoses of benign, borderline, and malignant breast PT between 2000 and 2010 were retrieved from eight pathology laboratories in the cities of Porto Alegre and Barretos, located in the Southern and Southeastern regions of Brazil, respectively. All slides of PT were reviewed by two pathologists without knowledge of the original diagnosis and clinical outcome. Histological classification was based on the three most widely accepted classification features: (1) the degree of stromal cellular atypia; (2) mitotic activity per 10 high-power fields (hpf); and (3) presence or absence of stromal overgrowth [20]. Based on these three features, the PT were classified as benign, borderline and malignant (according to table 1). Samples were unselected for cancer family history and upon inclusion, they were relabeled and had their original identifiers removed. Formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE) tumor samples were marked for posterior tissue extraction using a 1.0mm punch directly from the paraffin blocks. Tumor DNA was isolated using the DNA FFPE Kit (Qiagen,

Germany) and quantified using NanoDrop technology (Thermo Fisher Scientific Inc., USA). *TP53* p.R337H genotyping was performed in all cases by allelic discrimination in triplicates using a qPCR - TaqMan (Applied Biosystems, USA). The presence of the Brazilian founder p.R337H haplotype (A3) was verified in mutation-positive samples as previously described [21] by ASO-PCR and Nested-PCR analyzing SNP28 (rs9894946) of a panel of 29 intragenic SNPs. Since this SNP is identical in haplotypes A1 and A3, all cases were further genotyped for SNP15 (rs1642785) and SNP18 (rs1800370) by direct sequencing.

The study was approved by the Institutional Research and Ethics Committees of the coordinating center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre under protocol # 08-023.

SPSS version 16.0 was used for data handling and statistical analyses. For descriptive analysis, categorical variables were described by their absolute and/or relative frequencies and quantitative variables were expressed as mean and standard deviation (SD) or median. For analytical statistics, t test for independent variables and ANOVA was used to compare mean values of the quantitative variables. Genotype-phenotype correlations were described by the absolute and/or relative frequencies (with CI 95%). In all analyses a significance level of 0.05 was adopted.

RESULTS

Overall, 148 breast PT were included in the study, 79 were included in Porto Alegre (Southern Brazil) and 69 in Barretos (Southeastern Brazil). Of these, 128 were classified as benign, 7 as borderline and 13 as malignant tumors. Mean ages at diagnosis in these groups were 39 (range: 16-81), 52 (range: 41-71) and 57 (range: 28-80) years, respectively. The *TP53* p.R337H mutation was identified in tumor cells of 8 (5.4%) cases. Mutation frequency was significantly higher among malignant (3 of 13; 23%) when compared to benign tumors (5 of 128; 3.4%) ($p=0.004$). Mean age at PT diagnosis was not significantly different between mutation carriers and non-carriers. However, when subgroups were analysed, the difference in age at diagnosis of carriers versus non-carriers within the group of benign tumors, reached borderline significance (Table 2). Analysis of the Brazilian founder haplotype was possible in two p.R337H-positive tumors, and in both cases the founder haplotype was present.

DISCUSSION

The *TP53* gene has been recognized for over two decades as a key player in both somatic and inherited cancer. Somatic mutations of the *TP53* gene are present in over 50% of most tumor types and are consistently associated with a poor prognosis in different malignancies. Germline *TP53* mutations result in increased predisposition to a wide spectrum of early-onset cancers, including breast cancer, the most common tumor in adult women diagnosed with the Li-Fraumeni Syndrome (LFS) [12, 22]. Recent results from our group and others indicate that one specific germline *TP53* mutation, p.R337H, is exceedingly frequent in Brazilian women affected with breast cancer. The mutation is particularly frequent in those diagnosed with pre-menopausal BC in Southern and Southeastern regions of the country, and this is likely due to the founder effect that has been described for this mutant [14, 18, 19, 23].

The first strong evidence of an association between *TP53* mutations and PT of the breast was published by Birch *et al.* in 2001. Studying 28 LFS families from the United Kingdom, they determined which tumors were strongly associated to germline mutation carriage by comparing observed and predicted cancer rates in this cohort. Although carcinoma of the female breast was numerically the most frequent cancer across all ages (25.7% of total tumors) its relative frequency in the LFS cohort was only 1.46, reflecting the high incidence of this cancer in the general population. Malignant PT of the breast, on the other side, although uncommon (1.4% of the total cancers) were strongly associated with germline *TP53* mutations, and together with adrenocortical carcinomas, showed the greatest increases in relative frequency (78.06%) in the LFS cohort compared to general population rates. A few additional case reports indicated occurrence of malignant and benign PT in germline *TP53* mutation carriers [9, 24].

Two further studies provided evidence for a significant role of *TP53* in the carcinogenic process of malignant PT. In the first study, Hodges *et al.* (2009) described one case of synchronous fibroadenoma and malignant PT in the same breast mass and demonstrated allelic loss at the *TP53* locus in the PT but not in the fibroadenoma. In the second study of 11 PT of the breast and 3 fibroadenomas, Kuijper *et al.* (2009) identified that copy number alterations consisting of recurrent losses involving 17p were frequent events in PT but not in

fibroadenomas [25]. Interestingly, these copy number changes were present also in benign PT, suggesting that genomic instability is an early event in the genesis of these tumors.

In the present study, we have analyzed a large cohort of benign, borderline and malignant PT diagnosed in women from Southern and Southeastern Brazil and identified a founder *TP53* mutation, p.R337H, in tumor tissue of 5.4% of these cases. We cannot exclude that this particular alteration is somatic and not constitutive in the tumors analyzed (since non-tumoral genomic DNA was unavailable for study).

However, the *TP53* p.R337H mutation has never been identified as a somatic mutation in breast cancer, although other somatic *TP53* mutations often occur (i.e. in 3.630 of 15.770 breast tumors according to the *IARC TP53* mutation database [26]). Furthermore, occurrence of p.R337H as a somatic mutation in cancer is exceedingly uncommon, with only 3 instances registered in the same database (in liver, colorectal and adrenocortical carcinoma) among over 26.000 somatic mutations identified in different cancers. Thus, our findings reinforce previous evidence that *TP53* mutations have an important role in the development of both benign and malignant PT of the breast. If these findings are confirmed in further prospective studies, *TP53* germline mutation screening will have to be considered in the diagnostic workup of women presenting with benign and especially malignant PT of the breast. Identification of a germline *TP53* mutation in these cases will have important implications for disease management and cancer risk counseling for the patient and her family.

Acknowledgements and Financial support: The work of JG was supported by fellowships from CAPES and CNPq (Brazil). The study was supported in part by grants from FAPERGS-PPSUS (grant # 09/0103-0), CNPq to PA-P (Grant 307779 2009-2), GlaxoSmithKline Oncology (Ethnic Research Initiative Grant Award 2009), U.K.; Brazil; FAPERGS PRONEX (Grant #10/0051-9) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG # 08080), Brazil.

REFERENCES

1. Bernstein L, Deapen D, Ross RK (1993) The descriptive epidemiology of malignant cystosarcoma phyllodes tumors of the breast. *Cancer* 71(10): 3020-4

2. Rowell MD, Perry RR, Hsiu JG, Barranco SC (1993) Phyllodes tumors. *Am J Surg* 165(3): 376-9
3. Bapat K, Oropeza R, Sahoo S (2002) Benign phyllodes tumor of the male breast. *Breast J* 8(2): 115-6
4. Ansah-Boateng Y, Tavassoli FA (1992) Fibroadenoma and cystosarcoma phyllodes of the male breast. *Mod Pathol* 5(2): 114-6
5. Gullett NP, Rizzo M, Johnstone PA (2009) National surgical patterns of care for primary surgery and axillary staging of phyllodes tumors. *Breast J* 15(1): 41-4 DOI TBJ669 [pii] 10.1111/j.1524-4741.2008.00669.x
6. Liberman L, Bonaccio E, Hamele-Bena D, Abramson AF, Cohen MA, Dershaw DD (1996) Benign and malignant phyllodes tumors: mammographic and sonographic findings. *Radiology* 198(1): 121-4
7. Grabowski J, Salzstein SL, Sadler GR, Blair SL (2007) Malignant phyllodes tumors: a review of 752 cases. *Am Surg* 73(10): 967-9
8. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. (2001) Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 20(34): 4621-8 DOI 10.1038/sj.onc.1204621
9. Mazoyer S, Lalle P, Moyret-Lalle C, et al. (1994) Two germ-line mutations affecting the same nucleotide at codon 257 of p53 gene, a rare site for mutations. *Oncogene* 9(4): 1237-9
10. Shiseki M, Nishikawa R, Yamamoto H, et al. (1993) Germ-line p53 mutation is uncommon in patients with triple primary cancers. *Cancer Lett* 73(1): 51-7 DOI 0304-3835(93)90187-E [pii]
11. Li FP, Fraumeni JF (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 71(4): 747-52
12. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250(4985): 1233-8
13. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Li FP (1998) Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 90(8): 606-11

14. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. (2008) Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* 8: 357 DOI 1471-2407-8-357 [pii] 10.1186/1471-2407-8-357
15. Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, et al. (2011) Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One* 6(3): e18015 DOI 10.1371/journal.pone.0018015
16. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. (2001) 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* 86(10): 4970-3
17. Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al. (2011) Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. *Cancer* 117(10): 2228-35 DOI 10.1002/cncr.25826
18. Gomes MC, Kotsopoulos J, Leao de Almeida G, et al. (2012) The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. *Hered Cancer Clin Pract* 10(1): 3 DOI 1897-4287-10-3 [pii] 10.1186/1897-4287-10-3
19. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, et al. (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245(1-2): 96-102 DOI S0304-3835(06)00005-X [pii] 10.1016/j.canlet.2005.12.039
20. Tavassoli FA, Devilee P (eds). *World Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics of Tumors of the Breast and Female Genital Organs.* International Agency for Research on Cancer Press: Lyon, 2003, pp 99–103
21. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. (2010) 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* 31(2): 143-50 DOI 10.1002/humu.21151
22. Lane DP (1992) Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 358(6381): 15-6 DOI 10.1038/358015a0

23. Ashton-Prolla p OC, Koehler-Santos P, Graudenz MS, Palmero EI, Fernandes G, Micheli R, Martel-Planche G, Achatz MIW, Soares FA, Goldim JR, Caleffi M, Hainaut P, Camey SA, Giacomazzi J (2012) Contribution of TP53 p.R337H mutation to breast cancer prevalence in Brazil. *J Clin Oncol* 30 (suppl; abstr 1522)
24. Prochazkova K, Foretova L, Sedlacek Z (2008) A rare tumor and an ethical dilemma in a family with a germline TP53 mutation. *Cancer Genet Cytogenet* 180(1): 65-9 DOI S0165-4608(07)00594-8 [pii] 10.1016/j.cancergencyto.2007.09.015
25. Kuijper A, Snijders AM, Berns EM, et al. (2009) Genomic profiling by array comparative genomic hybridization reveals novel DNA copy number changes in breast phyllodes tumours. *Cell Oncol* 31(1): 31-9
26. IARC Database, 2012 (accessed July 1, 2012) [<http://www-p53.iarc.fr/>]

Table 1 – Histologic features used in the classification of *phyllodes* tumor subtypes.

Histological features	Benign	Borderline	Malignant
Stromal cellular atypia	mild	marked	Marked
Mitotic activity	<4 per 10 hpf*	4-9 per 10 hpf	>10 per 10 hpf
Stromal overgrowth	absent	absent	presente

Legend: (*) hpf, high-power field;

Table 2 – Distribution of *TP53* p.R337H mutation status by age group and *phyllodes* tumor subtype (n=148).

<i>Phyllodes</i> tumor type	p.R337H-positive		p.R337H-negative		p-value*
	Cases (n)	Mean Age (SD)	Cases (n)	Mean Age (SD)	
Total	8	40.9 (13.5)	140	41.3 (14.4)	0.46
Benign	5	32.6 (7.7)	123	39.3 (13.3)	0.06
Borderline	0	-	7	52.1 (11.2)	-
Malignant	3	54.6 (7.7)	10	57.7 (16.7)	0.33

Legend: *comparison of mean age at diagnosis of *phyllodes* tumors in carriers and non-carriers.

6.3. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like Syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil

Giacomazzi J^{*1,2}, Selistre SGA^{2,3}, Rossi C^{1,4}, Alemar B^{1,5}, Santos-Silva P¹, Pereira FS^{1,4}, Netto CB⁶, Cossio SL^{1,2}, Roth DE³, Brunetto AL³, Zagonel-Oliveira M⁷, Martel-Planche G⁸, Goldim JR⁹, Hainaut P¹⁰, Comey SA¹¹, Ashton-Prolla P^{1,2,5}.

1. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; 2. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 3. Pediatric Oncology Service, HCPA, Brazil; 4. School of Medicine, UFRGS, Brazil; 5. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 6. Medical Genetics Service, HCPA, Brazil; 7. National Institute of Populational Medical Genetics (INAGEMP), UFRGS, Brazil; 8. International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France; 9. Bioethics Research Laboratory, HCPA, Brazil; 10. International Prevention Research Institute, Lyon, France; 11. Department of Statistics, Institute of Mathematics, UFRGS, Brazil;

ABSTRACT

The prevalence of Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like Syndromes (LFS/LFL) was investigated in children diagnosed with tumors of LFS/LFL spectrum (n=292) and in a small consecutive series of cancer-unaffected controls (n=65) admitted in a public hospital in Southern of Brazil. Among cancer-unaffected children, a positive family history of cancer in 1st and or 2nd degree relatives was reported by parents in 35.4%. In addition, 1.5% had a family history consistent with LFL criteria. Among cancer affected children, 50.7% had a 1st and or 2nd degree family history of cancer and 25.3% had a family history consistent with LFL syndrome (p<0.001). Screening for the common Brazilian *TP53* founder mutation p.R337H identified 11 (3.7%) carriers among cancer-affected patients: 9 diagnosed with adrenocortical carcinomas (ACC) and 2 with choroid plexus carcinomas (CPC). One of the ACC probands was homozygous mutant. The Brazilian founder haplotype was present in all carriers. Loss of heterozygosity at the p.R337H *locus* was observed in all tumors of mutation carriers. In addition, direct sequencing of the entire *TP53* coding region and gene rearrangement analysis by MLPA of 48 probands fulfilling LFL criteria (Eeles 2, Birch and/or Chompret) and who screened negative for the p.R337H mutation, revealed a DNA binding domain mutation, p.G245S, in only one child. Genetic counseling and

TP53 p.R337H testing should be offered to all Brazilian children diagnosed with ACC and CPC as first diagnostic approach, and when negative, testing should be expanded to comprehensive *TP53* germline mutation testing. A significant proportion of children with cancer in Southern Brazil fulfills criteria for LFL and should be referred for genetic risk assessment. Strategies to improve identification and promote proper referrals for LFS/LFL families need to be developed and will require education and compromise of health professionals directly involved with their care.

KEY WORDS: Childhood cancer, Li-Fraumeni syndrome, Li Fraumeni-Like syndrome, *TP53* mutations, *TP53* p.R337H mutation.

(*) **Corresponding author:** Juliana Giacomazzi. Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3359-8010. e-mail: jugiacomazzi@gmail.com

INTRODUCTION

Cancer is one of the more frequent causes of non-traumatic deaths in children, representing 1-3% of the cancer diagnosis worldwide (1-5). The Brazilian National Cancer Institute (INCA, Brazil) estimates that there will be around 384.340 new cancer diagnoses in Brazil, including 11.530 (3%) diagnosed in children and adolescents under age 19 years in 2012 (5). Childhood cancers that arise in the context of a genetic predisposition are rare events, which are estimated to account for approximately 5-10% of all pediatric cancer cases [5]. However, with increased awareness towards cancer family history and advanced technologies in mutation detection, this proportion will likely increase (6), facilitating pre-symptomatic identification of high risk individuals and ultimately decreasing cancer-related mortality in this setting.

Childhood cancers are a common feature in Li-Fraumeni syndrome and its variant Li-Fraumeni-like syndrome (LFS/LFL, OMIM #151623), inherited autosomal dominant disorders associated with multiple malignancies in childhood and young adults, including sarcomas, breast cancers, leukemia, adrenocortical and central nervous system carcinomas, Wilm's tumor and germ cells malignancies. Germline

mutations in the *TP53* gene are currently the only molecular defect known to be associated with the disease. In the general population, such mutations are estimated to occur in 1:2000-5000 individuals (7-11). The most common childhood tumors observed in mutation carriers are soft tissue and bone sarcomas, brain tumors, leukemia and adrenocortical carcinoma (8, 10, 12). Other tumor types less frequently associated with the syndrome include Wilm's and germ cells tumors (10).

Several clinical criteria based on cancer family history have been developed to identify families with suspected of LFS/LFL and are used to indicate *TP53* mutation testing. Criteria for the classic LFS were proposed in 1988 based on the cancer phenotype observed in 24 families (13). Less stringent criteria were proposed by Birch and Eeles in 1994 and 1995, respectively, as a result of the observation that not all mutation-positive families display the classic LFS phenotype (10, 14, 15). More recently, Chompret and Tinat proposed additional criteria for the identification of germline *TP53* mutation carriers (16-18). The Chompret criteria are more restrictive on the cancer types and age of onset in the proband than the previously published LFL criteria, but allow for the possibility of testing a cancer-affected individual with a negative family history. Probability of detecting a germline *TP53* mutation is directly related to stringency of phenotypic criteria. However, even in classic LFS families, germline *TP53* mutations are observed in approximately 56% to 80% of the probands (19-23). Germline *TP53* mutations are estimated to occur in 11-40%, 20-40% and 7-14% of the families reaching the Birch, Chompret and Eeles criteria, respectively (14-16, 22-24).

Recently, a specific germline mutation occurring in the tetramerization domain (exon 10) of the *TP53* gene, p.R337H, has been reported at a high prevalence in Southern and Southeastern Brazil (25-29). Initial studies on this mutation claimed that its main, if not exclusive, cancer related risk was childhood adrenocortical carcinoma in carriers (25, 27). However, other recent studies identified p.R377H carriers with the less strict LFL criteria (28), and in patients with tumors other than ACC, such as choroid plexus carcinoma, osteosarcoma and breast cancer (30-32). Although a few mutation carriers have been identified in Europe, (17, 33, 34), most p.R337H-positive individuals have been described in Brazil, especially in the Southern and Southeastern regions, where the mutation is estimated to occur in 1 in every 300 individuals of the general population (29, 35, 36).

In this study, in order to better understand the contribution of germline *TP53* mutations in Brazil, we provide an in depth assessment of a large pediatric series from the Southern region of the country diagnosed with tumors of the LFS/LFL spectrum. We assessed clinical criteria that would allow LFS/LFL syndrome identification, frequency of the common Brazilian founder mutation p.R337H and other germline *TP53* mutations, and performed a detailed familial, clinical and molecular characterization of mutation-positive individuals.

METHODS

Participants Recruitment. All parents or legal representatives of children diagnosed with and/or treated for tumors of the LFS/LFL spectrum (adrenocortical carcinoma, sarcoma, central nervous system tumors, leukemia, germ cell tumors and Wilm's tumor) at the Pediatric Oncology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (a reference public and University Hospital) between 1998 and 2011 were contacted and invited to participate in the study, regardless of family history of cancer. Contact was attempted by telephone at least three times and if no contact was possible, by mail for all patients with a definitive histopathological diagnosis of the above mentioned cancers and those who volunteered to participate were included after signature of informed consent. Parents and other relatives of probands mutation carriers identified in the study were also invited to participate. In addition, we also interviewed a consecutive sample of parents of 65 children without cancer, admitted to the pediatric ward of the same hospital during a period of 3 months for treatment of cancer-unrelated disorders to verify their cancer family history.

Ethical aspects. The study was approved by the Institutional Research and Ethics Committees (protocol # 08-080) and by the National Brazilian Research Ethics Commission (CONEP; protocol # 14821). All individuals/families recruited for the study gave written informed consent and authorized the publication of pedigrees.

Clinical data and pedigrees. Clinical data on all recruited patients and families were obtained by interviews, specific questionnaires and review of medical records. The family history (FH) was recorded in detailed pedigrees with information traced as far backwards and laterally as possible, extending to paternal and maternal lines and including a minimum of three generations. Confirmation of the FH of cancer was

attempted in all cases with pathology reports, medical records and/or death certificates and was obtained whenever possible. The presence of criteria for LFS/LFL was assessed through independent review of the pedigree by three of the authors (PAP, CBON, and JG).

Genetic analyses. Peripheral blood samples were collected in EDTA from all patients and formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) tumor and adjacent normal tissues where retrieved whenever possible. DNA was extracted by standard methods: Illustra Blood genomicPrep mini Spin Kit (GE Healthcare, USA) and QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, USA). Screening for the germline *TP53* p.R337H mutation (either genomic DNA from peripheral blood or FFPE non-tumoral tissue) was performed by allelic discrimination using a TaqMan assay (Applied Biosystems, USA) in duplicates, and using positive and negative internal controls in all experiments. All mutation-positive results were confirmed by a second independent TaqMan analysis and by direct exon 10 sequencing using primers and conditions previously described (37). In probands fulfilling LFS or LFL criteria and for which initial p.R337H testing was negative, the entire coding sequence of *TP53* (exons 2-11) was sequenced using the protocols described (37), and screening for gene rearrangements was done by MLPA according to the manufacturers instructions (SALSA MLPA probemix P056-B1 *TP53*; MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands). Tumor DNA was sequenced for *TP53* mutations to assess loss of heterozygosity for p.R337H or presence of additional alterations in all germline mutation carriers. The presence of the Brazilian founder p.R337H haplotype (A3) was verified in mutation-positive samples as previously described by Garritano et al. (2009) by ASO-PCR and Nested-PCR analyzing SNP28 (rs9894946) of a panel of 29 intragenic SNPs. Since this SNP is identical in haplotypes A1 and A3, all cases were further genotyped for SNP15 (rs1642785) and SNP18 (rs1800370) by direct sequencing.

Statistical analysis. SPSS version 14.0 was used for data handling and statistical analyses. Continuous variables are expressed as median and range; categorical variables are expressed by their absolute and/or relative frequencies. P-values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Families of all 717 patients diagnosed and treated for cancers of the LFS/LFL spectrum at the Pediatric Oncology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre between 1998 and 2011, were invited to participate in the study and 292 (40.7%) volunteered and were recruited. Most of the families that agreed to participate (n=288, 98.6%) were of cancer survivors. Forty-eight families (6.7%) refused to participate in the study and the remainder did not respond to the invitation. The recruitment rate per year was, on average, 46.3% (21.6-83.8%) with recruitment rates >50% in years 2005, and 2009 to 2011. Place of birth of cancer-affected children included in the study is depicted in figure 1, demonstrating that the vast majority of patients admitted to the Pediatric Oncology Service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre are born in the State of Rio Grande do Sul.

Clinical information on the patients included in this study is summarized in table 1. The mean age of the group of 65 cancer-unaffected children was 9 years. Although a positive 1st and or 2nd degree family history of cancer (in general) and breast cancer, excluding 1 case adopted, were reported in 23 (35.9%) and 4 (6.2%) of the cancer-unaffected children, only one child (1.6%) had a family history consistent with LFL criteria (Chompret, Chompret modified, Birch and Eeles 1); which was significantly different from the frequency observed among cancer-affected children (p<0.001).

