

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Aspectos moleculares emergentes relacionados ao gene *TP53* e à Síndrome de Li-Fraumeni: prevalência de variantes funcionais, modificadores de fenótipo e regulação por miRNAs

Igor Araujo Vieira

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Genética e Biologia Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla

Co-orientador: Dr. Gabriel de Souza Macedo

Porto Alegre, Agosto de 2021.

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA), e *Canada-Israel Health Research Initiative*, financiada conjuntamente pelos *Canadian Institutes of Health Research, Israel Science Foundation, International Development Research Centre (Canadá) e Azrieli Foundation*.