Screening for the germline *TP53* p.R337H mutation among cancer patients identified 11 mutation-positive probands (3.7% of the total sample), including 9 patients diagnosed with ACC and two patients diagnosed with choroid plexus carcinomas (figure 2). One of the 11 ACC affected probands (figure 2, pedigree 10) was homozygous for the p.R337H mutation.

Loss of heterozygosity at the p.R337H *locus* was observed in all tumors of the mutation-positive probands for which tumor tissues were available (table 2). Mutation status of the parents was assessed in 10 of the 11 carrier probands. In 5 probands, the mutation carrier was the father, in 4, it was the mother, and in one proband (homozygous affected patient) both parents were carriers (figure 2). In one family, the parents were unavailable for testing. Among the 47 relatives tested, p.R337H was encountered in 2/2 (100%) cancer-affected and 25/45 (55.5%) cancer-unaffected relatives. The Brazilian founder haplotype was assessed in at least one

member of each of the p.R337H-positive families, in a total of 37 individuals and was present in all of them.

Direct *TP53* sequencing of 48 probands with LFS/LFL criteria (Birch and Chompret) who did not carry the p.R337H mutation revealed a classic (pathogenic) DNA binding domain mutation, p.G245S, in only one child (2.0%) diagnosed with medulloblastoma at age 10 years (figure 2, Pedigree 11). In all other 47 probands fulfilling LFL criteria (including the more relaxed Modified Chompret criteria), sequencing of exons 2-11 and MLPA of the *TP53* gene did not identify deleterious germline mutations or gene rearrangements. In three probands fulfilling Chompret criteria, biological material available was insufficient for full gene sequencing.

DISCUSSION

In this study, we describe for the first time the *TP53* p.R337H mutation frequency in a series of children diagnosed with tumors of the LFS/LFL spectrum in Southern Brazil, recruited regardless of their cancer family history. Although overall mutation frequency was relatively low (< 5%) in this series, our results confirm the strong association of the mutation with adrenocortical carcinoma and choroid plexus carcinoma as reported in other regions of the country (25, 26, 28, 30, 32). We were unable to demonstrate an association of the mutation with pediatric sarcomas in this large series of cases (n=81). Even among patients with osteosarcoma (n=21), a tumor previously associated with p.R337H, no carriers were identified. (32) . In addition, the mutation was also not encountered among patients with leukemia (n=77) and Wilm's tumor (n=34), reinforcing a very specific cancer phenotype in carrier children that appears to be restricted to only a few tumor types. Furthermore, among the mutation-positive probands, only 63% (7 of 11) had a family history of cancer in 1st or 2nd degree relatives. The absence of a family history of cancer in four mutation-positive probands reinforces that germline *TP53* mutation screening should be undertaken in any child with the diagnosis of ACC or CPC (18, 38, 39), especially in Brazil, where one could initiate investigation with p.R337H testing. When analyzing the tumors of probands with the p.R337H mutation identified here, we observed loss of heterozygosity and abnormal nuclear accumulation of p53, findings that have been commonly described in LFS patients harboring classic, DNA-binding mutations. Thus, our findings reinforce an important role for this specific mutation in the

development of ACC and CPC, consistent with the classical model of loss of function mutations in a tumor suppressor gene (40, 41).

We also demonstrated, in all p.R337H-positive families available for testing, that the mutation is present in the germline of at least one parent. Interestingly, all carrier parents were unaffected by cancer, confirming that partial penetrance is an important feature of this mutation. Furthermore, in all mutation carriers identified, either probands or their relatives, the mutation occurred on the Brazilian founder haplotype (35). Although a report from Europe has suggested occurrence of the mutation on a different haplotype (33, 34), all Brazilian carriers identified so far, including the 37 from carriers from the 11 families studied here, apparently derive from the same common ancestor.

Another important result was the identification of criteria for LFL in a significant proportion (25.3%) of the probands, a finding that was not apparent in a small group of cancer-unaffected children recruited from the same Institution. The high proportion of cancer-affected children with histories consistent with LFL alerts to the importance of educating health care professionals in obtaining a detailed cancer family history for every child diagnosed with cancer, especially those with cancers of the LFS disease spectrum.

On the other hand, one of the most intriguing findings in this subset of patients with LFL criteria was the low frequency of germline *TP53* mutations or rearrangements in the probands fulfilling Birch and/or Chompret LFL criteria. Mutation prevalence in this group (23.5%) was lower than expected from observations published for other similar clinical series. When we consider that among the 12 mutation-positive cases, only 1 was not the founder Brazilian p.R337H mutation, the prevalence of classic DNA-binding domain mutations in this series is exceedingly low. (14-16, 22-24). In these families, the molecular mechanisms to explain the autosomal dominant cancer predisposition phenotype remains to be determined, posing a significant challenge for genetic counseling and management.

We conclude that genetic counseling and *TP53* p.R337H testing should be offered to all Brazilian children diagnosed with ACC and CPC as first diagnostic approach, and when negative, testing should be expanded to comprehensive germline *TP53* mutation screening. Furthermore, the LFL phenotype is common among cancer-affected children in Southern Brazil and the proper identification and referral of at-risk families will require education and compromise of health

professionals directly involved with their care. An effort in understanding the molecular basis of the autosomal dominant predisposition of early-onset tumors observed in the syndrome, and also of its genetic and non-genetic modifiers, should be undertaken to provide adequate management to affected children and their families.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

The authors wish to thank Cláudio Galvão, Lauro Greggianin, Camila Matzenbacher Bittar and Filippo Vairo for their collaboration with patient recruitment, Diego D'Avila Paskulin, Marcia da Silveira Graudenz and Luise Meurer for laboratory support and Lavinia Schuler-Faccini and INaGEMP for their help with geo-mapping. Funding of this study was provided by the Ethnic Research Initiative Grant (GlaxoSmithKline, UK), by a grant from Fundo de Incentivo a Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil (FIPE-HCPA) and by a grant from FAPERGS (PPSUS 2009), Brazil.

REFERENCES

1. <http://seer.cancer.gov/publications/childhood/>. Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) 2012. (accessed July 1, 2012).
2. <http://accis.iarc.fr/results/index.php>. Automated Childhood Cancer Information System (ACCIS) 2012. (accessed July 1, 2012).
3. Parkin DM, Stiller CA, Draper GJ, Bieber CA. The international incidence of childhood cancer. *Int J Cancer*. 1988;42:511-20.
4. Parkin DM. Epidemiology of cancer: global patterns and trends. *Toxicol Lett*. 1998;102-103:227-34.
5. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>. Instituto Nacional do Câncer, Brazil (INCA) 2012.
6. Monsalve J, Kapur J, Malkin D, Babyn PS. Imaging of cancer predisposition syndromes in children. *Radiographics*. 2011;31:263-80.
7. Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst*. 1969;43:1365-73.

8. 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.
9. 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.
10. 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.
11. Lalloo F, Varley J, Moran A, Ellis D, O'dair L, Pharoah P, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur J Cancer*. 2006;42:1143-50.
12. Li FP, Fraumeni JF. Prospective study of a family cancer syndrome. *JAMA*. 1982;247:2692-4.
13. 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.
14. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv*. 1995;25:101-24.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. 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 e10.

19. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004;23:6445-70.
20. Varley J. TP53, hChk2, and the Li-Fraumeni syndrome. *Methods Mol Biol*. 2003;222:117-29.
21. Strong LC. General keynote: hereditary cancer: lessons from Li-Fraumeni syndrome. *Gynecol Oncol*. 2003;88:S4-7; discussion S11-3.
22. Gonzalez KD, Noltner KA, 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.
23. Evans DG, Birch JM, Thorneycroft M, McGown G, Laloo F, Varley JM. Low rate of TP53 germline mutations in breast cancer/sarcoma families not fulfilling classical criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*. 2002;39:941-4.
24. Varley JM, McGown G, Thorneycroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res*. 1997;57:3245-52.
25. 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.
26. 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.
27. 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.
28. Achatz MI, 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.
29. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, 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.

30. 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.

31. 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.

32. 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.

33. Waldmann J, Patsalis N, Fendrich V, Langer P, Saeger W, Chaloupka B, et al. Clinical impact of TP53 alterations in adrenocortical carcinomas. *Langenbecks Arch Surg.* 2012;397:209-16.

34. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M, Willenberg HS, Quinkler M, Reisch N, et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97:E476-85.

35. 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.

36. Piovezan GC. Prevalência do alelo R337H no Estado do Paraná. Masters degree dissertation. Universidade Federal do Paraná; 2006.

37. http://www-p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf. International Agency for Research on Cancer (IARC) Protocols, 2012 (accessed July 1, 2012)

38. Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, Brugières L, Berthet P, Bressac-de Paillerets B, et al. [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. *Bull Cancer.* 2001;88:581-7.

39. Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet.* 2008;45:535-8.
40. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science.* 1991;254:1138-46.
41. Ponder BA. Cancer genetics. *Nature.* 2001;411:336-41.

Table 1. Clinical characteristics of the children with cancer included in the study (n = 292).

Feature	N	%	Age of patient at cancer diagnosis Years, median (range)
Sex			
Male	170	58.2	6.0 (0.16- 17)
Female	122	41.8	6.5 (0.16-18)
Cancer diagnoses			
Adrenocortical carcinoma	11	3.8	2.0 (0.33-17)
Sarcoma	81	27.7	9.0 (0.25-18)
<i>Osteosarcoma</i>	21	7.2	12.0 (1-16)
<i>Rhabdomyosarcoma</i>	29	9.9	4.0 (0.91-17)
<i>Other sarcomas</i> ¹	31	10.6	9.0 (0.25-18)
Central nervous system	66	22.6	6.0 (0-17)
<i>Choroid plexus carcinoma</i>	2	0.7	1.0 (0)
<i>Astrocytoma</i>	17	5.8	6.0 (0.16-12)
<i>Medulloblastoma</i>	20	6.8	6.0 (1-15)
<i>Other CNS tumors</i> ²	27	9.3	6.5 (0-17)
Leukemia ³	77	26.4	6.0 (1-17)
Germ cell tumors ⁴	15	5.1	5.0 (0.5-17)
Wilms' tumor ⁵	34	11.6	3.0 (0.4-16)
Multiple primary tumors ⁶	8	2.7	5.0 (0.16-13) and 15.5 (11-22)
Family history of cancer (n=285)⁷			
1st or 2nd degree relative, any cancer	145	50.7	8.0 (0.25-18)
1st or 2nd degree relative, breast cancer	33	11.5	8.0 (0.25-16)
Relative(s) with cancer < 45 years	105	38.6	40 (19-45)
Relative(s) with cancer < 18 years	29	9.9	11 (0.5-18)
Family history criteria for LFS/LFL (n=285)⁷			
Absent	213	74.7	5 (0-18)
Present (at least one)*	72	25.3	7.5 (0.25-17)
Chompret**	34	11.9	8.5 (0.33-17)
Chompret Modified**	41	14.4	8.0 (0.33-17)
Birch	13	4.6	8.0 (1-16)
Eeles 2	1	0.3	16 (0)
Eeles 1***	62	21.7	6.0 (0.25-17)

Legend: N=number of patients; SD= standard deviation; CNS= central nervous system; LFS= Li Fraumeni Syndrome; LFL= Li Fraumeni-Like Syndrome; NA= not applicable.

* Some families fulfill more than one LFL criterion. : **49 (16.8%) families fulfilled Chompret or Chompret Modified criteria and ***21 (7.4%) families fulfilled only Eeles 1 criteria.

(1) Other sarcomas in probands include: Ewing (n=17); synovial (n=4); primitive neuroectodermal (n=3); clear-cell (n=3); epithelioid (n=1); fibromyxoid (n=1); primary hepatic (n=1); myofibroblastic (n=1); **(2) Other CNS tumors in probands include:** craniopharyngioma (n=5); glioblastoma (n=3); optic nerve glioma (n=4), ependymoma (n=2); germinoma (n=2); pinealoblastoma (n=2); meningioma (n=1); neuroblastoma (n=1); primitive neuroectodermal (n=1); type unspecified (n=6); **(3) Leukemias in probands include:** Acute lymphocytic leukemia (ALL) (n=60); acute myelocytic leukemia (AML) (n=13); chronic myelocytic leukemia (CML) (n=4); **(4) Germ cell tumors in probands include:** nongerminomatous - endodermal sinus tumor (n=5); mature teratoma (n=3); choriocarcinoma (n=1); cystic teratoma (n=1); teratoma with malignant transformation (n=1). Germinomatous - ovarian dysgerminoma (n=1). Mixed germ cell tumor - sex cord and stromal (n=1); Mixed germ cell tumor - mature teratoma, embryonic carcinoma and endodermal sinus tumor (n=1); Mature teratoma and choriocarcinoma (n=1); **(5) Wilms' tumor:** 1 case with bilateral Wilms' tumor; **(6) Multiple tumors:** Median ages refer to age at diagnosis of the first and second primary tumors. Diagnoses include, in temporal order of diagnosis: ALL and colorectal cancer; ependymoma and Burkitt lymphoma; Ewing's sarcoma and Hodgkin's lymphoma; osteosarcoma and retinoblastoma; pleomorphic undifferentiated sarcoma and retinoblastoma; rhabdomyosarcoma and bilateral retinoblastoma; testicular germ cell tumor and astrocytoma; Schwannoma extramedullary and Wilms' tumor; **(7) Four probands were adopted and cancer family history was unavailable; biological parents of three probands were unable to inform their cancer family history;**

Table 2. Features of germline *TP53* mutation carriers identified in this study.

Pedigree	Sex	Mutation	Cancer diagnosis ¹	Age (ys)	Stage	LOH in tumor	p53 in tumor (%) ²	Treatment ³	Metastatic disease/Recurrence	Follow-up	
										Years	Outcome ⁵
1	M	p.R337H	Choroid plexus carcinoma	1	III	NA	NA	S/CT/BMT	M/R	1	D
2	M	p.R337H	Choroid plexus carcinoma	1	III	NA	NA	S/CT	-	11	A
3	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	0.50	IV	Yes	20	S/CT	M	7	A
4	M	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	1	I	Yes	40	S	-	2	A
5	M	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	17	III	NA	0	CT	M	1	D
6	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	1	III	Yes	40	S/CT	-	5	A
7	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	0.33	I	Yes	40	S	-	4	A
8	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	11	IV	Yes	70	S/CT	M	2	D
9	M	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	2	I	Yes	30	S	-	6	A
10	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	1	I	Yes	30	S	-	8	A
NA	F	p.R337H	Adrenocortical carcinoma	5	III	Yes	0	S/CT	M/R	1	D
11	F	p.G245S	Medulloblastoma	10	IV	NA	90	S/CT/RT	M/R	3.3	D

Legend: Sex- F: female; M: male; LOH: loss of heterozygosity ; NA: not available; ¹ Adrenocortical carcinoma presenting symptoms: C: Cushing syndrome; V: virilization; ² p53 expression by immunohistochemistry, results are given as % positivity; ³ Treatment: S: surgery, CT: chemotherapy; RT: radiotherapy; BMT: bone marrow transplantation; ⁴ Months after initial diagnosis; ⁵ Outcome: A: alive; D: deceased as of June 30th, 2012;

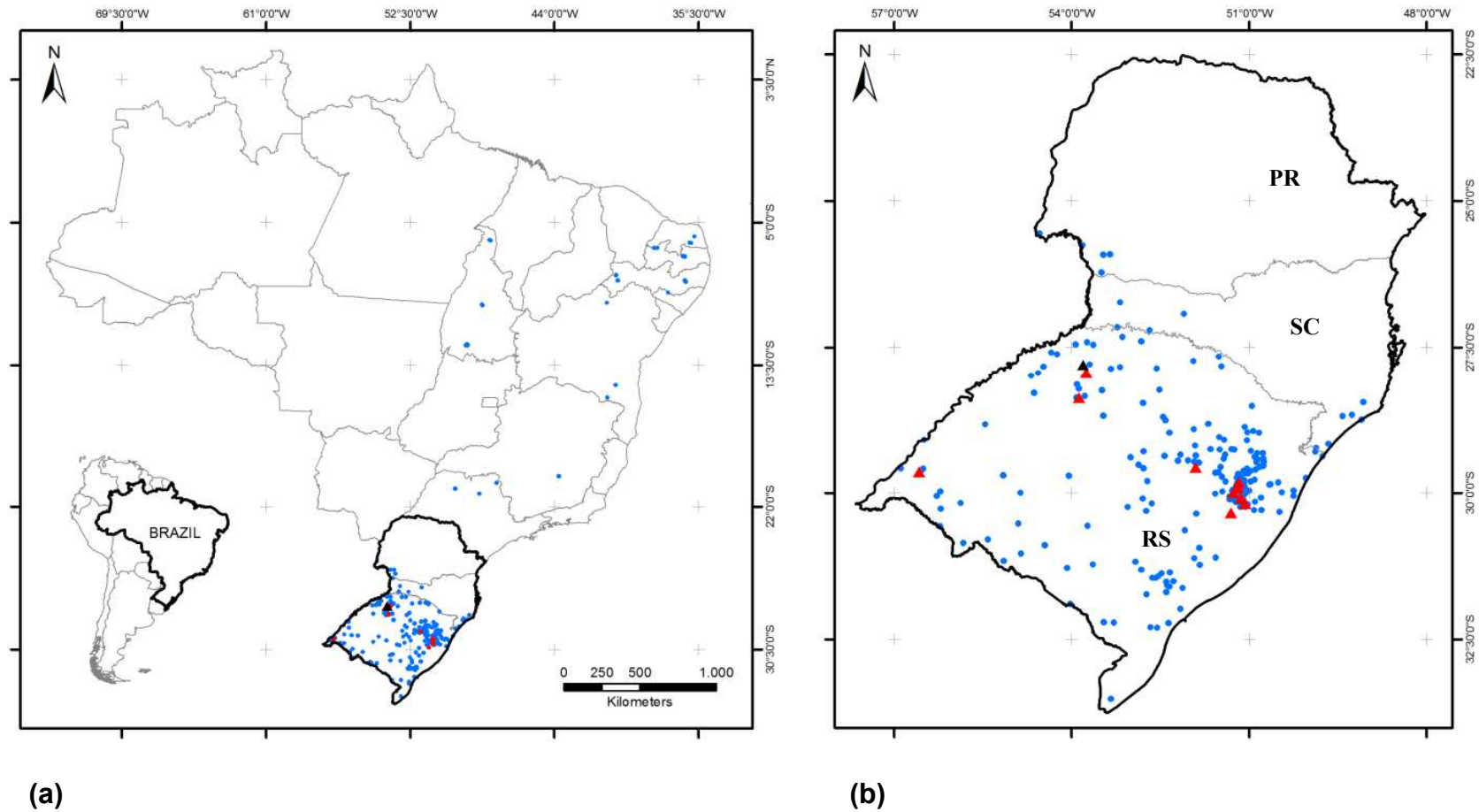
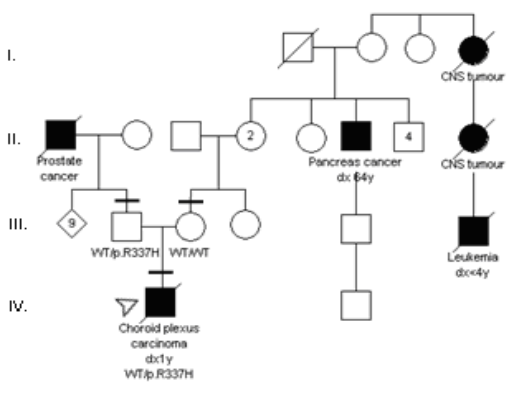


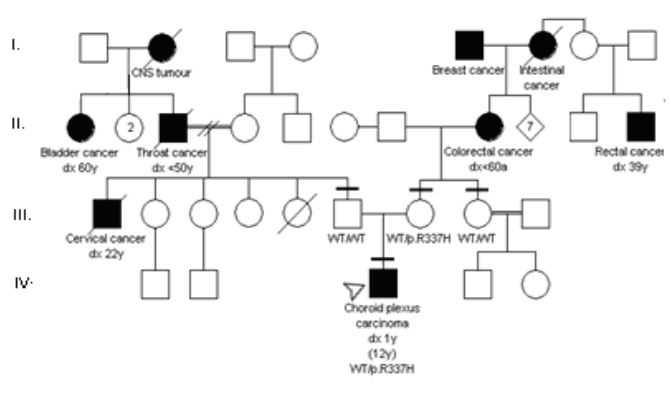
Figure 1 – Place of birth of cancer-affected children included in the study (n=292).

Legend: Black and red triangles and blue circles represent the city of birth of the homozygous mutant, heterozygous and homozygous normal individuals, respectively. (A) Distribution in the Brazilian territory (B) Detail of distribution of patients originating in the Southern Region, including the States of Rio Grande do Sul (RS), Santa Catarina (SC) and Paraná (PR);

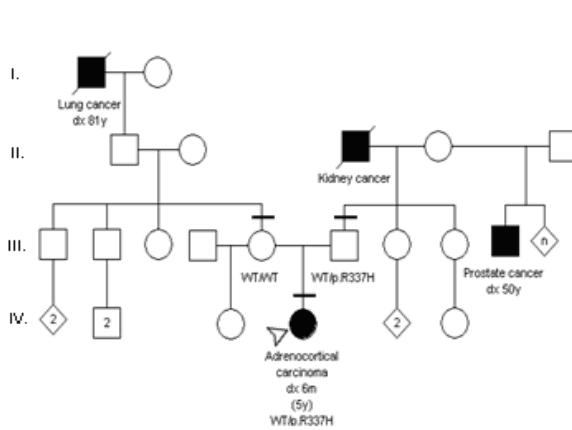
Pedigree 1



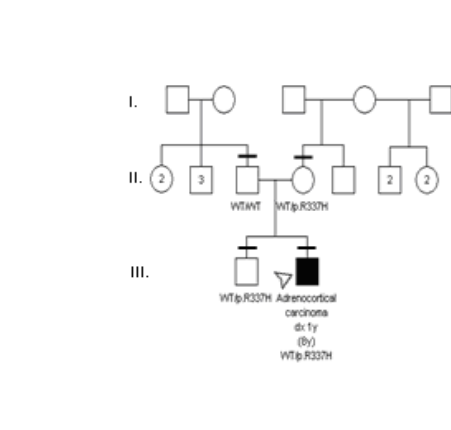
Pedigree 2



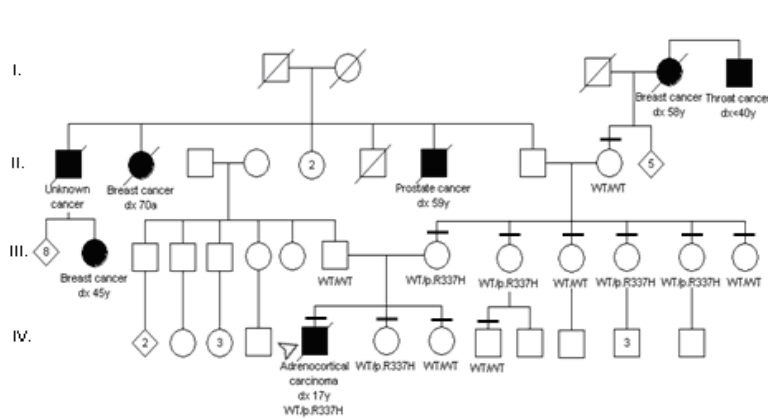
Pedigree 3



Pedigree 4



Pedigree 5



Pedigree 6

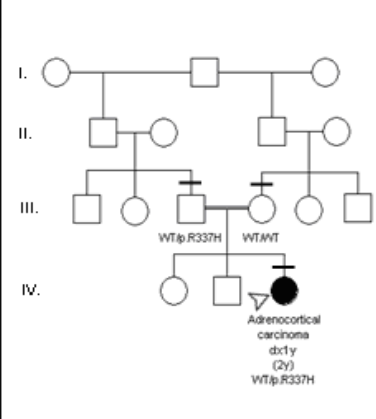
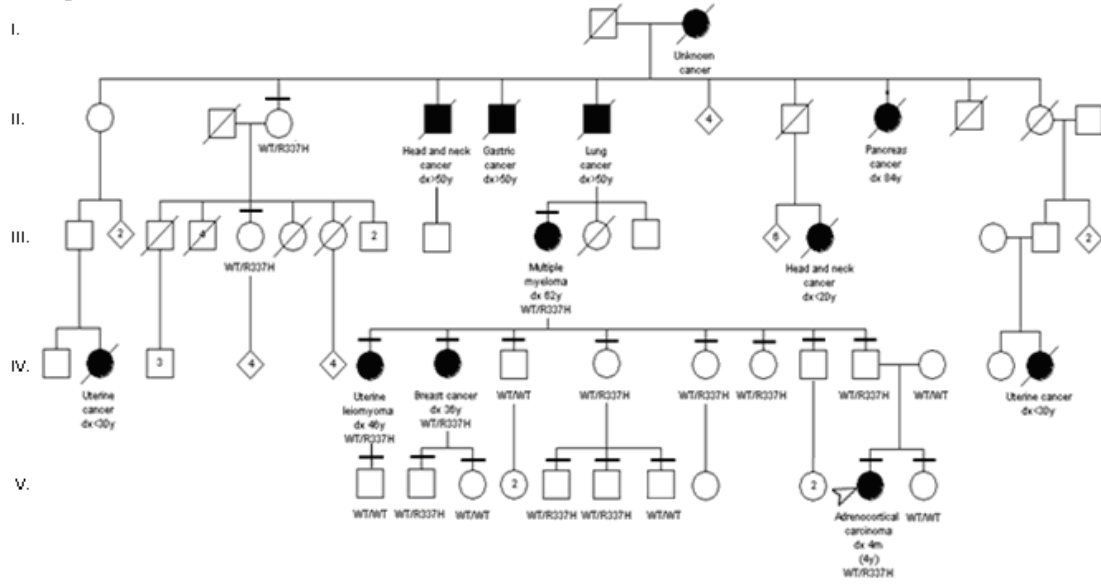


Figure 2– Pedigrees and genotyping results of mutation-positive probands.

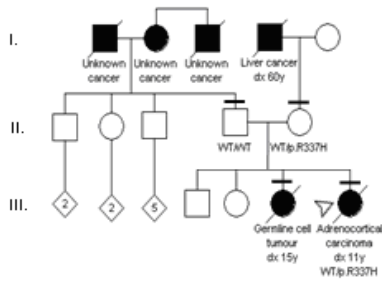
Legend: Genotypes for the proband and close relatives tested in each family are provided below each individual. Cancer-affected relatives are shown in blackened symbols. Arrow indicates proband. Dx: age at diagnosis; WT: wild-type. Genotype results are given for each individual tested;

(figure 2, continuation)

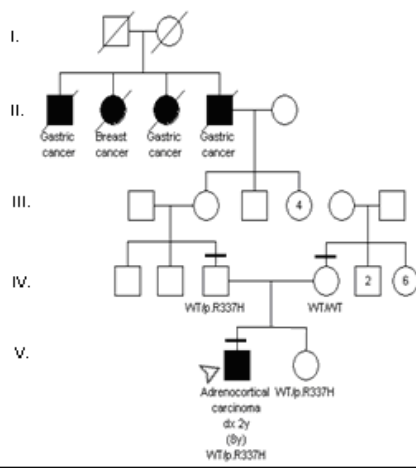
Pedigree 7



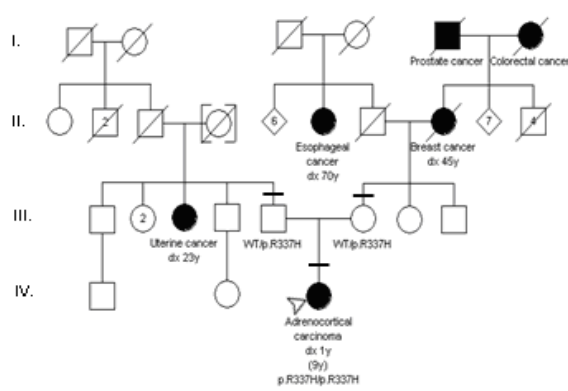
Pedigree 8



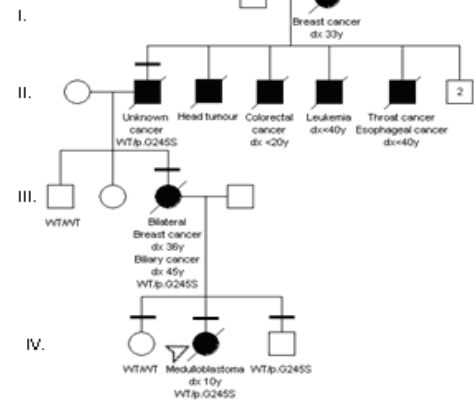
Pedigree 9



Pedigree 10



Pedigree 11



Observation: Pedigree of one of the probands with adrenocortical carcinoma is not shown.

6.4. *TP53* p.R337H is a conditional cancer predisposing mutation: further evidence from a homozygous patient.

Juliana Giacomazzi^{1,2}, Simone Selistre^{2,3}, Juliana Duarte⁴, Jorge Pinto Ribeiro^{5,6}, Paulo JC Vieira⁵, Gabriel de Souza Macedo^{1,6}, Cristina Rossi^{1,7}, Mauro Czepielewski^{8,9}, Cristina Brinkmann Oliveira Netto¹⁰, Pierre Hainaut¹¹, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,6,10*}.

1. Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Brazil; 2. Post-Graduate Program in Medicine: Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 3. Pediatric Oncology Service, HCPA, Brazil; 4. Radiology Service, HCPA, Brazil; 5. Exercise Pathophysiology Research Laboratory and Cardiology Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre; Porto Alegre, Brazil; 6. Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 7. School of Medicine, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil; 8. Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; 9. Service of Endocrinology, HCPA, Brazil; 10. Service of Medical Genetics, HCPA, Brazil; 11. International Prevention Research Institute, Lyon, France.

ABSTRACT

BACKGROUND: Adrenocortical carcinomas (ACC) are among the most common childhood cancers occurring in infants affected with the Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-Like (LFS/LFL) syndromes, caused by dominant germline mutations in the *TP53* gene. In Brazil, a particular mutation, occurring in the tetramerization domain of the gene, p.R337H, is exceedingly common due to a founder effect and is strongly associated with ACC. In this report, we describe the phenotype and long-term clinical follow-up of a female child diagnosed with ACC and homozygous for the *TP53* p.R337H founder mutation. **CASE PRESENTATION:** At age 11 months, the patient was diagnosed with a virilizing anaplastic adrenal cortical tumor, which was completely excised without violation of the adrenal capsule. Family history was consistent with an LFL tumor pattern and genotyping identified the *TP53* p.R337H mutation in both alleles in genomic DNA from lymphocytes and fibroblasts as well as in tumor DNA. Haplotypic analysis confirmed occurrence of the mutation on the same

founder haplotype previously described in other Brazilian patients. No other germline or somatic *TP53* mutations or rearrangements were identified. At age 9 years, the child was asymptomatic and had no evidence of endocrine derangements. Full body and brain magnetic resonance imaging (MRI) failed to detect any suspicious proliferative lesions and cardiopulmonary exercise testing results were within the normal reference for age, ruling against a major exercise capacity deficiency. **CONCLUSION:** This is the first clinical and aerobic functional capacity documentation of a patient who carries two mutant *TP53* alleles and no wild-type allele. Our results support that *TP53* p.R337H, the most common *TP53* mutation ever described in any population, is a conditional mutant. Furthermore, our observations over a long period of clinical follow-up, suggest that p.R337H homozygotes do not have a more severe disease phenotype than heterozygote carriers of the same mutation. Patients with the homozygous p.R337H genotype will require careful surveillance for lifetime cancer risk and for later life effects on metabolic capacity.

(*) **Corresponding author:** Patricia Ashton-Prolla. Departamento de Genética, UFRGS e Serviço de Genética Médica e Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos, 2350, 90035-903 Porto Alegre, RS, Brazil. Fax: +55-51-3359-8010. e-mail: pprolla@hcpa.ufrgs.br

BACKGROUND

Li-Fraumeni syndrome (LFS; OMIM# 151623) is an autosomal dominant disorder of predisposition to multiple, early-onset cancers that are difficult to treat and often lethal. The most common childhood and adolescent cancers occurring in the classical form of the syndrome are soft-tissue sarcomas and osteosarcomas. Leukemia and brain tumors, including choroid plexus carcinoma also occur throughout childhood and young adulthood, whereas adrenal cortical carcinomas (ACC) occur primarily in infancy. In young adults, breast cancer is the most common malignancy. Other tumors observed in LFS patients include colorectal, lung, gastric, pancreatic and prostate cancers, as well as melanoma and lymphoma [1-3]. Variant forms of the disease, observed in families with tumors of the LFS spectrum, which

resemble but do not meeting the strict criteria for LFS syndrome, have been collectively named Li-Fraumeni-like (LFL) syndrome [4, 5].

The only known genetic defect in LFS and LFL is inheritance of a mutation in the tumor suppressor gene *TP53* [6, 7]. Mutations occur in up to 80% of the classical forms of LFS. *TP53* encodes a 53 kD nuclear phosphoprotein, p53, that acts as a growth suppressor transcription factor which is inactivated by somatic mutation in many forms of cancer. The most frequent *TP53* germline mutations are missense substitutions that cluster in highly conserved regions of the DNA-binding domain of the protein (codons 125-300), with hotspots at highly mutable CpG motifs that are also targeted by somatic mutation in sporadic cancers. In Brazil, a particular mutation has been reported in a significant proportion of the LFS families presenting germline *TP53* mutations. This mutation, p.R337H (c.1010 G>A, genomic nucleotide number 16901; CGC to CAC at codon 337) occurs in exon 10 and was initially identified in Brazilian children with ACC and no documented familial history of other cancers [8, 9]. The arginine residue at codon 337 is part of an alpha-helix motif involved in p53 oligomerization. Structural studies on the p53 oligomerization domain have shown that replacement of arginine by histidine disrupts oligomerization in a pH-dependent manner, making the domain unable to oligomerize only in conditions of slightly elevated pH [10, 11]. Although biological dependence upon pH has not been demonstrated so far, it is plausible that the p.R337H mutant protein operates as conditional mutant that loses its function only in cells that undergo a small increase in intracellular pH. This may be the case in cells undergoing programmed cell death during developmental tissue remodeling such as in the peri-natal adrenal cortex.

Subsequent to initial studies in childhood ACC, studies in families with LFS traits have shown that the mutation predisposes to a wide range of cancers. Similar to canonical forms of LFS, the most common cancers in p.R337H carriers are premenopausal breast cancer and sarcoma before age 45 years [12-14]. The penetrance of the disease in p.R337H carriers is however significantly lower than in carriers of germline *TP53* mutations occurring in the DNA binding domain. *TP53* haplotyping of 12 apparently unrelated p.R337H-positive families showed that the mutation occurs on the same allele, demonstrating a founder effect [14, 15].

Population-based studies indicate that the carrier rate in Southern and Southeastern Brazil is of about 0,3% [5, 16]. Assuming Hardy-Weinberg equilibrium,

this relatively high carrier prevalence would predict that mutant homozygotes (having inherited the one mutant allele from each parent) may occur with a frequency of about 1 in every 455.000 live births.

Studies in *TP53*-deficient mice have shown a reduced exercise capacity associated with lower mitochondrial density in skeletal muscle [17-19]. *TP53*-deficient mice did not respond to a 5-week aerobic training protocol, indicating that p53 is required to complete the adaptive changes in aerobic metabolism that are necessary to increase exercise capacity in response to training [18]. However, no information is currently available on the impact of *TP53* deficiency on exercise capacity of patients with germline *TP53* mutations. Here we report the diagnosis, follow-up and monitoring of exercise capacity in a young patient homozygote for the germline *TP53* p.R337H mutation.

CASE PRESENTATION

A previously healthy female child of European (Portuguese and Spanish) descent was referred to the pediatrician at 11 months of age with a history of increased appetite, significant weight gain in the past three months, and signs of virilization. Review of the family history revealed second- and third-degree relatives diagnosed with cancer consistent with a LFL tumor pattern. Both parents were healthy, with no personal history of cancer and were unrelated. On admission, the patient weighed 14.550 kg (higher than percentile 95) and measured 83 cm (higher than percentile 95). Blood pressure was 130/90 mmHg, and physical examination revealed a round “moonlike” face, excess facial and body hair, pubarca and clitoromegaly, facial acne, and an abdominal mass on palpation.

Laboratory evaluations showed normal serum sodium, potassium, calcium, phosphorus and creatinine. Hormonal evaluations showed very high levels of androgens (dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS) > 1000 ug/dL; nl: 2-274 ug/dL; dehydroepiandrosterone > 30 ng/ml; nl: <2,5 ng/ml, testosterone 9.61 ng/dL; nl: < 0,05 ng/dL androstenedione >10 ng/dL; nl:<0,5 ng/ml), 17-alfa-hidroxiprogesterone (8,88 ng/ml; nl: <1,0 ng/ml), progesterone (4803 pg/ml; nl: < 800 pg/ml), morning cortisol (37 ug/dl; nl: 4,3-22,4 ug/dl), midnight cortisol (32 ug/dl; nl: < 1,0 ug/dl). Urinary free cortisol was normal (80 ug/24 hs; nl: 20 – 90 ug/24 hs) and ACTH was

undetectable. Bone age was assessed by the Greulich-Pyle method and was found to be 24 months at the chronological age of 14 months (SD = 2,4 months) Abdominal computerized tomography identified a heterogeneous adrenal mass (4.5 x 3.4 x 3.0 cm), which was excised without violation of the adrenal capsule. Surgical margins were negative and histopathological examination of the tumor tissue confirmed the diagnosis of an anaplastic adrenal cortical tumor.

At the age of 6 years, the patient was recruited in a *TP53* mutation prevalence study that was offered to all patients diagnosed or treated for pediatric tumors of the LFS cancer spectrum at Hospital de Clínicas de Porto Alegre from 1998 to 2010 (IRB# 08022), and found to have a germline *TP53* mutation (p.R337H) in homozygosity (detailed genotypic analysis is described below). The patient is currently under clinical follow-up with pediatric oncology, endocrinology, and cancer genetics specialists. Ninety-six months after diagnosis of the adrenocortical carcinoma (at age 9 years), the patient appears healthy and has adequate cognitive and psychomotor development. There is currently no clinical or laboratory evidence of endocrine derangements. Up to age 8 years post-ACC diagnosis, the patient was followed by the pediatric oncology team according to the NCCN [20] guidelines. Full body and brain magnetic resonance imaging (Figure 1) and cardiopulmonary exercise testing (Table 1) were performed at age 8 years and 8 months. MRI failed to detect any suspicious proliferative lesions and results of the cardiopulmonary exercise test were within the normal reference for 9 year-old girls, ruling against a major exercise capacity deficiency in this patient. Detailed descriptions of the evaluations performed are described below.

Evaluation of functional capacity. At the age of 8 years and 8 months, the patient was submitted to maximal exercise testing on an electromagnetically braked cycle ergometer (ER-900, Ergoline, Jaeger, Würzburg, Germany) at 60 revolutions per min. She was not receiving any medication. Hormonal evaluations showed undetectable androgens and bone age corresponded to chronological age. The patient first exercised 3 min with no load and work rate was increased by 10 W per min until volitional fatigue, indicated by the inability to maintain the pedaling rate above 40 revolutions per min. Twelve-lead electrocardiogram was continuously monitored (Nihon Khoden Corp., Tokyo, Japan) and expired gases were collected breath-by-breath by a computerized gas analyzer (Oxycon Delta, VIASYS,

Healthcare GmbH, Würzburg, Germany). Peak values for oxygen uptake and respiratory exchange ratio are reported as highest 20 s mean values. The anaerobic threshold (also referred to as the first ventilatory threshold) was determined by review of the gas exchange curves as the oxygen uptake at which the ventilatory equivalent for oxygen increased systematically without an increment in the ventilatory equivalent for carbon dioxide [21]. The minute ventilation / carbon dioxide output slope was calculated with linear regression analysis using all points of the incremental exercise [21]. Before and during the exercise tests, cardiac output and stroke volume were estimated non-invasively by impedance cardiography (PhysioFlow PF07 Enduro, Manatec Biomedical, Paris, France) as previously described (Chiappa et al 2009). Arterial oxygen saturation was measured by finger oximetry (Takaoka Oxicap, São Paulo, Brazil).

Results of the cardiopulmonary exercise test, including data as percentage of predicted [22], are presented in Table 1. The test was stopped due to fatigue, with peak heart rate and peak respiratory exchange ratio compatible with maximal effort. Compared to reference values, the patient presented peak power output, peak oxygen uptake, and anaerobic threshold consistent with preserved exercise capacity (85 to 101 % of predicted). The minute ventilation / carbon dioxide output slope demonstrated normal ventilatory efficiency. Stroke volume and cardiac output increased appropriately during the incremental exercise test [23].

Genetic analyses. Genomic DNA was obtained from (a) peripheral lymphocytes and fibroblasts using the Illustra™ blood genomic Prep Mini spin Kit (GE Healthcare, Madison, WI, USA) as described by the manufacturer and from (b) formalin fixed paraffin-embedded tumor tissues using the QIAmp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). DNA from lymphocytes was screened for the *TP53* p.R337H mutation with allele-specific TaqMan® probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a MX 3000P™ qPCR System - Stratagene (Agilent Technologies Inc., Sta Clara, CA, USA) and analyzed using the Stratagene MxPro qPCR Software. Presence of mutation was confirmed by PCR-RFLP using the restriction enzyme *HhaI* [5], and by bidirectional gene sequencing of exon 10 on an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the sequencing protocol described in the *IARC TP53* database [24]. All genotyping results were confirmed in at least two independent analyses. In genomic DNA from peripheral

lymphocytes and fibroblasts as well as in DNA extracted from microdissected, formalin-fixed, paraffin-embedded ACC tissues, the only nucleotide detected at position 17588 was A (CAC at codon 337, homozygote for the mutant allele). Both father and mother were found to be heterozygous *TP53* p.R337H carriers (Figure 2). Multiplex ligand probe amplification (MLPA) to assess the presence of *TP53* gene deletions was performed in the index case using the SALSA P056 kit (MRC, Amsterdam, The Netherlands), according to the manufacturer's instructions, and no *TP53* deletion was identified. With these results a homozygous genotype at position 16901 was inferred, although uniparental disomy could not be excluded. Direct sequencing of the entire *TP53* coding region (exons 2-11) of the index case and parents did not detect other germline mutations. Allele specific-PCR (ASO PCR) for *TP53* SNP179 identified that the proband and both parents were carriers of the p.R337H Brazilian founder allele described by Garritano et al. (2010) [14]. The presence of the Brazilian founder p.R337H haplotype (A3) was verified in mutation-positive samples as previously described [14] by ASO-PCR and Nested-PCR analyzing SNP28 (rs9894946) of a panel of 29 intragenic SNPs. Since this SNP is identical in haplotypes A1 and A3, all cases were further genotyped for SNP15 (rs1642785) and SNP18 (rs1800370) by direct sequencing.

DISCUSSION

We describe a patient who is a homozygote carrier of a germline *TP53* mutation, p.R337H, having inherited the same mutant allele from both parents. The patient, currently aged 9 years, developed ACC at age 11 months and has been since under clinical follow-up for other health outcomes, including cancers of the Li-Fraumeni spectrum. At age 9 years, the patient was healthy, with normal development, normal cardiopulmonary/exercising capacity and no suspicious proliferative lesions detectable using standard whole-body MRI. Furthermore, the patient does not present any evidence of UV or radio-sensitivity, which could be interpreted as possible consequence of deficiency in p53 function.

In Western Europe, it has been estimated that germline *TP53* mutations spontaneously occur at a rate of about 1:5,000 births in Western populations [25]. About 50% of mutation carriers develop cancer by age 30. Carriage of two mutant

alleles in the classic, DNA binding domain region of the gene (either through *de novo* mutation on both alleles or through inheritance of a mutant from both paternal and maternal sides) is therefore predicted to be an extremely rare event and there is no report of such an event. In Brazil, however, the existence of a founder mutation, p.R337H, which is present in about 0.3% of the dense population of Southern and Southeastern regions of the country, make occurrence of homozygosity for germline *TP53* mutations more likely than anywhere else in the world. Prior to this report, homozygosity for p.R337H had been observed in one subject in a study of 55 Brazilian pediatric and adult patients with apparently sporadic ACC (Latronico et al, 2007). The patient, a girl diagnosed with ACC at 12 months of age and whose parents were unaffected carriers, was healthy and had not developed another cancer at age 10 years [26].

Several studies have shown that germline mutations in cancer predisposition genes may have a dose effect, resulting in a more severe phenotype in homozygotes than in heterozygotes. For example, for the *CHEK2* 1100delC variant that predisposes to breast cancer, the heterozygous state is associated with an OR of 1.5-3.0 (corresponding to a lifetime risk of 20-25%) and the homozygous state is associated with an over fourfold increase in the lifetime risk above general population [27, 28]. Furthermore, several cancer predisposing mutations in tumor suppressor genes display different phenotypes in heterozygotes and homozygotes. This is the case for mutations in the *PALB2*, *BRIP1* and *ATM* genes, for instance, where heterozygotes have an increased lifetime risk of breast cancer and homozygotes are diagnosed with multisystemic genetic syndromes (Fanconi anemia for the first 2 genes and ataxia-telangiectasia for the latter). Finally, there are situations where homozygous and heterozygous states for mutation in the same gene are each associated with different genetic syndromes, such as the Lynch (LS) and Childhood Cancer (CCS) syndromes associated with heterozygous and homozygous germline mutations in the MMR genes [29, 30].

In the present case, our observations do not support the hypothesis that inheritance of two mutant *TP53* alleles may lead to a compound phenotype with increased risk for early onset cancer. It is possible that the absence of cumulative effect is due to the particular structural properties of the p.R337H mutant protein. Based on structural analysis of a peptide encoding the oligomerization domain, it has

been shown that replacement of Arginine by Histidine at position 377 perturbs the formation of an hydrogen bond that links R377 on one p53 monomer to D352 on another p53 monomer, thus forming a dimer [10]. At pH 7, Histidine at position 377 retains the capacity to donate a H-bond. However, at pH 8, this capacity is lost, thus preventing dimerization at slightly elevated pH. In the present case, we speculate that the proteins encoded by the two mutant alleles can form dimers in neutral pH conditions, exactly in the same way as one mutant and one wild-type monomer in patients who inherit only one mutant p.R337H allele. However, upon a small pH increase, the homodimers formed by two mutant proteins would be expected to lose the hydrogen bonds given by each of the monomers.

Recent experimental studies have shown that p53 plays a critical role in controlling cell bioenergetics and, specifically, mitochondrial metabolism [19]. In the mouse, lack of p53 leads to impaired cardiorespiratory fitness and loss of aerobic competence. Mice lacking functional p53 show a decrease in maximum exercise capacity and are less responsive to the effects of training than their p53-competent counterparts [17, 18]. However, such effects have not been documented in humans so far. The results of the cardiopulmonary exercise test performed here indicate that, despite carrying two *TP53* mutant alleles, our patient has preserved functional capacity, as demonstrated by peak power output, peak oxygen uptake, and anaerobic threshold within the limits of normality [22]. Moreover, ventilatory efficiency and hemodynamic responses to exercise are also normal. If mitochondrial abnormalities were to be present in our patient, we would expect to observe an early anaerobic threshold, reduced peak oxygen uptake, and ventilatory inefficiency. Since individuals with metabolic abnormalities, such as patients with McArdle's disease, may present hyperventilation during exercise without blood lactate accumulation [31], a preserved ventilatory anaerobic threshold, as observed in our patient, may not assure normal muscle oxidative metabolism. However, normal maximal exercise capacity and normal anaerobic threshold are strong indicators of preserved muscular oxidative capacity. In healthy individuals there is a strong association between muscle respiratory capacity and the anaerobic threshold [32]. Although an influence of previous or current androgen excess on energy metabolism in this patient can not be excluded, such effect is not likely since cardiovascular function was assessed many years after normalization of the hormonal levels and with normal bone age results.

Therefore, the cardiopulmonary exercise test results in our patient indicate that, inheritance to two mutant *TP53* p.R337H alleles does not appear to affect energy metabolism in humans by the age of 10 years.

CONCLUSION

The current report is the first clinical and aerobic functional capacity documentation of a patient who carries two mutant *TP53* alleles and no wild-type allele. Our results support that *TP53* p.R337H, the most common *TP53* mutation ever described in any population, is a conditional mutant. Furthermore, our observations over a long period of clinical follow-up, do not support that p.R337H homozygotes may have a more severe disease phenotype than heterozygote carriers of the same mutation. However, the particular genetic status of these patients will require careful surveillance for lifetime cancer risk and for later life effects on metabolic capacity.

CONSENT

Written informed consent was obtained from the parents of the child for publication of this case report and accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Series Editor of this journal.

ACKNOWLEDGEMENTS AND FUNDING

The authors wish to thank Algemir Lunardi Brunetto for Institutional support, Filippo Pinto e Vairo for clinical support, Bárbara Alemar and Patrícia Santos Silva for laboratory and logistic support, Diego Paskulin and Ghyslaine Martel-Planche for their help with laboratory analyses, José Roberto Goldim, Maria Cátira Bortolini, Maria Luiza Saraiva-Pereira and Hugo Bock for stimulating discussions on this case and David Malkin for discussions about cancer screening and management in children diagnosed with Li-Fraumeni syndrome and its variants.

Financial support: The work of JG was supported by fellowships from CAPES and CNPQ (Brazil). The study was supported in part by grants from GlaxoSmithKline Oncology (Ethnic Research Initiative Grant Award 2009), U.K.; CNPq to PA-P (Grant 307779 2009-2), Brazil; FAPERGS-PPSUS (grant # 09/0103-0), FAPERGS

PRONEX (Grant #10/0051-9) and Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG # 08080), Brazil.

AUTHOR'S CONTRIBUTION

JG carried out the molecular genetic studies, participated in all of the steps of data analysis and helped to draft the manuscript. SS, MC, CR and CBON provided clinical data, were directly involved in clinical follow-up and helped to draft the manuscript. GSM participated provided laboratory support carried out fibroblast cultures and genetic studies and helped to draft the manuscript. JD carried out and interpreted the imaging studies, and helped to draft the manuscript. JPR and PJCVC carried out and interpreted the cardiovascular performance studies, and helped to draft and revise the manuscript. PH was directly involved in conception and design of the case report and critically reviewed the manuscript. PA-P was directly involved in conception and design of the case report, participated in clinical follow-up of the patient and interpretation of clinical and laboratory data, and coordinated manuscript writing. All authors read and approved the final manuscript.

REFERENCES

1. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM: **Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations.** *Oncogene* 2001, **20**(34):4621-4628.
2. Nichols NM, Matthews KS: **p53 unfolding detected by CD but not by tryptophan fluorescence.** *Biochem Biophys Res Commun* 2001, **288**(1):111-115.
3. Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S: **Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome.** *Gastroenterology* 2006, **130**(1):73-79.
4. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P: **The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users.** *Hum Mutat* 2002, **19**(6):607-614.

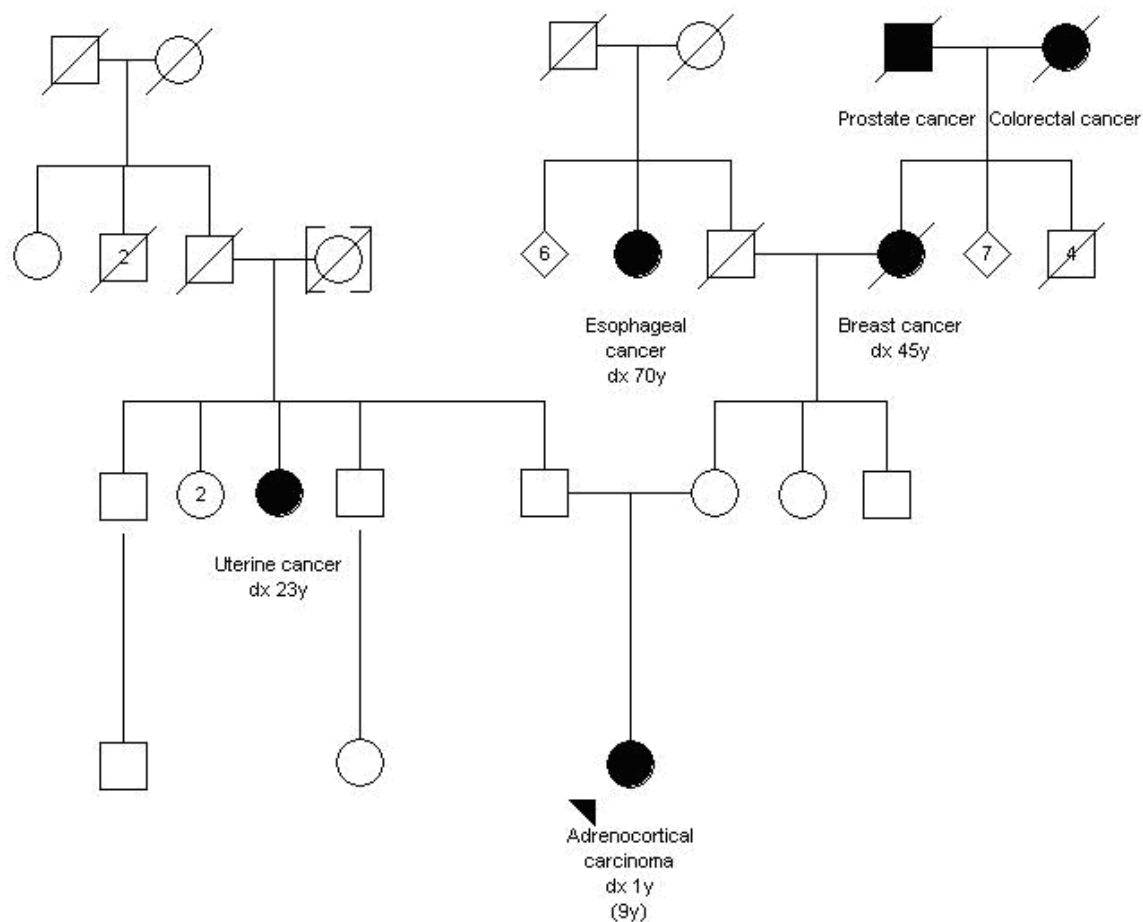
5. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP *et al*: **Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil.** *Cancer Lett* 2008, **261**(1):21-25.
6. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA: **Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms.** *Science* 1990, **250**(4985):1233-1238.
7. Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH: **Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome.** *Nature* 1990, **348**(6303):747-749.
8. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB: **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**(10):4970-4973.
9. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G *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**(16):9330-9335.
10. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW: **A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer.** *Nat Struct Biol* 2002, **9**(1):12-16.
11. Hainaut P: **Tumor-specific mutations in p53: the acid test.** *Nat Med* 2002, **8**(1):21-23.
12. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR *et al*: **The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families.** *Cancer Lett* 2007, **245**(1-2):96-102.

13. Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, Srivastava K, Shurtleff S, Pei D, Zeferino LC *et al*: **Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil.** *BMC Cancer* 2008, **8**:357.
14. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P *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**(2):143-150.
15. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC: **Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors.** *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004, **48**(5):647-650.
16. **Piovezan GC. Prevalência do alelo R337H no Estado do Paraná. Masters degree dissertation. Universidade Federal do Paraná.; 2006.**
17. Matoba S, Kang JG, Patino WD, Wragg A, Boehm M, Gavriloova O, Hurley PJ, Bunz F, Hwang PM: **p53 regulates mitochondrial respiration.** *Science* 2006, **312**(5780):1650-1653.
18. Park JY, Wang PY, Matsumoto T, Sung HJ, Ma W, Choi JW, Anderson SA, Leary SC, Balaban RS, Kang JG *et al*: **p53 improves aerobic exercise capacity and augments skeletal muscle mitochondrial DNA content.** *Circ Res* 2009, **105**(7):705-712, 711 p following 712.
19. Wang PY, Zhuang J, Hwang PM: **p53: exercise capacity and metabolism.** *Curr Opin Oncol* 2012, **24**(1):76-82.
20. **National Comprehensive Cancer Network (NCCN) Guidelines guidelines; 2012. Available from URL: (http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/f_guidelines.asp#genetics_screening).**
21. **American Thoracic Society and American College of Chest**

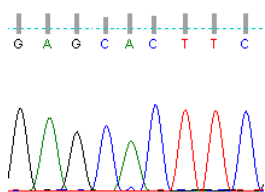
- 7Physicians; 2003. Available from URL:**
www.thoracic.org/statements/resources/pfet/cardioexercise.pdf
22. Ten Harkel AD, Takken T, Van Osch-Gevers M, Helbing WA: **Normal values for cardiopulmonary exercise testing in children.** *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2011, **18**(1):48-54.
 23. Welsman J, Bywater K, Farr C, Welford D, Armstrong N: **Reliability of peak VO(2) and maximal cardiac output assessed using thoracic bioimpedance in children.** *Eur J Appl Physiol* 2005, **94**(3):228-234.
 24. **International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 database; 2012. Available from URL: www-p53.iarc.fr/p53sequencing.html.**
 25. Lalloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, Evans DG, Group EOBCS: **Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history.** *Lancet* 2003, **361**(9363):1101-1102.
 26. Latronico and Fragoso pc, 2011. In.
 27. Weischer M, Bojesen SE, Ellervik C, Tybjaerg-Hansen A, Nordestgaard BG: **CHEK2*1100delC genotyping for clinical assessment of breast cancer risk: meta-analyses of 26,000 patient cases and 27,000 controls.** *J Clin Oncol* 2008, **26**(4):542-548.
 28. Adank MA, Jonker MA, Kluijt I, van Mil SE, Oldenburg RA, Mooi WJ, Hogervorst FB, van den Ouweland AM, Gille JJ, Schmidt MK *et al*: **CHEK2*1100delC homozygosity is associated with a high breast cancer risk in women.** *J Med Genet* 2011, **48**(12):860-863.
 29. Krüger S, Kinzel M, Walldorf C, Gottschling S, Bier A, Tinschert S, von Stackelberg A, Henn W, Görgens H, Boue S *et al*: **Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1.** *Eur J Hum Genet* 2008, **16**(1):62-72.
 30. Toledano H, Goldberg Y, Kedar-Barnes I, Baris H, Porat RM, Shochat C, Bercovich D, Pikarsky E, Lerer I, Yaniv I *et al*: **Homozygosity of MSH2 c.1906G-->C germline mutation is associated with childhood colon**

- cancer, astrocytoma and signs of Neurofibromatosis type I.** *Fam Cancer* 2009, **8**(3):187-194.
31. Hagberg JM, Coyle EF, Carroll JE, Miller JM, Martin WH, Brooke MH: **Exercise hyperventilation in patients with McArdle's disease.** *J Appl Physiol* 1982, **52**(4):991-994.
32. Ivy JL, Withers RT, Van Handel PJ, Elger DH, Costill DL: **Muscle respiratory capacity and fiber type as determinants of the lactate threshold.** *J Appl Physiol* 1980, **48**(3):523-527.
33. Ording Müller LS, Avenarius D, Olsen OE: **High signal in bone marrow at diffusion-weighted imaging with body background suppression (DWIBS) in healthy children.** *Pediatr Radiol* 2011, **41**(2):221-226.

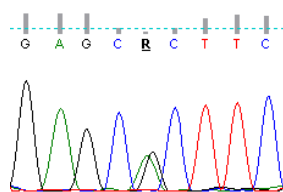
(a)



(b)



(c)



(d)

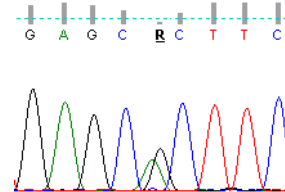


Figure 1. (a) Pedigree of the homozygous p.R337H/p.R337H patient. Cancer-affected relatives are shown in blackened symbols. *TP53* Exon 10 sequencing results from the proband (b) and parents (c, d) are depicted showing homozygosity for the A allele at genomic nucleotide number 16901 in the proband and heterozygosity at the same position in both parents.

Legend: Arrow indicates proband; current age is indicated in parenthesis. Dx: age at diagnosis; WT: wild-type.

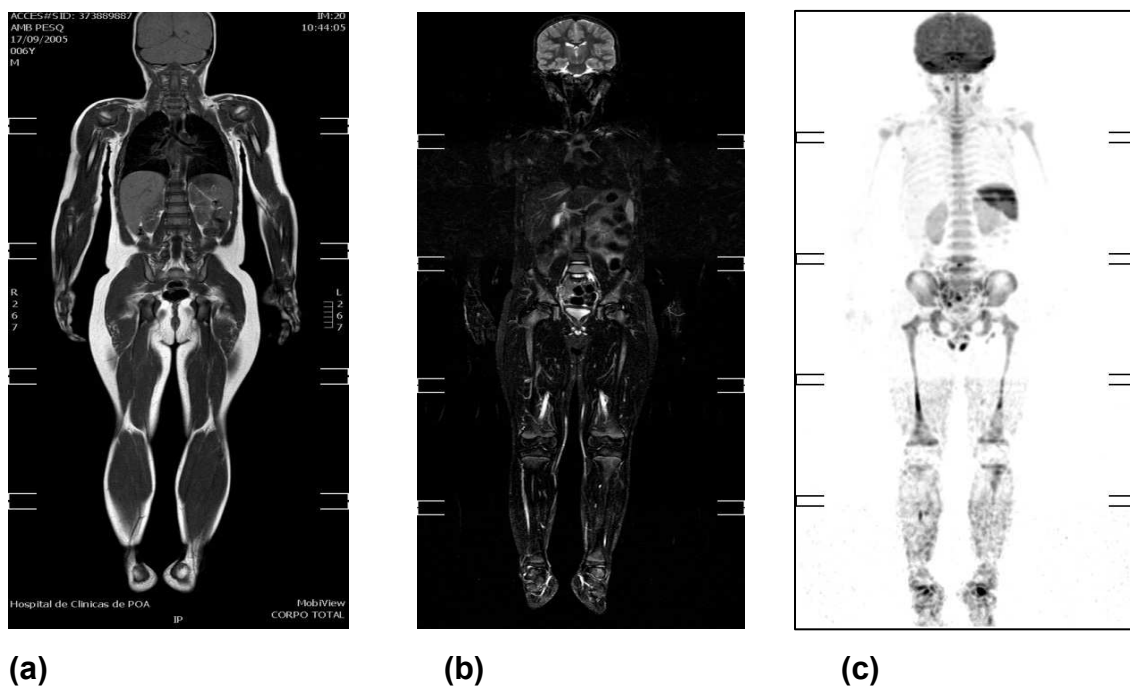


Figure 2. Whole body magnetic resonance imaging of the *TP53* p.R337H homozygous patient. (a) Coronal plane T1 Turbo Spin Echo (TSE) weighted image (b) coronal plane Turbo Short TI Inversion Recovery (STIR) image and (c) coronal plane performed after diffusion-weighted imaging (DWI) on axial plane with further maximum intensity projection (MIP) reconstruction.

Imaging: Brain and whole body magnetic resonance imaging studies were done using a 1.5 Philips Achieva (Philips Healthcare, Latham, NY, USA) series scanner following the protocols described in Laffan et al. (2004) and Villani et al. (2011), with modifications. The diffusion-weighted imaging with body background suppression protocol using free-breathing technique as described by Takahara et al (2004) was applied. In brief, T1 Turbo Spin Echo (T1 TSE) weighted images (T1) and Short TI Inversion Recovery (STIR) were performed on the coronal plane, and diffusion-weighted imaging (DWI) was done on the axial plane with further maximum intensity projection (MIP) reconstruction on the coronal plane. We used the body coil and asked for breath holding for the thorax and abdomen image acquisitions. Restricted diffusion was observed in the area corresponding to the bone marrow of the lower limbs but followed the expected pattern for age, as described previously [33].

Table 1 –Anthropometric data and results of the cardiopulmonary exercise test for the p.R337H homozygous patient at the age of 8 years and 8 months.

Variable	Measured	Percentage of predicted*
Weight (kg and %)	37.5	114
Height (cm and %)	144.5	105
Body mass index (kg/cm ² and %)	17.9	96
Peak power output (W and %)	80	101
Peak heart rate (bpm and %)	164	88
Peak VO ₂ (mL/kg.min and %)	35.9	85
V _E / VCO ₂ slope (ratio and %)	25.2	78
Peak respiratory exchange ratio (ratio and %)	1.11	97
Peak O ₂ saturation (%)	98	NA
Anaerobic threshold (mL/kg.min and %)	24.9	96
Peak stroke volume (ml/min)	46	NA
Peak cardiac output (L/min)	7.62	NA

Legend: *Predicted values for girls on the cycle ergometer, according to Ten Harkel et al. (2011); NA: reference value not available; bpm: beats per minute; VO₂: oxygen uptake, V_E: minute ventilation; VCO₂: carbon dioxide production.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E CONCLUSÃO

As considerações finais serão apresentadas separadas por grupo, de acordo com os resultados obtidos a partir dos objetivos propostos originalmente.

7.1 Com relação ao grupo 1, subgrupo 1A, mulheres com câncer de mama, preenchendo critérios para síndromes de predisposição hereditária ao câncer, exceto para SLF/LFL:

Foram incluídas 59 mulheres, sendo que 5 apresentavam critérios para Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário (HBOC) e para a Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Cólon (HBCC) e 54 apresentavam critérios somente para HBOC. Análise de *TP53* p.R337H revelou a presença de 2 portadoras da mutação, com idades ao diagnóstico da doença aos 31 e 57 anos, ambas com história familiar exclusivamente para HBOC no momento do recrutamento. No entanto, a segunda família teve um recente diagnóstico de carcinoma adrenocortical em um familiar de 2º grau da probanda, passando a preencher critérios clínicos para LFL. Análise do haplótipo fundador, que foi possível apenas na portadora da mutação diagnosticada com 57 anos evidenciou sua presença.

Estes achados enfatizam que a mutação *TP53* p.R337H: (1) está presente em mulheres com câncer de mama mesmo sem história de SLF/LFL, que a rigor não seriam testadas para mutações no gene *TP53*; (2) é observada tanto em casos de câncer de mama diagnosticados com idade ≤ 45 anos (seguindo padrão de outras mutações em *TP53*) como em casos com diagnóstico mais tardio (≥ 45 anos); (c) ocorre em um mesmo haplótipo fundador já evidenciado em portadores da mutação descrito em estudos prévios.

7.2 Com relação ao grupo 1, subgrupo 1B, mulheres com câncer de mama não selecionadas para história familiar da doença diagnosticadas com idades ≤ 45 anos e ≥ 55 anos:

Foram incluídas 815 mulheres (403 casos com idade ≤ 45 anos e 412 casos com idade ≥ 55 anos) recrutadas a partir de 3 laboratórios de patologia e provenientes de 25 diferentes estados do Brasil. A mutação *TP53* p.R377H foi encontrada na linhagem germinativa de 8,6% (70/815). Duas das 70 portadoras apresentavam a mutação em homozigose. A alteração foi observada em maior frequência nas mulheres com diagnóstico de câncer de mama em idade ≤ 45 anos (n=49; 12,1%) – sendo encontrada em 20% (8/40) dos casos com diagnóstico de câncer de mama com idade ≤ 30 anos, e em menor frequência nas com diagnóstico em idade ≥ 55 anos (n=21; 5,1%).

A alteração foi encontrada na frequência total (independente da idade) em: 21,0%, 5,8%, e 1,0% nos casos provenientes dos serviços de patologia das cidades de São Paulo, Porto Alegre e Barretos, respectivamente. Estratificando as portadoras de acordo com o estado de origem observa-se: 14/220 eram provenientes de estados da região Sul, 1/61 da região Centro-Oeste, 34/321 da região Sudeste, 1/8 da região Norte e 3/44 da região Nordeste. O haplótipo fundador brasileiro foi encontrado em todas as mulheres analisadas (n=22), incluindo 3 casos provenientes das regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste, regiões até então não associadas à ocorrência da mutação. Análise do tecido tumoral de 15 portadores evidenciou perda de heterozigosidade em apenas 2 casos. Análise comparativa dos resultados de imunohistoquímica dos receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e HER2 evidenciou diferença destes marcadores entre os centros. Não houve diferença significativa na distribuição do perfil de expressão de RE e RP entre portadoras e não portadoras da mutação p.R337H. Também não houve diferença na distribuição de casos triplo-negativos entre portadoras e não-portadoras. Análise do ponto de vista biológico, observando presença ou ausência de alguma expressão de HER2 entre portadoras e não portadoras da mutação, evidenciou que tumores de

portadoras mais freqüentemente têm alguma expressão de HER2 (1+, 2+ ou 3+) do que não-portadoras.

Estes achados enfatizam que a mutação germinativa estudada está presente em uma parcela significativa dos casos de câncer de mama diagnosticado em diferentes idades na amostra estudada proveniente de diversas regiões do país, e não só das regiões Sul e Sudeste, conforme evidenciado em estudos anteriores. O fato do haplótipo fundador ter sido encontrado em todos os portadores testados, sugere que a maioria, senão todos os portadores no país se relacionam a efeito fundador, conforme comentado no item 7.1. Por fim, a baixa frequência de perda de heterozigosidade e associação de p.R337H com alguma expressão de HER2 nos tumores de mama de portadoras, tanto na amostra total quanto na amostra estratificada de acordo com idades ao diagnóstico da doença, merece maior investigação e sugere que a mutação possa estar associada a um mecanismo particular de carcinogênese mamária.

7.3 Com relação ao grupo 2, mulheres com tumores *phyllodes* da mama, diagnosticados em diferentes idades e não selecionadas para história familiar da doença:

Foram incluídas 148 mulheres com tumores *phyllodes* da mama (128 benignos, 7 borderline e 13 malignos) recrutadas a partir de 8 laboratórios de patologia das cidades de Porto Alegre e Barretos. As idades médias ao diagnóstico dos tumores entre os casos benignos, borderline e malignos apresentaram diferença estatisticamente significativas (39 anos, 52 anos e 57 anos, respectivamente). A mutação *TP53* p.R337H foi encontrada em 8 (5.4%) casos, tendo sido observada em maior frequência entre os tumores malignos (3/13; 23%) quando comparada aos benignos (5/128; 3,4%). Analisando as idades ao diagnóstico entre as portadoras e as não portadoras não se observou diferença nos grupos como um todo. No entanto, subdividindo de acordo com a classificação tumoral observou-se uma diferença próxima a significância estatística entre os casos com tumores *phyllodes* benignos,

sendo a idade ao diagnóstico do tumor mais precoce entre as portadoras da mutação. O haplótipo fundador foi evidenciado em duas portadoras analisadas.

Estes achados indicam associação entre a mutação *TP53* p.R337H e tumores *phyllodes* da mama, especialmente os malignos confirmando a hipótese prévia de associação de mutações germinativas no gene *TP53*, proposta em estudos anteriores, com tumores *phyllodes* da mama.

7.4. Com relação ao grupo 3, crianças diagnosticadas com tumores do espectro da SLF/LFL e não selecionadas para história familiar da doença:

Foram incluídas 292 crianças diagnosticadas com: sarcomas (n=81), leucemias (n=77), tumores de sistema nervoso central (n=66), de Wilms (n=34), de células germinativas (n=15) e carcinoma adrenocortical (n=11). Este grupo corresponde a 40.7% de todas as crianças diagnosticadas com estes tipos de tumores e atendidas no Serviço de Oncologia Pediátrica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre nos últimos 10 anos (n=717). Analisando de acordo com o ano de diagnóstico dos tumores, o recrutamento médio anual atingido foi de 46,3% (21,6-83,8%). Todos as famílias dos 717 pacientes admitidos ao Serviço de Oncologia Pediátrica no período foram contactadas (por telefone e carta) e houve recusa direta à participação neste estudo por 6,7% das famílias. A análise da mutação *TP53* p.R337H do grupo recrutado (n=292) identificou a mutação em elevada frequência somente entre os casos com carcinoma adrenocortical (9/11; 81,8%) e de plexo coróide (2/2; 100%), correspondendo a 3,8% da amostra total (n=292). Um dos casos de carcinoma adrenocortical apresentou a mutação p.R337H em homozigose. Todos os tumores das crianças com a mutação p.R337H analisados (n=8) apresentaram perda de heterozigidade, sugerindo que a inativação do segundo alelo de *TP53* possa ter envolvimento na iniciação e/ou progressão da doença. Todos os portadores da mutação apresentaram o mesmo haplótipo fundador e nenhuma outra mutação no gene *TP53* foi encontrada nos portadores, apenas polimorfismos de baixa penetrância. Todas as famílias dos portadores foram convidadas a realizar análise molecular e encontram-se em acompanhamento pelo

equipe médica e de pesquisadores do projeto no Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Nas 9 famílias dos portadores heterozigotos que aceitaram prosseguir no estudo, a mutação foi encontrada em um dos pais, e no caso da paciente homozigota a mutação foi encontrada em ambos os pais, sugerindo que mutações *de novo* nesse locus são eventos raros. Quanto a história familiar, foi possível observar que 25,3% (72 casos) das crianças incluídas no estudo, apresentavam critérios clínicos para a síndrome Li-Fraumeni-Like (Chompret, Birch e/ou Eeles), sendo que 51 apresentavam critérios estritos (excluindo os casos com critérios exclusivamente de Eeles 1). Adicionalmente, 50,7% (145 casos) apresentavam história familiar de câncer em familiares de primeiro ou segundo grau e 38,6% (105 casos) apresentam história familiar de câncer com idade ≤ 45 anos, sendo 9,9% (29 casos) com idade ≤ 18 anos. Comparando alguns destes achados de história familiar com uma série adicional de 66 crianças sem tumores internadas no mesmo hospital por outras enfermidades foi observado que apenas 1,5% (1 caso) apresentava critérios para Li-Fraumeni-Like nesse grupo, apesar de que 35,9% (23 casos) apresentavam história familiar de câncer em familiares de primeiro e segundo grau. Esses achados indicam que, apesar da história familiar de câncer em familiares de 1º ou 2º grau ser frequente, critérios francos para LFL são muito mais frequentes entre crianças diagnosticadas com câncer.

O sequenciamento do gene *TP53* e pesquisa de rearranjos deste gene por MLPA de 48 entre as 51 crianças com câncer e com critérios para Li-Fraumeni-Like sem a mutação p.R337H, ao contrário do esperado, evidenciou uma baixa frequência de portadores de outras mutações germinativas no gene *TP53*, excluindo-se a presença de p.R337H (encontrada em 11 casos). Entre estes 48 probandos, apenas uma criança apresentou uma mutação clássica – p.G245S (no domínio de ligação ao DNA do gene).

Estes achados evidenciam que a mutação *TP53* p.R337H: (1) está presente em elevada frequência na linhagem germinativa de crianças com carcinomas adrenocortical e de plexo coróide; (2) ocorre em um mesmo haplótipo fundador já evidenciado em portadores da mutação descrito em estudos prévios; (3) está associada, nos tumores pediátricos, a mecanismo de carcinogênese que envolve perda de heterozigosidade. Quanto a amostra total de casos com câncer pediátrico

recrutados, pode-se inferir que: (1) um percentual significativo apresenta história familiar com critérios de Li-Fraumeni-Like com indicação de investigação molecular; (2) um percentual significativo apresenta história familiar de câncer em idade jovem; (3) apresentam baixa frequência de outras mutações germinativas no gene *TP53*, sugerindo a participação de outros genes no fenótipo de câncer hereditário destes casos. Por fim, na amostra de casos pediátricos sem câncer (controles) observou-se que estes apresentam baixa frequência de história familiar com critérios de Li-Fraumeni-Like, podendo-se inferir que os casos de câncer pediátrico estão associados a história genética e que um detalhado levantamento desta como estratégia inicial e posterior estudo molecular aprofundado faz-se necessário.

8. PERSPECTIVAS

Ao término do projeto, novas questões de pesquisa foram evidenciadas e estão listadas detalhadamente abaixo como objetivos a curto e longo prazo:

A curto prazo:

- (1) Realizar uma análise de custo do teste molecular para a mutação *TP53* p.R337H, listando comparativamente as diferentes metodologias de detecção utilizadas, incluindo a validação de HRM como metodologia de rastreamento para a mesma, em colaboração com o Grupo de Pesquisa e Pós Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Adm. Rosane Schatter), Unidade de Análise Molecular e Proteínas (Dras. Patricia Koehler-Santos e Ursula Matte) e Laboratório de Medicina Genômica (LMG) (Biol Gabriel Macedo e Biol Mariana Fitarelli Kiehl);
- (2) Realizar a datação da mutação, junto ao Laboratório de Genética Humana e Médica da Universidade do Pará (Dr. Sidney Emmanuel Batista Santos) em colaboração com o Biol. Msc. Diego Paskulin (LMG e PPGBM-UFRGS);
- (3) Realizar análise molecular da mutação *TP53* p.R337H em uma série de casos de mulheres portuguesas com câncer de mama (n=300) e mulheres sem câncer de mama (n=300), em colaboração do Hospital do Câncer de Barretos (Dr. Rui Reis e Dra. Edenir Inês Palmero);
- (4) Realizar análise molecular de polimorfismos modificadores de fenótipo no gene *TP53*, *MDM2* e *HAUSP* em todos os portadores da mutação *TP53* p.R337H identificados até o momento, junto aos colegas do Laboratório de Medicina Genômica, Biol. MSc. Diego Paskulin e Biol. MSc. Gabriel Macedo;
- (5) Identificar mutações germinativas em *TP53* em pacientes câncer e com idade \geq 18 anos (n=70) que tenham tumores do espectro da SLF/LFL e preencham critérios de Chompret para a síndrome;

A longo prazo:

- (1) Acompanhar prospectivamente os indivíduos e famílias portadores(as) de mutação identificados no estudo, junto a equipe de Oncogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Dras. Cristina B. O Netto e Patricia Ashton-Prolla, enfermeiras e residentes);
- (2) Realizar estudos genômicos para identificação de alterações moleculares relacionadas ao fenótipo SLF/LFL nas famílias dos casos pediátricos sem mutação germinativa identificada no gene *TP53* em colaboração com Dras. Mariluce Riegel e Úrsula Matte do Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre;
- (3) Investigar a associação *TP53* p.R337H e HER2, junto a colega do Laboratório de Medicina Genômica Biol. MSc. Mariana Fitarelli-Kiehl;
- (4) Aprofundar a caracterização dos tumores centrais à síndrome SLF/LFL e associados à mutação germinativa *TP53* p.R337H e estimar a penetrância da alteração, em colaboração com o Departamento de Matemática e Estatística, UFRGS (Dra. Suzi Alves Camey);
- (5) Expandir a série de casos de câncer de mama para todas as regiões brasileiras.

ANEXOS

ANEXO A - FICHA CLÍNICA PEDIÁTRICA

FICHA CLÍNICA PEDIÁTRICA
AMBULATÓRIO DE GENÉTICA E CÂNCER

IDENTIFICAÇÃO

Nome _____ do _____ paciente:

(em letra de forma e legível, exatamente como consta na carteira de identidade)

AGH: _____ GGC: _____ TCLE nº: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

Etnia: _____

Filiação:

_____ e

Sobrenome materno: _____ Sobrenome paterno: _____

Naturalidade: _____

Responsável na consulta: _____

Endereço: _____

Telefone: (____) _____ Celular: (____) _____

Município: _____ Estado: _____

CEP: _____

Outras observações: _____

Data da consulta: _____

DADOS CLÍNICOS:

Idade: _____

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm

DIAGNÓSTICO DO TUMOR (com confirmação de laudo de exame anatomopatológico):

Tipo do tumor: _____

Localização: _____

Metástases ao Diagnóstico () não () sim, local _____

Idade ao diagnóstico: _____

Primeiros sintomas observados pela família, antes do diagnóstico: _____

Tratamento:

() quimioterapia () radioterapia () cirurgia () transplante de medula óssea autólogo

Recidiva:

() não () sim, local e tempo após o diagnóstico: _____

Status Oncológico:

() em tratamento () em tratamento recidiva () pós TMO () em follow up () óbito

Demais observações:

ANTECEDENTES MATERNOS E DADOS PRÉ-NATAIS:

História gineco obstétrica:

Menarca: _____ anos **Menopausa:** _____ anos

Histórico Gestacional:

Mãe : Gest. _____ Partos _____ Ces _____ Abortos _____ Idade da mãe ao nascimento: _____ TS Mãe: _____ Fator Rh _____

Sorologias de risco:

Anti HIV () sim () não Rubéola () sim () não Toxoplasmose () sim () não

Comorbidades:

() Diabetes Mellitus () HAS () obesidade

Infecção 1º trimestre : () sim , qual _____ () não

Infecção 3º trimestre: () sim, qual _____ () não

Exposição ambiental:

() fumo () álcool () radiação () medicamentos, quais _____ () agrotóxicos, quais _____ () outras substâncias químicas, quais _____

Intercorrências gestacionais 1º trimestre: () ameaça de aborto () sangramento vaginal () outras, quais _____

Intercorrências gestacionais 3º trimestre: () rompimento prematuro de membranas () trabalho parto prematuro () eclâmpsia () pré eclampsia () RCIU () outras _____

Antecedentes de mal-formações e /ou outras anomalias genéticas em gestações anteriores: () sim, qual _____ () não

Consultas pré-natais: () realizado pré- natal (+ 5 consultas) () não realizado pré-natal (- 5 consultas)

Tipo de parto: () Hospitalar () Domiciliar

ANTECEDENTES NEONATAIS:

Recém nascido:

() pré termo, IG _____ () a termo () pós termo _____

Antropometria:

Peso ao nascimento: _____ g Comprimento: _____ cm Perímetro cefálico: _____ cm
Apgar: _____ / _____ () não sabe informar

Intercorrências Período Neonatal:

() icterícia () hipoglicemia () infecção, qual _____ () mal-formação, qual _____
() internação em UTI neonatal, motivo _____ () outras _____

Alta com a mãe da maternidade: () sim () não, motivo _____

Teste do Pezinho: () sim () não () alteração no teste, qual _____

Aleitamento materno: () sim, exclusivo até _____ meses () sim, não exclusivo () não, motivo _____

ANTECEDENTES PEDIÁTRICOS CRESCIMENTO/ DESENVOLVIMENTO:

Marcos neurológicos:

- 1) idade no sustento cefálico: _____ meses
- 2) idade ao sentar sem apoio: _____ meses
- 3) idade ao engatinhar: _____ meses
- 4) idade ao pronunciar 1ª palavras: _____ meses

5) idade ao caminhar: _____ meses

Acompanhamento Puericultura Regular:

sim , até os 6 m sim, até 12 meses não, motivo _____

Crescimento:

Durante acompanhamento Pediátrico ,houve sinalização, em algum momento, de déficit de ganho de peso: sim, em qual período _____ não

Durante acompanhamento Pediátrico, houve sinalização em algum momento, de déficit de estatura: sim, em qual período _____ não

Encaminhamento Especialistas:

não sim, motivo _____

nutricionista fonoaudiólogo fisioterapeuta endocrinologista

geneticista ortopedista cirurgião pediátrico neurologista escola especial

ANTECEDENTES PEDIÁTRICOS:

Vacinas em dia até os 6 anos :

sim não, motivo _____

Necessidade de internação hospitalar antes do diagnóstico oncológico :

sim, motivo _____ não

Necessidade de intervenção cirúrgica antes do diagnóstico oncológico:

sim, motivo _____ não

Antecedentes de traumas/ acidentes:

não sim, qual _____

Exposição Ambiental:

cigarro agrotóxicos outras substâncias químicas, quais _____ medicações, quais _____ radiação

HEREDOGRAMA (com confirmação de laudos de exame anatomopatológico):

ANEXO B - TERMO DE CONSENTIMENTO – AUTORIZAÇÃO POR REPRESENTAÇÃO DE MENOR RELACIONADO AFETADO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Autorização por representação de menor relacionado afetado

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de câncer e prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes pediátricos com câncer

Você está sendo convidado a permitir a participação do paciente menor de idade, pelo qual você é responsável legal, em um estudo, realizado pelo Serviço de Oncologia Pediátrica e pelo Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Como já informado pela equipe assistencial, este paciente teve o diagnóstico assistencial de um tumor. Alguns tumores podem estar associados a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni. Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente irão desenvolver câncer. Existe, porém, a possibilidade (risco) de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação R337H, pode ser mais frequente em nosso meio.

Este projeto de pesquisa pretende estudar a frequência da mutação *TP53*-R337H (no exon 10 do gene *TP53*) em crianças que já foram diagnosticadas com alguns tipos de tumores.

Caso a participação no projeto seja autorizada, serão realizados alguns procedimentos, que se inicia com o fornecimento destas informações, leitura e assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Após será realizada uma consulta para explicação dos procedimentos a serem realizados. Será solicitado o preenchimento de alguns formulários e questionários, incluindo a realização de um desenho (heredograma) da história familiar de câncer. Será solicitada a sua colaboração no sentido de obter informações mais detalhadas e, sempre que possível, a confirmação dos casos de câncer de seus familiares por meio de laudos de exames ou atestados médicos.

Será necessário também obter uma amostra de DNA do paciente para verificar a ocorrência desta alteração genética. O DNA é uma substância que registra todas as informações genéticas de uma pessoa. Isto poderá ser feito de duas maneiras. Poderá ser coletada uma pequena amostra de sangue (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. Esta coleta será feita junto com as necessárias para exames assistenciais. Outra possibilidade é a utilização de amostras de tecidos já armazenadas no Serviço de Patologia do Hospital. Estas amostras foram obtidas durante algum outro procedimento assistencial que o paciente tenha realizado.

As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Laboratório de Medicina Genômica). Em alguns casos poderá ser realizada complementação de análise em outro laboratório colaborador.

HCPA / GPPG
Recebido em:
15 FEV. 2011
Por Miguel
Proj. nº 08022

1-4

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17.02.2011
08022 TAV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Autorização por representação de menor relacionado afetado

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de câncer e prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes pediátricos com câncer

Estamos também solicitando a sua autorização para o armazenamento da amostra de seu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização em pesquisas futuras. Caso você autorize, iremos entrar novamente em contato com você para lhe informar e pedir consentimento específico para este novo estudo.

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

A situação proposta pelo estudo de verificar uma mutação genética de predisposição ao câncer, pode causar um desconforto em termos de insegurança frente as informações que são geradas e suas repercussões sobre a sua saúde individual e familiar. Os pesquisadores estarão disponíveis para esclarecer todas estas situações.

Este estudo permite o diagnóstico molecular da mutação p.R337H do gene *TP53*, e posteriormente o rastreamento de outras mutações ao longo do gene *TP53* nos pacientes positivos para a mutação *TP53*-R337H e nos pacientes que preencherem critérios clínicos para a Síndrome de Li Fraumeni / Li Fraumeni Like.

Algumas alterações no gene *TP53*, como a mutação *TP53*-R337H, estão associadas à maior risco para o desenvolvimento de diversos tumores. Uma vez identificada alguma alteração, será solicitada nova coleta de amostra sanguínea para confirmação, e será proposta a mesma análise nos familiares (sintomáticos e assintomáticos), acompanhado de aconselhamento genético.

A realização do teste possibilita identificar pessoas em risco e encaminhá-las para programas mais intensivos de prevenção, diminuindo os riscos associados a vários tumores. Para outros tumores associados a esta alteração pode não haver uma conduta específica e comprovadamente eficaz para diminuir o risco. A descoberta de alterações nos genes de predisposição e a comparação com alterações previamente descritas possibilitarão uma melhor compreensão dos mecanismos da doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes na população geral e em famílias de alto risco para câncer.

A participação neste estudo é **totalmente voluntária**. Algumas perguntas poderão lhe gerar um certo desconforto, por isso, mesmo que tenha concordado em participar desta pesquisa, você poderá **desistir** a qualquer momento, **sem ter que dar qualquer justificativa ou explicação**. Sinta-se à vontade para **esclarecer quaisquer dúvidas** antes de decidir sobre a sua participação no estudo.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17/02/2011
08022 TKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
 Autorização por representação de menor relacionado afetado

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos com câncer

O menor representado por você deve ser adequadamente informado sobre a sua participação, e na medida de sua capacidade, participar ativamente neste processo.

Todas as **informações** de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma **confidencial**. Todos os procedimentos de pesquisa serão custeados com verbas de pesquisa, não havendo nenhum ônus financeiro para os participantes em relação a estes procedimentos. Da mesma forma, não será concedida aos participantes nenhuma remuneração financeira relacionada à participação na pesquisa. O seu **nome e dos seus familiares não serão vinculados aos resultados** desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados apenas de forma coletiva.

Com relação aos resultados desta pesquisa, é importante salientar que:

- Não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, iremos lhe informar assim que os dados estiverem disponíveis.
- O resultado **não** será transmitido por telefone, fax ou carta. Ao longo da pesquisa iremos lhe explicar que existem três resultados possíveis para o teste: a criança ou adolescente poderá ter herdado a alteração; poderá não ter herdado a alteração, ou os resultados do exame não possibilitam determinar se a alteração foi ou não herdada.
- Quando o resultado do exame do menor relacionado estiver disponível, os pesquisadores irão lhe chamar para entregar pessoalmente o resultado e fazer as recomendações necessárias de acordo com o mesmo.
- Você tem a opção de não querer receber ou retardar o recebimento dos resultados da análise genética durante qualquer momento do processo de testagem. Se você quiser saber qual é o resultado, este será fornecido durante a consulta.

O resultado desta pesquisa será entregue preferencialmente a você em uma consulta. Caso você esteja impossibilitado de receber o resultado pessoalmente, pode ser indicada outra pessoa para receber o resultado em seu nome. Em caso afirmativo, indique os dados a seguir:

Nome: _____

Grau de Parentesco _____

Telefone: _____

Você poderá entrar em contato com a Dra. Patrícia Ashton Prolla e/ou com Juliana Giacomazzi do Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661 ou pelo endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre - RS, para mais informações. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou o projeto, também pode auxiliar a esclarecer alguma dúvida que você tiver, pelo telefone 51-3359-8304.

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 17.02.2011
 080227M

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Autorização por representação de menor relacionado afetado

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos com câncer

Eu, _____, (pai/mãe/responsável) de _____ declaro ter lido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo de forma livre e esclarecida**, em autorizar a participação do meu representado **nesse estudo**, autorizando os seguintes procedimentos:

- () Obtenção de DNA do meu representado mediante coleta de sangue e/ou extração de DNA de tecido armazenado em parafina para realização de teste genético;
- () Armazenamento da amostra do DNA de meu representado para estudos futuros;
- () Preenchimento de formulários, questionários e heredograma (realização de questionário específico sobre a história familiar do paciente);

Declaro ter **recebido cópia** deste Termo

_____	____/____/____
Assinatura do participante	Data
_____	____/____/____
Assinatura do Pai/Mãe/Responsável Legal	Data
_____	____/____/____
Nome do entrevistador	Assinatura do entrevistador
	Data

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 17/02/2011
 08022 TRV

ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO – ADULTOS RELACIONADOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Adultos relacionados

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa *TP53-R337H* em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa *TP53-R337H* em pacientes pediátricos

Você está sendo convidado a participar de um estudo, realizado pelo Serviço de Oncologia Pediátrica e pelo Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois, como já é de seu conhecimento, um familiar seu teve um tumor e é portador de uma mutação genética chamada *TP53-R337H*. Esta mutação está associada a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente irão desenvolver câncer. Existe, porém, a possibilidade (risco) de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação *R337H*, pode ser mais freqüente em nosso meio.

Este é um projeto de pesquisa que pretende estudar a frequência de uma alteração genética - a mutação *R337H* no gene *TP53* – em crianças e adultos com certos tipos de tumores. Você está sendo convidado a participar porque alguém de sua família teve o diagnóstico desta mutação *TP53-R337H*.

O objetivo desta pesquisa é estudar a frequência de uma alteração genética - a mutação *R337H* no gene *TP53* – em crianças e adultos que já tiveram familiares diagnosticados com certos tipos de tumores.

Caso você autorize a sua participação no projeto, serão realizados alguns procedimentos, que se inicia com o fornecimento destas informações, leitura e assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Após será realizada uma consulta para explicação dos procedimentos a serem realizados. Será solicitado o preenchimento de alguns formulários e questionários, incluindo a realização de um desenho (heredograma) da história familiar de câncer. Será solicitada a sua colaboração no sentido de obter informações mais detalhadas e, sempre que possível, a confirmação dos casos de câncer de seus familiares por meio de laudos de exames ou atestados médicos.

Será necessário também obter uma amostra do seu DNA para verificar a ocorrência desta alteração genética. O DNA é uma substância que registra todas as informações genéticas de uma pessoa. Será coletada uma pequena amostra de sangue venoso (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Laboratório de Medicina Genômica). Em alguns casos poderá ser realizada complementação de análise em outro laboratório colaborador.

<p>HCPA / GPPG Recebido em:</p> <p>15 FEV. 2011</p> <p>Por Miguel</p> <p>Proj. nº 08.022</p>

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17/02/2011
08022 TNV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Adultos relacionados

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos

Estamos também solicitando a sua autorização para o armazenamento da amostra de seu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização em pesquisas futuras. Caso você autorize, iremos entrar novamente em contato com você para lhe informar e pedir consentimento específico para este novo estudo.

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele para atingir a veia. Complicações de coleta de sangue venoso são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

A situação proposta pelo estudo de verificar uma mutação genética de predisposição ao câncer pode causar um desconforto em termos de insegurança frente às informações que são geradas e suas repercussões sobre a sua saúde individual e familiar. Os pesquisadores estarão disponíveis para esclarecer todas estas situações.

Este estudo permite o diagnóstico molecular da mutação R337H do gene TP53. Essa alteração pode estar associada à maior risco para o desenvolvimento de diversos tumores. A realização do teste possibilita identificar pessoas em risco e encaminhá-las para programas mais intensivos de prevenção, diminuindo os riscos associados a vários tumores. Para outros tumores associados a esta alteração pode não haver uma conduta específica e comprovadamente eficaz para diminuir o risco. A descoberta de alterações nos genes de predisposição e a comparação com alterações previamente descritas possibilitarão uma melhor compreensão dos mecanismos da doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes na população geral e em famílias de alto risco para câncer.

A sua participação neste estudo é **totalmente voluntária**. Algumas perguntas poderão lhe gerar certo desconforto, por isso, mesmo que tenha concordado em participar desta pesquisa, você poderá desistir a qualquer momento, **sem ter que dar qualquer justificativa ou explicação**. Sinta-se à vontade para **esclarecer quaisquer dúvidas** antes de decidir sobre a sua autorização para a participação no estudo.

Todas as **informações** de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma **confidencial**. Todos os procedimentos de pesquisa serão custeados com verbas de pesquisa, não havendo nenhum ônus financeiro para os participantes em relação a estes procedimentos. Da mesma forma, não será concedida aos participantes nenhuma remuneração financeira relacionada à participação na pesquisa. O seu **nome e dos seus familiares não serão vinculados aos resultados** desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados apenas de forma coletiva.

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17-02-2011
08022 TKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Adultos relacionados

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos

Com relação aos resultados desta pesquisa, é importante salientar que:

- Não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, iremos lhe informar assim que os dados estiverem disponíveis.
- O resultado **não** será transmitido por telefone, fax ou carta. Ao longo da pesquisa iremos lhe explicar que existem três resultados possíveis para o teste: você poderá ter herdado a alteração; poderá não ter herdado a alteração, ou os resultados do exame não possibilitam determinar se a alteração foi ou não herdada.
- Quando o resultado do exame estiver disponível, os pesquisadores irão lhe chamar para entregar pessoalmente o resultado e fazer as recomendações necessárias de acordo com o mesmo.

O resultado desta pesquisa será entregue preferencialmente a você em uma consulta. Caso você esteja impossibilitado de receber o resultado pessoalmente, pode ser indicada outra pessoa para receber o resultado em seu nome. Em caso afirmativo, indique os dados a seguir:

Nome: _____
 Grau de Parentesco _____
 Telefone: _____

Você poderá entrar em contato com a Dra. Patrícia Ashton Prolla e/ou com Juliana Giacomazzi do Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661 ou pelo endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre - RS, para mais informações. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou o projeto, também pode auxiliar a esclarecer alguma dúvida que você tiver, pelo telefone 51-3359-8304.

Eu, _____, (pai/mãe/responsável) de _____ declaro ter lido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e, de forma livre e esclarecida, concordo em participar desse estudo, autorizando os seguintes procedimentos:

- () Obtenção de DNA do meu representado mediante coleta de sangue para realização de teste genético;
- () Armazenamento da amostra do DNA de meu representado para estudos futuros.

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA
 17/02/2011
 O8022TKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Adultos relacionados

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos

() Preenchimento de formulários, questionários e heredograma (realização de questionário específico sobre a história familiar do paciente);

Declaro ter **recebido cópia** deste Termo

Assinatura do Pai/Mãe/Responsável Legal

____/____/____
Data

Nome do entrevistador

Assinatura do entrevistador

____/____/____
Data

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA

17/02/2011

08022 TkV

ANEXO D - TERMO DE CONSENTIMENTO – AUTORIZAÇÃO POR REPRESENTAÇÃO DE MENOR RELACIONADO NÃO AFETADO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Autorização por representação de menor relacionado não afetado

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes”

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes pediátricos

Você está sendo convidado a permitir a participação de um menor de idade, pelo qual você é responsável legal, em um estudo, realizado pelo Serviço de Oncologia Pediátrica e pelo Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O menor sob sua responsabilidade está sendo convidado a participar deste estudo, pois, como já é de seu conhecimento, um familiar deste menor ciente teve um tumor e é portador de uma mutação genética chamada *TP53*-R337H. Esta mutação está associada a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética familiar obrigatoriamente irão desenvolver câncer. Existe, porém, a possibilidade (risco) de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta Síndrome no Brasil não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação R337H, pode ser mais freqüente em nosso meio.

Este é um projeto de pesquisa que pretende estudar a frequência de uma alteração genética - a mutação *R337H* no gene *TP53* – em adultos e crianças e adultos com certos tipos de tumores. O menor representado por você está sendo convidado a participar porque alguém de sua família teve o diagnóstico desta mutação *TP53*-R337H.

O objetivo desta pesquisa é estudar a frequência de uma alteração genética - a mutação *R337H* no gene *TP53* – em crianças e adultos que já tiveram familiares diagnosticados com certos tipos de tumores.

Caso a participação no projeto seja autorizada, serão realizados alguns procedimentos, que se inicia com o fornecimento destas informações, leitura e assinatura deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Após será realizada uma consulta para explicação dos procedimentos a serem realizados. Será solicitado o preenchimento de alguns formulários e questionários, incluindo a realização de um desenho (heredograma) da história familiar de câncer. Será solicitada a sua colaboração no sentido de obter informações mais detalhadas e, sempre que possível, a confirmação dos casos de câncer de seus familiares por meio de laudos de exames ou atestados médicos.

Será necessário também obter uma amostra de DNA do menor representado por você, para verificar a ocorrência desta alteração genética. O DNA é uma substância que registra todas as informações genéticas de uma pessoa. Será coletada uma pequena amostra de sangue venoso (10 ml, equivalente a duas colheres de chá) em dois frascos. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisa Experimental do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Laboratório de Medicina Genômica). Em alguns casos poderá ser realizada complementação de análise em outro laboratório colaborador.

<p>HCPA / GPPG Recebido em: 15 FEV. 2011 Por Miguel Prol. nº 08-022</p>

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17/02/2011
08-022 TKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Autorização por representação de menor relacionado não afetado

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa *TP53*-R337H em pacientes pediátricos

Estamos também solicitando a sua autorização para o armazenamento da amostra de seu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização em pesquisas futuras. Caso você autorize, iremos entrar novamente em contato com você para lhe informar e pedir consentimento específico para este novo estudo.

No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele para atingir a veia. Complicações de coleta de sangue venoso são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim, o que diminui as chances de complicações.

A situação proposta pelo estudo de verificar uma mutação genética de predisposição ao câncer pode causar um desconforto em termos de insegurança frente às informações que são geradas e suas repercussões sobre a sua saúde individual e familiar. Os pesquisadores estarão disponíveis para esclarecer todas estas situações.

Este estudo permite o diagnóstico molecular da mutação R337H do gene *TP53*. Essa alteração pode estar associada à maior risco para o desenvolvimento de diversos tumores. A realização do teste possibilita identificar pessoas em risco e encaminhá-las para programas mais intensivos de prevenção, diminuindo os riscos associados a vários tumores. Para outros tumores associados a esta alteração pode não haver uma conduta específica e comprovadamente eficaz para diminuir o risco. A descoberta de alterações nos genes de predisposição e a comparação com alterações previamente descritas possibilitarão uma melhor compreensão dos mecanismos da doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes na população geral e em famílias de alto risco para câncer.

A participação neste estudo do menor representado por você é **totalmente voluntária**. Algumas perguntas poderão lhe gerar um certo desconforto, por isso, mesmo que tenha concordado em participar desta pesquisa, você poderá **desistir** a qualquer momento, **sem ter que dar qualquer justificativa ou explicação**. Sinta-se à vontade para **esclarecer quaisquer dúvidas** antes de decidir sobre a sua autorização para a participação no estudo.

O menor representado por você deve ser adequadamente informado sobre a sua participação, e na medida de sua capacidade, participar ativamente neste processo.

Todas as **informações** de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma **confidencial**. Todos os procedimentos de pesquisa serão custeados com verbas de pesquisa, não havendo nenhum ônus financeiro para os participantes em relação a estes procedimentos. Da mesma forma, não será concedida aos participantes nenhuma remuneração financeira relacionada à participação na pesquisa. O seu **nome e dos seus**

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17/02/2011
08022 TKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Autorização por representação de menor relacionado não afetado

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos

familiares não serão vinculados aos resultados desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados apenas de forma coletiva.

Com relação aos resultados desta pesquisa, é importante salientar que:

- Não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, iremos lhe informar assim que os dados estiverem disponíveis.
- O resultado **não** será transmitido por telefone, fax ou carta. Ao longo da pesquisa iremos lhe explicar que existem três resultados possíveis para o teste: a criança ou adolescente poderá ter herdado a alteração; poderá não ter herdado a alteração, ou os resultados do exame não possibilitam determinar se a alteração foi ou não herdada.
- Quando o resultado do exame estiver disponível, os pesquisadores irão lhe chamar para entregar pessoalmente o resultado e fazer as recomendações necessárias de acordo com o mesmo.

O resultado desta pesquisa será entregue preferencialmente a você em uma consulta. Caso você esteja impossibilitado de receber o resultado pessoalmente, pode ser indicada outra pessoa para receber o resultado em seu nome. Em caso afirmativo, indique os dados a seguir:

Nome: _____
 Grau de Parentesco _____
 Telefone: _____

Você poderá entrar em contato com a Dra. Patrícia Ashton Prolla e/ou com Juliana Giacomazzi do Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661 ou pelo endereço: Rua Ramiro Barcelos, 2350, CEP 90035-903, Porto Alegre - RS, para mais informações. O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou o projeto, também pode auxiliar a esclarecer alguma dúvida que você tiver, pelo telefone 51-3359-8304.

Eu, _____, (pai/mãe/responsável) de _____ declaro ter lido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo de forma livre e esclarecida**, em autorizar a participação do meu representado **nesse estudo**, autorizando os seguintes procedimentos:

- () Obtenção de DNA do meu representado mediante coleta de sangue para realização de teste genético;

HCPA / GPPG
 VERSÃO APROVADA

17/02/2011
 08 022 PKV

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Autorização por representação de menor relacionado não afetado

Projeto de Pesquisa: "Prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes oncológicos diagnosticados com tumores comumente descritos na Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes"

Subprojeto: História Familiar de Síndrome de câncer e prevalência da mutação germinativa TP53-R337H em pacientes pediátricos

Armazenamento da amostra do DNA de meu representado para estudos futuros.

E também concordo com o:

Preenchimento de formulários, questionários e heredograma (realização de questionário específico sobre a história familiar do paciente);

Declaro ter **recebido cópia** deste Termo

_____	____/____/____	
Assinatura do menor participante	Data	
_____	____/____/____	
Assinatura do Pai/Mãe/Responsável Legal	Data	
_____	____/____/____	
Nome do entrevistador	Assinatura do entrevistador	Data

HCPA / GPPG
VERSÃO APROVADA
17.02.2011
08022 TKV

ANEXO E - LISTA DE POLIMORFISMOS NO GENE *TP53*

Polimorfismos descritos no gene *TP53*

Local.	Descrição genômica	Codon	Proteína	Descrição alteração	Frequência	Identificação (rs)
1-intron	g.333T>C	c.1-10673T>C	-	Intrônica	0.040313	34686922
1-intron	g.371G>A	1-10635G>A	-	intrônica	0.009569	17886250
1-intron	g.459T>C	c.1-10547T>C	-	intrônica	0.017311	17883908
1-intron	g.794T>C	c.1-10212T>C	-	intrônica	0.04533	9905505
1-intron	g.1167G>C	c.1-9839G>C	-	intrônica	0.4422	1794289
1-intron	g.1607C>G	c.1-9399C>G	-	intrônica	0.484392	8064946
1-intron	g.2141A>T	c.1-8865A>T	-	intrônica	0.318634	17883353?
1-intron	g.2140_2141ins1	c.1-8866_1-8865ins1	-	intrônica	0.318634	17883353
1-intron	g.2168C>A	c.1-8838C>A	-	intrônica	0.037722	17883687
1-intron	g.2238del1	c.1-8768del1	-	intrônica	0.294912	17882854
1-intron	g.2358T>C	c.1-8648T>C	-	intrônica	0.315932	17882227
1-intron	g.2448T>A	c.1-8558T>A	-	intrônica	0.315932	17885845
1-intron	g.2912T>G	c.1-8094T>G	-	intrônica	0.29238	9903378
1-intron	g.3019A>G	c.1-7987A>G	-	intrônica	0.280268	17881035
1-intron	g.3738A>G	c.1-7268A>G	-	intrônica	0.2682	11656607
1-intron	g.4496T>A	c.1-6510T>A	-	intrônica	0.035491	17886213
1-intron	g.4537C>G	c.1-6469C>G	-	intrônica	0.036351	17883925
1-intron	g.4560G>A	c.1-6446G>A	-	intrônica	0.0444	-
1-intron	g.4855A>G	c.1-6151A>G	-	intrônica	0.03314	17886107
1-intron	g.7385_7386ins3	c.1-3619_1-3620ins3	-	intrônica	0.233763	1160901
1-intron	g.7389_7390ins3	c.1-3617_1-3615ins3	-	intrônica	0.308	5819163
1-intron	g.7691C>T	c.1-3315C>T	-	Intrônica	0.010182	17883373
1-intron	g.7720T>C	c.1-3286T>C	-	intrônica	0.0098	34766441
1-intron	g.7835C>T	c.1-3171C>T	-	intrônica	0.329871	2078486
1-intron	g.7846T>C	c.1-3160T>C	-	intrônica	0.021975	17882863
1-intron	g.7905G>C	c.1-3101G>C	-	intrônica	0.350124	12602273
1-intron	g.8044T>C	c.1-2962T>C	-	intrônica	0.30642	12603869
1-intron	g.8198_8199ins3	c.1-2808_1-2807ins3	-	intrônica	0.415494	17886028
1-intron	g.8303del(AAAAT)n	c.1-2703del(AAAAT)n	-	intrônica	-	-
1-intron	g.8308ins(AAAAT)n	c.1-2698ins(AAAAT)n	-	intrônica	-	-
1-intron	g.9148_9151del4	c.1-1858_1-1855del4	-	intrônica	0.08888	-
1-intron	g.9647G>A	c.1-1359G>A	-	intrônica	0.313272	1794284
1-intron	g.9690C>T	c.1-1316C>T	-	intrônica	0.069561	8078476
1-intron	g.9794T>C	c.1-1212T>C	-	Intrônica	0.280268	1642782
1-intron	g.9977G>A	c.1-1029G>A	-	intrônica	0.099563	9897559

1-intron	g.10418G>A	c.1-588G>A	-	intrônica	0.282976	12944939
1-intron	g.10866G>A	c.1-140G>A	-	intrônica	0.152278	8079544
2-intron	g.11117C>G	c.74+38C>G	-	intrônica	0.468059	1642785
3-intron	g.11259_11274del16	c.96+41_96+56del16	-	intrônica	0.5	17878362
3-intron	g.11299C>A	c.97-29C>A	-	intrônica	0.15648	17883323
3-intron	g.11322C>T	c.97-6C>T	-	intrônica	0.0098	35117667
4-exon	g.11333C>A	c.102C>A	p.P34P	silenciosa	-	11575998
4-exon	g.11339G>A	c.108G>A	p.P36P	silenciosa	0.012738	1800370
4-exon	g.11370C>T	c.139C>T	p.P47S	missense	0.029329	1800371
4-exon	g.11446C>G	c.215C>G	p.P72R	missense	0.492248	1042522
4-intron	g.12081T>C	c.376-283T>C	-	intrônica	0.103733	1794287
4-intron	g.12239T>C	c.376-125T>C	-	intrônica	0.157451	9895829
4-intron	g.12247G>A	c.376-117G>A	-	intrônica	0.009814	35850753
4-intron	g.12273G>A	c.376-91G>A	-	intrônica	0.212093	2909430
6-exon	g.12708A>G	c.639A>G	p.R213R	silenciosa	0.023526	1800372
6-exon	g.12718G>A	c.649G>A	p.V217M	missense	0.0098	35163653
6-intron	g.12772A>G	c.672+31A>G	-	intrônica	0.0098	34949160
6-intron	g.12803A>G	c.672+62A>G	-	intrônica	0.210458	1625895
6-intron	g.12961G>T	c.672+220G>T	-	intrônica	0.011428	8069054
6-intron	g.13274G>C	c.673-36G>C	-	intrônica	0.031019	17880604
7-intron	g.13491C>T	c.782+72C>T	-	intrônica	0.246362	12947788
7-intron	g.13511T>G	c.782+92T>G	-	intrônica	0.310766	12951053
7-intron	g.13544C>T	c.782+125C>T	-	intrônica	-	1642787
8-intron	g.13987C>T	c.920-5C>T	-	intrônica	0.00994	34361146
9-intron	g.14077T>C	c.993+12T>C	-	intrônica	0.038835	1800899
9-intron	g.14417C>T	c.993+352C>T	-	intrônica	0.09714	-
9-intron	g.14496C>T	c.993+431C>T	-	intrônica	0.3432	1642791
9-intron	g.15185T>C	c.993+1120T>C	-	intrônica	0.256705	12949655
9-intron	g.15982G>A	c.994-903G>A	-	intrônica	0.134012	858528
9-intron	g.16054G>A	c.994-831G>A	-	intrônica	0.084938	9891744
9-intron	g.16139G>A	c.994-746G>A	-	intrônica	0.143457	1641548
9-intron	g.16143G>A	c.994-742G>A	-	intrônica	0.401235	1641549
9-intron	g.16197G>A	c.994-688G>A	-	intrônica	0.022219	17879377
9-intron	g.16422_16423ins1	c.994-463_994-462ins1	-	intrônica	0.01111	-
9-intron	g.16603C>G	c.994-282C>G	-	intrônica	0.064753	17883852
10-exon	g.16970G>C	c.1079G>C	p.G360A	missense	0.009892	35993958
10-intron	g.17021A>T	c.1100+30A>T	-	intrônica	0.011049	17880847
10-intron	g.17469G>A	c.1101-441G>A	-	intrônica	0.056449	17881097
10-intron	g.17689G>A	c.1101-221G>A	-	intrônica	0.118444	6503048
10-intron	g.17861C>T	c.1101-49C>T	-	intrônica	0.011696	17881850
11-exon	g.18096C>T	c.1182+105C>T	-	silenciosa	0.019761	35919705

11-exon	g.18196G>A	c.1182+205G>A	-	silenciosa	0.024239	16956880
11-exon	g.18305G>A	c.1182+314G>A	-	NA	0.019569	34486624
11-exon	g.18319G>A	c.1182+328G>A	-	NA	0.010246	17881366
11-exon	g.18476G>A	c.1182+485G>A	-	NA	0.091723	4968187
11-exon	g.18560_18561del2	c.1182+569_1182+570del2	-	NA	0.436246	17886358
11-exon	g.18604C>A	c.1182+613C>A	-	NA	0.023872	17879353
11-exon	g.18817G>A	c.1182+826G>A	-	NA	0.136576	17884306
11-exon	g.18877G>A	c.1182+886G>A	-	NA	0.009892	35659787
11-exon	g.19166A>C	c.1182+1175A>C	-	intrônica	0.00555	-

IARC database, 2012

ANEXO F - PROTOCOLOS DAS ANÁLISES MOLECULARES

I- Extração de DNA

- **de sangue periférico** – utilizou-se o Illustra blood genomicPrep Spin kit , GE – conforme instruções do fornecedor; Protocolo disponível em: <https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314774443672/litdoc28-9042-64_2007_Rev_E_WEB_20110831101705.pdf>

Acessado em 01 de Junho de 2012.

- **de tecido normal ou tumoral armazenado em bloco de parafina** – utilizou-se o *QIAmp DNA FFPE Tissue Kit*, Qiagen – conforme instruções do fornecedor; Protocolo disponível em:

<http://www.qiagen.com/products/qiaampdnaffpetissuekit.aspx#Tabs=t1>>; Acessado em 01 de Junho de 2012.

II- Quantificação do DNA extraído

- realizada no Nano Drop Technology, Thermo Fisher Inc.;

III- Descrição dos oligonucleotídeos de seqüenciamento do gene *TP53*

Região amplificada	Sentido	Identificação primer	Seqüências primers	Tamanho produto	Programa PCR
Exons 2 e 3	F	P-559	tctcatgctggatccccact	344 bp	A
	R	P-E3Ri	agtcagaggaccaggctcctc		
Exon 4	F	P-326	tgaggacctggctcctgac	413 bp	A
	R	P-327	agaggaatcccaaagtcca		
Exon 5 e 6	F	P-236	Tgttcactgtgccctgact	467 bp	A
	R	P-240	ttaaccctcctcccagaga		
Exon 7	F	P-333	ctgccacaggtctcccaa	237 bp	B
	R	P-313	aggggtcagaggcaagcaga		
Exon 8 e 9	F	P-314	ttgggagtagatggagcct	445 bp	A
	R	P-315	agtgttagactggaacttt		
Exon 10	F	P-E10Li	caattgaactgaaccatc	260 bp	C
	R	P-562	ggatgagaatggaatcctat		
Exon 11	F	P-E11Le	agaccctctactcatgtga	245 bp	A
	R	P-E11Re	tgacgcacacctattgcaag		

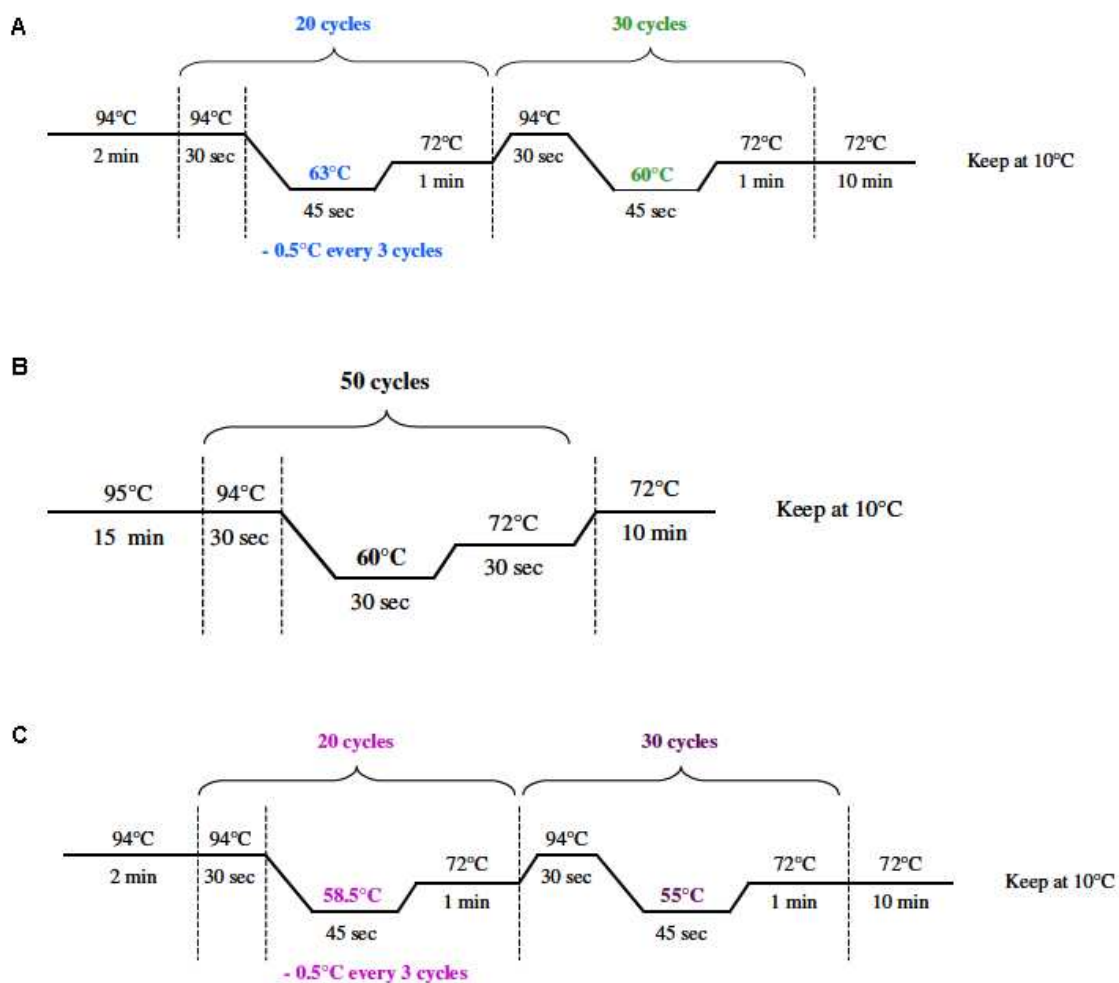
IARC database, 2012

IV- Protocolo dos PCRs do gene *TP53* (exons 2-11)

Componentes da reação	Concentração final	Volume final
5X PCR buffer (sem MgCl ₂)	1X	4 µl
25mM MgCl ₂	1,5 mM	1,2 µl
dNTP (5mM cada)	0,2 mM cada	0,8 µl
Primer* <i>forward</i> 10µM	0,4 µM	0,8 µl
Primer* <i>reverse</i> 10µM	0,4 µM	0,8 µl
GoTaq DNA polymerase (5U/µl)	0,5 U	0,1 µl
DNA	50 ng	
Água	---	Qsp 20 µl

Observações: *Primer: seqüência de oligonucleotídeos referida para cada exon no item "II";

Programas dos PCRs para termociclador



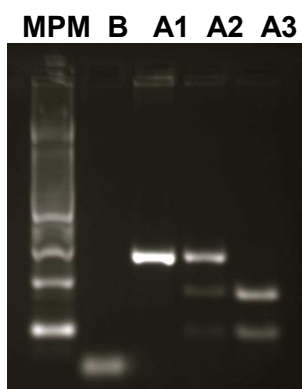
V- Protocolo de clivagem enzimática do amplicon referente ao exon 10 (PCR-RFLP) para detecção da mutação *TP53* p.R337H

Componentes da reação	Concentração final	Volume final
10X buffer	1X	2,0 µl
BSA	10 µg/µl	2,0 µl
Produto do PCR	500 ng/µl	10 µl
HhaI	10 U	1 µl
Água	---	Qsp 20 µl

Programa para clivagem em termociclador

Temperatura (°C)	Tempo (hs)
37	6

Detecção da mutação *TP53* p.R337H por RFLP em gel de agarose 2%



Legenda: MPM – marcador de peso molecular; B- branco; A1- genótipo AA; A2- genótipo AG; A3- genótipo GG;

VI- Protocolo de PCR em Tempo Real para genotipagem da mutação *TP53* p.R337H

Detalhamento do ensaio para genotipagem da mutação *TP53* p.R337H

Assay name: TP53R337H, *custom TaqMan SNP Assay*, ABI

[VIC/FAM]

ccctcctctgttgctgcagatccgtgggcgtgagc[G/A]cttcgagatggtccgagagctgaatgag

VIC: CGTGAGCGCTTCGAG

FAM: CGTGAGCACTTCGAG

Protocolo de genotipagem usando ensaio taqman por PCR em tempo real

Componentes da reação	Concentração Final	Volume por reação (µl)
Água	qsp	4.94
TaqMan Universal PCR Master Mix	2X	6.25
SNP Genotyping Assay Mix	20X	0.312
DNA	20ng/µl	1
Água		Qsp 12,5 µl

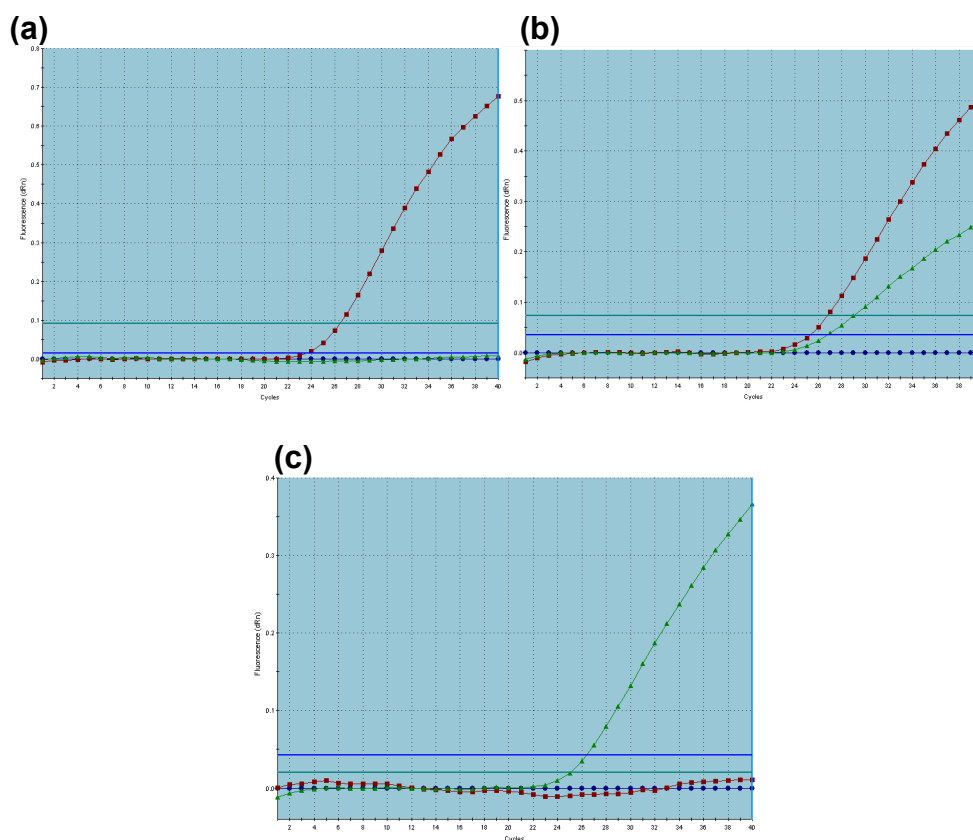
Programa (foram utilizados os equipamentos StepOne, Applied Biosystems e Stratagene 3000, GE):

a) Desnaturação inicial	95°C	10 minutos
b) Desnaturação	92°C	15 segundos
c) Anelamento e extensão	60°C	60 segundos

Passos *a* e *b* por 40 ciclos

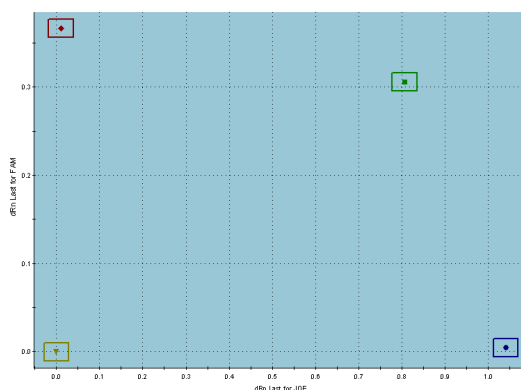
Ao final do processo é gerado um gráfico que possibilita a análise dos genótipos de cada amostra (discriminação alélica);

Discriminação alélica da mutação *TP53* p.R337H, demonstrando genótipos GG, AG e AA (utilizando equipamento Stratagene 3000, GE):



Legenda: (a) amplificação de uma amostra em que houve anelamento da sonda marcada com VIC (genótipo GG); (b) amplificação de uma amostra em que houve anelamento de ambas as sondas (marcadas com VIC e FAM); (genótipo GA) (c) amplificação de uma amostra em que houve anelamento da sonda marcada com FAM (genótipo AA);

Discriminação alélica da mutação *TP53* p.R337H



Legenda: Observa-se em azul (esfera) amostras com o genótipo GG, em verde (quadrado) amostras com o genótipo GA, em vermelho (losango) amostras com o genótipo AA. Em amarelo (triângulo) está denotado o "branco" do experimento.

VII- Protocolos de sequenciamento

As corridas de sequenciamento foram em sua maioria realizadas como prestação de serviço em laboratórios multi usuário. O preparo para sequenciamento e as interpretações dos cromatogramas foram realizadas pela aluna.

a) Realizado na *International Agency for Research on Cancer (IARC)*

- Equipamento *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems;
- Software de análise – SeqScape, Applied Biosystems;
- Protocolo disponível em: <http://www-p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf> ; acessado em 01 de Junho de 2012.

b) Realizado na Unidade de Análises Moleculares e de Proteínas (UAMP), Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

- Equipamento *ABI 3500 Genetic Analyzer*, Applied Biosystems;
- Software de análise – CLC Main Workbench v.6.0;
- Protocolo disponível em: <<http://www.hcpa.ufrgs.br/content/view/1591/1112/>>; Acessado em 01 de Julho de 2012.

VIII- Protocolo da análise de MLPA (Multiplex ligation-dependent probe amplification)

- utilizou-se o kit SALSA MLPA probemix P056-B1 TP53 (MRC-Holland, Netherlands);
- Software de análise – Coffalyser v.9.4 (MRC Holland).
- Protocolo disponível em:
<<http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormProductDetails.aspx?Tag=tz2fAPIAupKyMjaDF%5CE%5Ct9bmuxqlhe/Lgqfk8Hkjuss%7C&ProductOID=nl7RjmiHfkW%7C>>
Acessado em 30 de Maio de 2012.

IX- Protocolo de haplotipagem da mutação *TP53* p.R337H

A análise do haplótipo fundador da mutação *TP53* p.R337H é realizada em duas etapas:

- a)** PCR da região que compreende o polimorfismo localizado na posição g. 24784 (SNP 28, também conhecido como SNP179; T>C, rs 9894946) no gene *TP53* para determinação desse polimorfismo no indivíduo portador da mutação *TP53* p.R337H;
- b)** ASO (Allele specific oligonucleotide)-PCR seguido de Nested-PCR da região que compreende a mutação g.16901 (*TP53* p.R337H) e o SNP 179. O primer anteverso (5'-3') inclui o alelo g.16901 A (*TP53* p.R337H; G >A) e seu uso resulta na amplificação exclusiva do alelo mutante, no qual se verifica mediante sequenciamento em casos portadores da mutação *TP53* p.R337H, a ocorrência do alelo T no nucleotídeo g.24784 (SNP 179) (o que difere o haplótipo A3 do haplótipo A1).

Para diferenciar o haplótipo A3 do haplótipo A4 (que também apresenta o alelo T nesta posição) verifica-se, mediante sequenciamento dos exons 2-3 e 4 de *TP53*, a ocorrência do alelo G no SNP15 (rs1642785), do alelo A no SNP16 (rs17878362) e/ou do alelo G no SNP18 (rs1800370).

Os protocolos das etapas *a* e *b* estão descritos detalhadamente abaixo.

a) PCR da região que compreende g.24784 (SNP 179) no gene *TP53*

Componentes da reação	Concentração final	Volume final
5X PCR buffer (sem MgCl ₂)	1X	2,0 µl
25mM MgCl ₂	1,5 mM	0,6 µl
dNTP (5mM cada)	0,2 mM cada	0,8 µl
Primer* <i>forward</i> SNP179** (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
Primer* <i>reverse</i> SNP179 (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
GoTaq DNA polymerase (5U/µl)	0,5 U	0,1 µl
DNA	50 ng	
Água	---	Qsp 20 µl

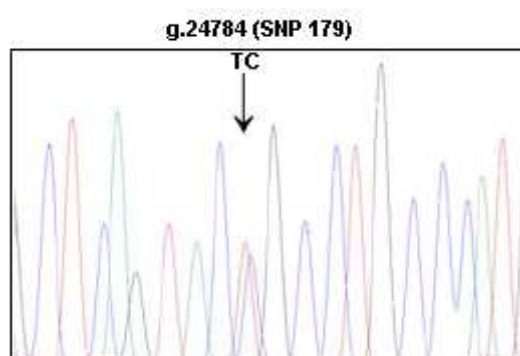
Observações: *Primer: sequência de oligonucleotídeos referida na figura acima;

Programa para termociclador

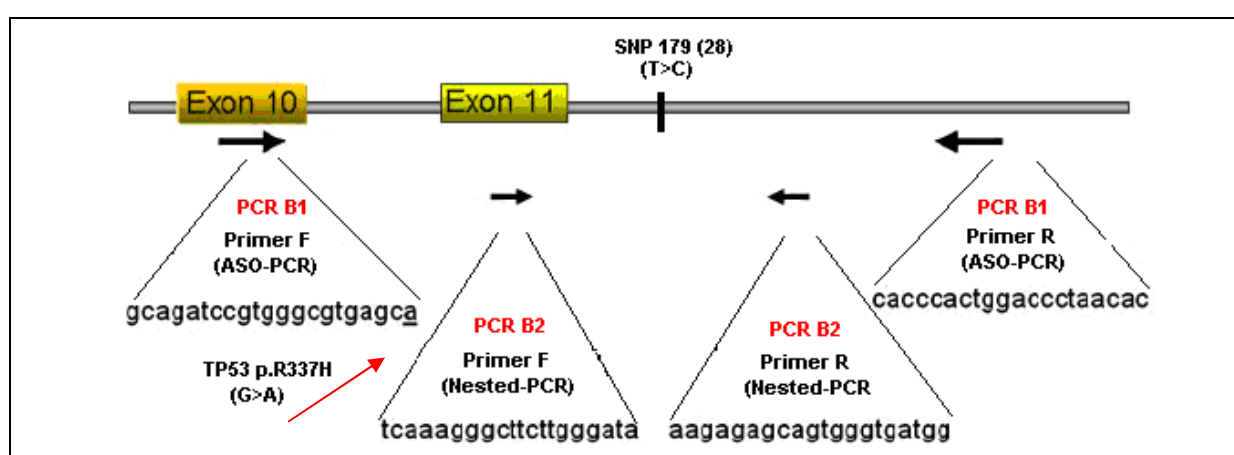
	Temperatura (°C)	Tempo
	94	3 min
35 ciclos	94	30 segundos
	60	30 segundos
	72	30 segundos
	72	10 minutos

Visualização em gel de agarose 2%: Banda 121 bp

Sequenciamento do produto de PCR, evidenciando heterozigose do SNP 179 em um portador da mutação *TP53* p.R337H:



b) ASO-PCR e Nested-PCR da região que compreende a mutação *TP53* p.R337H e o SNP 179



Esquema representando a análise do haplótipo fundador brasileiro, com base na análise do polimorfismo denominado SNP 179.

Legenda: A figura demonstra região englobando o exon 10 – 3'UTR do gene *TP53*, detalhando a

localização da mutação p.R337H (g. 16901) e do SNP 179 (g.24784), assim como dos oligonucleotídeos utilizados nos PCRs B1 e B2; **PCR B1:** ASO-PCR da região que compreende a posição g.16901 (p.R337H) e a posição g.24784 (SNP 179), utilizando um primer desenhado com uma adenina na posição g.16901 (p.R337H); **PCR B2:** Nested-PCR utilizando o produto do ASO-PCR englobando a região que compreende a posição g.24784 (SNP 179), realizado com a finalidade de genotipá-lo no alelo mutado de p.R337H.

B1) ASO-PCR da região que compreende a mutação g.16901 (p.R337H) e o SNP 179

Componentes da reação	Concentração final	Volume final
5X PCR buffer (sem MgCl ₂)	1X	2,0 µl
25mM MgCl ₂	1,5 mM	0,6 µl
dNTP (5mM cada)	0,2 mM cada	0,8 µl
Primer* <i>forward</i> ASO-Primer (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
Primer* <i>reverse</i> ASO Primer (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
GoTaq DNA polymerase (5U/µl)	0,5 U	0,2 µl
DNA	20 ng	
Água	---	Qsp 20 µl

Observações: *Primer: sequência de oligonucleotídeos referida na figura acima;

Programa para termociclador

Temperatura (°C)	Tempo	
94	3 min	
40 ciclos {	94	30 segundos
	65	30 segundos
	72	1min 30 segundos
	72	10 minutos

Visualização em gel de agarose 2%: Banda 3155 bp;

B2) Nested-PCR da região que compreende a mutação g.16901 (p.R337H) e o SNP 179

Componentes da reação	Concentração final	Volume final
5X PCR buffer (sem MgCl ₂)	1X	2,0 µl
25mM MgCl ₂	1,5 mM	0,6 µl
dNTP (5mM cada)	0,2 mM cada	0,8 µl
Primer* <i>forward</i> SNP 179 (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
Primer* <i>reverse</i> SNP 179 (10µM)	0,4 µM	0,4 µl
GoTaq DNA polymerase (5U/µl)	0,5 U	0,1 µl
Produto do ASO-PCR**	50 ng	
Água	---	Qsp 20 µl

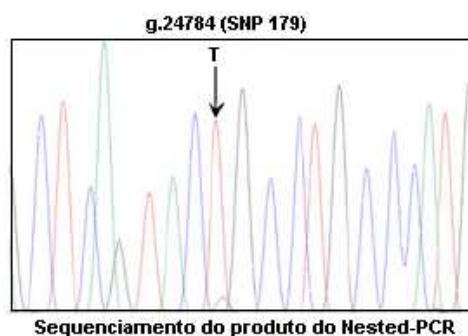
Observações: *Primer: sequência de oligonucleotídeos referida na figura acima; ** Produto do ASO-PCR diluído 1:50;

Programa para termociclador

	Temperatura (°C)	Tempo
	94	3 min
35 ciclos	94	30 segundos
	60	30 segundos
	72	30 segundos
	72	10 minutos

Visualização em gel de agarose 2%: Banda 138 bp;

Sequenciamento do produto de PCR, evidenciando a ocorrência do alelo T no nucleotídeo g.24784 (SNP 179) no alelo mutado de p.R337H



ANEXO G - PUBLICAÇÕES COMPLEMENTARES NO PERÍODO DO DOUTORADO

G1. 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 Mar 8;261(1):21-5. Epub 2008 Jan 11.

Detection of R337H, a germline *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil.

[Palmero EI](#), [Schüler-Faccini L](#), [Caleffi M](#), [Achatz MI](#), [Olivier M](#), [Martel-Planche G](#), [Marcel V](#), [Aguiar E](#), [Giacomazzi J](#), [Ewald IP](#), [Giugliani R](#), [Hainaut P](#), [Ashton-Prolla P](#).

Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Brazil.

Abstract

Germline *TP53* mutations predispose to a rare familial cancer syndrome, the Li-Fraumeni Syndrome (LFS), characterized by the early onset of multiple cancers including childhood adrenocortical carcinomas, sarcomas and brain tumors, and breast and colon cancer in young adults. An identical germline mutation at codon 337 in *TP53* (R337H) has been shown to be causally related to an increased risk of multiple cancers in unrelated subjects with familial cancer risk in Southern Brazil. Here we have assessed the prevalence of R337H in 750 healthy women participating in a community-based breast cancer screening program in the area of Porto Alegre. The mutant was detected in two participants (0.3%) who were fourth-degree relatives and reported a familial history of cancer at multiple sites that did not match classical criteria for LFS and its variants. Testing in additional family members detected the mutation in three subjects, one of whom developed breast cancer at the age of 36. These findings indicate that R337H may be a low penetrance mutant which predisposes to multiple cancers and occurs in the population of Southern Brazil at a frequency 10-20 times higher than other *TP53* mutants commonly associated with LFS.

PMID: 18248785 [PubMed - indexed for MEDLINE]

G2. Identificação e acompanhamento de mulheres com risco aumentado para câncer de mama

ARTIGO DE REVISÃO

Identificação e acompanhamento de mulheres com risco aumentado para câncer de mama

Identification and screening of women with increased risk for breast cancer

RESUMO

A identificação de mulheres com aumento da probabilidade de desenvolverem câncer de mama é fundamental para se tentar definir grupos de risco e, dessa forma, oferecer modelos preventivos que possam ser particularizados e opções de manejo harmoniosamente decididas entre médicos e pacientes. Este artigo visa a sugerir rotinas e fornecer orientações a médicos generalistas, ginecologistas e mastologistas sobre o tema.

UNITERMOS: Câncer de Mama, Genética, Risco Aumentado.

ABSTRACT

The identification of women with an increased risk of developing breast cancer is essential to guide which patients would benefit from specific preventive interventions and strict breast cancer screening strategies. In this article we discuss how high risk patients can be identified and discuss general guidelines that clinicians, gynecologists and mastologists may use to direct at-risk patients to intervention programs.

KEYWORDS: Breast Cancer, Genetics, Increased Risk.

LUCIANO GUIMARÃES ARTICO – Médico especialista em Ginecologia e Obstetrícia; pós-graduado em Oncomastologia pelo Hospital Moínhos de Vento; médico funcionário do Ambulatório Central da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

JULIANA GIACOMAZZI, MSc. – Biomédica, Mestre em Clínica Médica e doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS; Laboratório de Medicina Genômica/Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

PATRICIA ASHTON-PROLLA, M.D., PH.D. – Médica geneticista; Professora Adjunta do Departamento de Genética, UFRGS, e coordenadora do Programa de Oncogenética, Serviço de Genética Médica, HCPA.

MAIRA CALEFFI, M.D., PH.D. – Médica mastologista e coordenadora do Núcleo da Mama do Hospital Moínhos de Vento.

ADEMAR BEDIN JÚNIOR, MSc. – Médico especialista em Ginecologia e Obstetrícia; Mestre e pós-graduado em Oncomastologia pelo Hospital Moínhos de Vento.

GRAZIELA RECH ARTICO – Acadêmica de Medicina do 10º semestre da UCS.

Núcleo da Mama do Hospital Moínhos Moínhos de Vento, Centro Clínico Ramiro Rua Ramiro Barcelos, 910, 11º andar.

✉ Endereço para correspondência:

Maira Caleffi

Rua Ramiro Barcelos, 910, 11º andar.

90035-001 – Porto Alegre, RS – Brasil

☎ (51) 3314-3696

✉ NMama@hmv.org.br

G3. Estimação da probabilidade de mutação germinativa através da história familiar

REVISTA HCPA

[CAPA](#) [SOBRE](#) [ACESSO](#) [CADASTRO](#) [PESQUISA](#) [ATUAL](#) [ANTERIORES](#) [NOTÍCIAS](#)
[HCPA](#) [FAMED](#) [FUNDAÇÃO MÉDICA](#) [ANAIIS DA SEMANA CIENTÍFICA 2002/2011](#) [REVISTAS](#)
[ANTIGAS 1998/2006](#) [HELP](#) [NORMAS DE PUBLICAÇÃO](#)

Capa > v. 31, n. 1 (2011) > Schneider

ESTIMAÇÃO DA PROBABILIDADE DE MUTAÇÃO GERMINATIVA ATRAVÉS DA HISTÓRIA FAMILIAR

Silvana Schneider, Juliana Giacomazzi, Patrícia Ashton-Prolla, Suzi Alves Camcy

RESUMO

Introdução: Cerca de 10% de todos os tumores são primariamente causados por mutações germinativas de alta penetrância em genes de predisposição ao câncer. Indivíduos portadores dessas mutações têm risco significativamente maior de desenvolver câncer que não portadores e estratégias de redução de risco podem ser implementadas se estas pessoas forem identificadas. Essa identificação pode ser feita pela estimativa da probabilidade de mutação através da história pessoal e familiar do probando.

Objetivo: Descrever um dos métodos utilizados para estimar a probabilidade de um indivíduo ser portador ou não de uma mutação germinativa em dois genes associados a uma determinada doença mendeliana, condicionada a sua história familiar (HF).

Metodologia: Foi realizada a estimativa da frequência populacional da mutação em dois genes de predisposição ao câncer de mama e ovário aplicando-se a fórmula de Bayes e o teorema da probabilidade total à história familiar do indivíduo, a probabilidade dele possuir mutação considerando determinada história familiar.

Resultados e conclusão: São apresentadas e analisadas as equações utilizadas no cálculo da probabilidade de uma mutação germinativa em dois genes (BRCA1 e BRCA2) associados a um desfecho específico, que é a síndrome de predisposição ao câncer de mama e ovário. Os cálculos foram feitos para incorporar a informação de dois genes, mas as fórmulas podem ser estendidas para mais genes ou para apenas um. O modelo poderá ser aplicado à população brasileira quando a probabilidade de desenvolver câncer de mama ou ovário, dado o status genético de BRCA1 e BRCA2, para esta população for conhecida.

G4. A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource populations in southern Brazil. (Porto Alegre Breast Health Intervention Cohort)

[BMC Public Health](#), 2009 Mar 13;9:83.

A model to optimize public health care and downstage breast cancer in limited-resource populations in southern Brazil. (Porto Alegre Breast Health Intervention Cohort).

[Caleffi M](#), [Ribeiro RA](#), [Duarte Filho DL](#), [Ashton-Prolla P](#), [Bedin AJ Jr](#), [Skonieski GP](#), [Zignani JM](#), [Giacomazzi J](#), [Franco LR](#), [Graudenz M](#), [Pohlmann P](#), [Fernandes JG](#), [Kivitz P](#), [Weber B](#).

Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil. maira@hmv.org.br

Abstract

BACKGROUND: Breast cancer (BC) is a major public health problem, with rising incidence in many regions of the globe. Although mortality has recently dropped in developed countries, death rates are still increasing in some developing countries, as seen in Brazil. Among the reasons for this phenomenon are the lack of structured screening programs, a long waiting period between diagnosis and treatment, and lack of access to health services for a large proportion of the Brazilian population.

METHODS AND DESIGN: Since 2004, an intervention study in a cohort of women in Southern Brazil, denominated Porto Alegre Breast Health Intervention Cohort, is being conducted in order to test the effectiveness and cost-effectiveness of a model for BC early detection and treatment. In this study, over 4,000 women from underserved communities aged 40 to 69 years are being screened annually with mammography and clinical breast examination performed by a multidisciplinary team, which also involves nutritional counseling and genetic cancer risk assessment. Risk factors for BC development are also being evaluated. Active search of participants by lay community health workers is one of the major features of our program. The accrual of new participants was concluded in 2006 and the study will last for 10 years. The main goal of the study is to demonstrate significant downstaging of BC in an underserved population through proper screening, attaining a higher rate of early-stage BC diagnoses than usually seen in women diagnosed in the Brazilian Public Health System. Preliminary results show a very high BC incidence in this population (117 cases per 100,000 women per year), despite a low prevalence of classical risk factors.

DISCUSSION: This study will allow us to test a model of BC early diagnosis and treatment and evaluate its cost-effectiveness in a developing country where the mortality associated with this disease is very high. Also, it might contribute to the evaluation of risk factors in a population with a different ethnic background from that studied in developed countries. If our model is proven effective, it may be replicated in other parts of the globe where BC is also a major public health problem.

PMID: 19284670 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMID: PMC2669067

G5. Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil

Genet Mol Biol, 2009 Jul;32(3):447-55. Epub 2009 Sep 1.

Population prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and implementation of a genetic cancer risk assessment program in southern Brazil.

Palmero EI, Caleffi M, Schüler-Faccini L, Roth FL, Kalakun L, Netto CB, Skonieski G, Giacomazzi J, Weber B, Giugliani R, Camey SA, Ashton-Prolla P.

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS Brazil.

Abstract

In 2004, a population-based cohort (the Núcleo Mama Porto Alegre - NMPOA Cohort) was started in Porto Alegre, southern Brazil and within that cohort, a hereditary breast cancer study was initiated, aiming to determine the prevalence of hereditary breast cancer phenotypes and evaluate acceptance of a genetic cancer risk assessment (GCRA) program. Women from that cohort who reported a positive family history of cancer were referred to GCRA. Of the 9218 women enrolled, 1286 (13.9%) reported a family history of cancer. Of the 902 women who attended GCRA, 55 (8%) had an estimated lifetime risk of breast cancer $\geq 20\%$ and 214 (23.7%) had pedigrees suggestive of a breast cancer predisposition syndrome; an unexpectedly high number of these fulfilled criteria for Li-Fraumeni-like syndrome (122 families, 66.7%). The overall prevalence of a hereditary breast cancer phenotype was 6.2% (95%CI: 5.67-6.65). These findings identified a problem of significant magnitude in the region and indicate that genetic cancer risk evaluation should be undertaken in a considerable proportion of the women from this community. The large proportion of women who attended GCRA (72.3%) indicates that the program was well-accepted by the community, regardless of the potential cultural, economic and social barriers.

PMD: 21637504 [PubMed] PMID: PMC3036062 [Free PMC Article](#)

G6. Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care

[BMC Cancer](#), 2009 Aug 14;9:283.

Development and validation of a simple questionnaire for the identification of hereditary breast cancer in primary care.

[Ashton-Prolla P](#), [Giacomazzi J](#), [Schmidt AV](#), [Roth FL](#), [Palmero EI](#), [Kalakun L](#), [Aquiari ES](#), [Moreira SM](#), [Batassini E](#), [Belo-Reves V](#), [Schuler-Faccini L](#), [Giugliani R](#), [Caleffi M](#), [Camey SA](#).

Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
pprolla@hcpa.ufrgs.br

Abstract

BACKGROUND: Breast cancer is a significant public health problem worldwide and the development of tools to identify individuals at-risk for hereditary breast cancer syndromes, where specific interventions can be proposed to reduce risk, has become increasingly relevant. A previous study in Southern Brazil has shown that a family history suggestive of these syndromes may be prevalent at the primary care level. Development of a simple and sensitive instrument, easily applicable in primary care units, would be particularly helpful in underserved communities in which identification and referral of high-risk individuals is difficult.

METHODS: A simple 7-question instrument about family history of breast, ovarian and colorectal cancer, FHS-7, was developed to screen for individuals with an increased risk for hereditary breast cancer syndromes. FHS-7 was applied to 9218 women during routine visits to primary care units in Southern Brazil. Two consecutive samples of 885 women and 910 women who answered positively to at least one question and negatively to all questions were included, respectively. The sensitivity, specificity and positive and negative predictive values were determined.

RESULTS: Of the 885 women reporting a positive family history, 211 (23.8%; CI95%: 21.5-26.2) had a pedigree suggestive of a hereditary breast and/or breast and colorectal cancer syndrome. Using as cut point one positive answer, the sensitivity and specificity of the instrument were 87.6% and 56.4%, respectively. Concordance between answers in two different applications was given by an intra-class correlation (ICC) of 0.84 for at least one positive answer. Temporal stability of the instrument was adequate (ICC = 0.65).

CONCLUSION: A simple instrument for the identification of the most common hereditary breast cancer syndrome phenotypes, showing good specificity and temporal stability was developed and could be used as a screening tool in primary care to refer at-risk individuals for genetic evaluations.

PMID: 19682358 [PubMed - indexed for MEDLINE] PMID: PMC2739222

G7. Adherence to a breast cancer screening program and its predictors in underserved women in southern Brazil

Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Oct;19(10):2673-9. Epub 2010 Aug 17.

Adherence to a breast cancer screening program and its predictors in underserved women in southern Brazil.

Caleffi M, Ribeiro RA, Bedin AJ Jr, Viegas-Butzke JM, Baldisserotto FD, Skonieski GP, Giacomazzi J, Camev SA, Ashton-Prolla P.
Núcleo Mama Porto Alegre, Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Brazil. maira@hmv.org.br

Abstract

BACKGROUND: Adherence to breast cancer screening is a key element to ensure effectiveness of programs aiming at downstaging of breast cancer. In this study, we evaluated adherence to a screening program and its predictors in underserved women in southern Brazil.

METHODS: Attendance to the program, which is based on yearly mammogram and clinical examination, was evaluated prospectively. Mean time frames between visits were calculated. Possible predictors of adherence (defined as mean intervals ≤ 18 mo), such as socioeconomic indicators and health/lifestyle behaviors, were investigated.

RESULTS: A total of 3,749 women (age 51 ± 8 y, illiteracy rate of 6.8%, 57.4% with parity ≥ 3) were analyzed. Median time between screening rounds was 16.5 months (interquartile range, 13.1-25.7), and median number of rounds attended was 3 (interquartile range, 2-4); 57.6% had mean intervals ≤ 18 , and 71% ≤ 24 months. The most important independent predictors of adherence were high genetic risk [relative risk (RR), 1.25; 95% confidence interval (95% CI), 1.11-1.40], illiteracy (RR, 0.77; 95% CI, 0.67-0.90), parity ≥ 5 (RR, 0.89; 95% CI, 0.83-0.96), and smoking (RR, 0.82; 95% CI, 0.77-0.88).

CONCLUSIONS: Although the proposed screening interval was 1 year, compliance to biannual screening (accepted in several international programs) was high, especially when considering the low socioeconomic level of the sample.

IMPACT: This project aims to test a breast cancer screening model for underserved populations in limited-resource countries where adherence is an issue. The identification of worst adherence predictors can point to interventions to improve outcomes of similar public health screening strategies.

©2010 AACR.

G8. Prevalence of the *STK15* F31I polymorphism and its relationship with mammographic density

[Braz J Med Biol Res](#). 2011 Apr;44(4):291-6. Epub 2011 Mar 11.

Prevalence of the *STK15* F31I polymorphism and its relationship with mammographic density.

[Giacomazzi J](#), [Aquiari E](#), [Palmero EI](#), [Schmidt AV](#), [Skonieski G](#), [Duarte Filho D](#), [Bock H](#), [Saraiva-Pereira ML](#), [Schuler-Faccini L](#), [Camey SA](#), [Caleffi M](#), [Giugliani R](#), [Ashton-Prolla P](#).

Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

Abstract

Several studies have identified the single nucleotide polymorphism *STK15* F31I as a low-penetrance risk allele for breast cancer, but its prevalence and risk association in the Brazilian population have not been determined. The goal of this study was to identify the frequency of this polymorphism in the Brazilian setting. Considering the high degree of admixture of our population, it is of fundamental importance to validate the results already reported in the literature and also to verify the relationship between this variant and breast cancer risk. A total of 750 women without breast cancer were genotyped using the TaqMan PCR assay for *STK15* F31I polymorphism. Clinical information was obtained from review of the medical records and mammographic density from the images obtained using the BI-RADS System. The estimated risk of developing cancer was calculated according to the Gail model. The genotypic frequencies observed in this study were 4.5, 38.7, and 56.6%, respectively, for the *STK15* F31I AA, AT and TT genotypes. The AT and AA genotypes were encountered significantly more often in premenopausal women with moderately dense, dense and heterogeneously dense breast tissue ($P = 0.023$). In addition, the presence of the TT genotype was significantly associated with age at menarche ≥ 12 years ($P = 0.023$). High mammographic density, associated with increased breast cancer risk, was encountered more frequently in premenopausal women with the risk genotypes *STK15* F31I AA and AT. The genotypic frequencies observed in our Brazilian sample were similar to those described in other predominantly European populations.

PMID: 21412660 [PubMed - indexed for MEDLINE]

G9. Prevalence of *ERα*-397 PvuII C/T, *ER α*-351 XbaI A/G and *PGR* PROGINS polymorphisms in Brazilian breast cancer-unaffected women

[Braz J Med Biol Res.](#) 2012 May 17. pii: S0100-879X2012007500081. [Epub ahead of print]

Prevalence of *ERα*-397 PvuII C/T, *ERα*-351 XbaI A/G and *PGR* PROGINS polymorphisms in Brazilian breast cancer-unaffected women.

[Giacomazzi J](#), [Aguilar E](#), [Palmero EI](#), [Schmidt AV](#), [Skonieski G](#), [Filho DD](#), [Bock H](#), [Saraiva-Pereira ML](#), [Ewald IP](#), [Schuler-Faccini L](#), [Camev SA](#), [Caleffi M](#), [Giugliani R](#), [Ashton-Prolla P](#).

Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brasil.

PMID: 22584640 [PubMed - as supplied by publisher]

Abstract

Polymorphisms of hormone receptor genes have been linked to modifications in reproductive factors and to an increased risk of breast cancer (BC). In the present study, we have determined the allelic and genotypic frequencies of the *ERα*-397 PvuII C/T, *ERα*-351 XbaI A/G and *PGR* PROGINS polymorphisms and investigated their relationship with mammographic density, body mass index (BMI) and other risk factors for BC. A consecutive and unselected sample of 750 Brazilian BC-unaffected women enrolled in a mammography screening program was recruited. The distribution of *PGR* PROGINS genotypic frequencies was 72.5, 25.5 and 2.0% for A1A1, A1A2 and A2A2, respectively, which was equivalent to that encountered in other studies with healthy women. The distribution of *ERα* genotypes was: *ERα*-397 PvuII C/T: 32.3% TT, 47.5% TC, and 20.2% CC; *ERα*-351 XbaI A/G: 46.3% AA, 41.7% AG and 12.0% GG. *ERα* haplotypes were 53.5% PX, 14.3% Px, 0.3% pX, and 32.0% px. These were significantly different from most previously published reports worldwide ($P < 0.05$). Overall, the *PGR* PROGINS genotypes A2A2 and A1A2 were associated with fatty and moderately fatty breast tissue. The same genotypes were also associated with a high BMI in postmenopausal women. In addition, the *ERα*-351 XbaI GG genotype was associated with menarche ≥ 12 years ($P = 0.02$). *ERα* and *PGR* polymorphisms have a phenotypic effect and may play an important role in BC risk determination. Finally, if confirmed in BC patients, these associations could have important implications for mammographic screening and strategies and may be helpful to identify women at higher risk for the disease.

G10. *GSTM1*, *GSTT1* and *GSTP1* polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening

Rev Bras Epidemiol. 2012 Jun;15(2):246-55.

***GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1* polymorphisms, breast cancer risk factors and mammographic density in women submitted to breast cancer screening.**

Aquiar ES, Giacomazzi J, Schmidt AV, Bock H, Saraiva-Pereira ML, Schuler-Faccini L, Duarte Filho D, Santos PA, Giugliani R, Caleffi M, Camey SA, Ashton-Prolla P.

Program in Medicine, Medical Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Abstract

Genetic polymorphisms in genes related to the metabolism of xenobiotics, such as genes of the glutathione S-transferases (*GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*) superfamily have been associated with an increased risk for breast cancer (BC). Considering the high incidence of BC in the city of Porto Alegre in southern Brazil, the purpose of this study was to characterize genotypic and allelic frequencies of polymorphisms in *GSTM1*, *GSTT1*, and *GSTP1*, and correlate these molecular findings with established risk factors for breast cancer including mammographic density, in a sample of 750 asymptomatic women undergoing mammographic screening. Molecular tests were performed using the multiplex polymerase chain reaction (PCR) for *GSTM1* and *GSTT1*, and quantitative PCR for *GSTP1* polymorphisms. Overall, the frequencies of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes were 45% and 21%, respectively. For *GSTP1* polymorphism, genotypic frequencies were 44% for the Ile/Ile genotype, 44% for the Ile/Val genotype, and 12% for Val/Val genotype, with an allelic frequency of 66% for the wild type allele in this population, similar to results of previous international publications. There was a statistically significant association between the combined *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes (M-/T-) and mammographic density in post menopausal women ($p = 0.031$). When the *GSTT1* null (T-) genotype was analyzed isolated, the association with mammographic density in post menopausal women and in the overall sample was also statistically significant ($p = 0.023$ and $p = 0.027$, respectively). These findings suggest an association of *GSTM1* and *GSTT1* null genotypes with mammographic density.

PMID: 22782090 [PubMed - in process]

G11. Breast cancer risk estimates, body mass index and breast density in women submitted to mammographic screening in an underserved population

(Aceito para publicação no *Cadernos de Saúde Coletiva* – confirmação: 044)

Belo-Reyes V, Giacomazzi J, Schmidt AV, Santos-Silva P, Skonieski G, Duarte Filho D, Caleffi M, Giugliani R, Ashton-Prolla P, Camey SA.

Abstract

Background: Several models of breast cancer risk estimation have been created and among these, the Gail model is commonly used, however, in Latin American women submitted to mammographic screening, there are no reports on its performance.

Objectives: Assess breast cancer risk estimates (BCRE) using the Gail 2 model and the prevalence of BC risk factors (body mass index, mammographic density and BIRADS classification), and its relationship to the BCRE.

Methods: Clinical data of 3,665 women aged 40-69 years enrolled in a mammographic screening program in Brazil were obtained by review of medical records. BCRE were calculated using Gail 2 model.

Results: The average BCRE in 5 years was 1.0% (range: 0.4-4.8%; standard deviation (SD)=0.4%) and in lifetime was 7.9% (range 2.6-39.0%, SD=2.6%). In 6.7% of the sample, it was $\geq 1.67\%$. When assessing BC risk factors not included in the Gail 2 model, we observed increased breast density associated with higher BCRE ($p < 0.001$).

Conclusions: BCRE obtained were similar to those observed in other countries. None of the BC risk factors included in the Gail 2 model was overestimated. Higher breast densities were observed in women with higher BCRE. Inclusion of breast density in the Gail 2 model may increase its performance.

G12. Increased oxidative damage in carriers of the germline *TP53* p.R337H mutation

(Aceito para publicação na *PLOS ONE* – confirmação: PONE-D-12-18650)

Macedo G, Motta LL, Giacomazzi J, Vanzin CS, Manfredini V, Netto CBO; Vargas CR, Hainaut P, Klamt F, Ashton-Prolla P.

Abstract

Germline mutations in *TP53* are the underlying defect of Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and Li-Fraumeni-like (LFL) Syndrome, autosomal dominant disorders characterized by predisposition to multiple early-onset cancers. In Brazil, a variant form of LFS/LFL is commonly detected due to the high population prevalence of a founder mutation at codon 337 in *TP53* (p.R337H). The p53 protein exerts multiple roles in regulating oxidative metabolism and cellular anti-oxidant defense systems. Here, we have analyzed redox parameters in blood samples of p.R337H mutation carriers (C, n=17) and non-carriers (NC, n=17). We report a significant increase in erythrocyte GPx activity and in plasma carbonyl content (indicative of protein oxidative damage) in carriers as compared to non-carriers ($P = 0.048$ and $P = 0.035$, respectively). Mutation carriers also showed a four-fold increase in malondialdehyde (MDA) levels, a marker of lipid peroxidation (C= 40.20 ± 0.71 , NC= 160.5 ± 0.88 , $P < 0.0001$). Finally, mutation carriers showed an increased total antioxidant status (TAS), but a decrease in plasma ascorbic acid content. Our findings suggest that *TP53* p.R337H mutation carriers may present an imbalance in oxidative metabolism, with evidence in favor of oxidative damage.

G13. Association of adipokines and adhesion molecules with indicators of obesity in women undergoing mammography screening

(Submetido à *Nutrition & Metabolism*)

Souza C, Ettrich B, Cibeira GH, Giacomazzi J, Tusset P, Ashton-Prolla P, Medeiros LR, Caleffi M, Camargo Neto E, Moriguchi EH, Rosa DD, Graudenz MS.

Abstract

Background: The soluble cell adhesion molecules and adipokines are elevated in patients with obesity, hypertension, type 2 diabetes mellitus, breast cancer and atherosclerosis **Objective:** To investigate the relationship between anthropometric profile, dietary intake, lipid profile and fasting glycemia with serum levels of adipokines (adiponectin and PAI-1) and adhesion molecules (ICAM-1 and VCAM-1) in women without breast cancer undergoing routine mammographic screening. **Design:** transversal study. **Subjects:** one hundred and forty-five women over 40-years old participated in this study. **Results:** in 39.3% of cases the BMI was above 30 kg/m²; 46.9% had hypertension, 14.5% had type 2 Diabetes Mellitus, 31.7% had dyslipidemia and 88.3% presented a waist-to-hip ratio ≥ 0.8 . A linear correlation was found between serum levels of PAI-1 and triglycerides, between serum levels of PAI-1 and WHR and between serum levels of VCAM-1 and BMI. **Conclusion:** PAI-1 and VCAM-1 levels are correlated with clinical indicators of obesity and overweight.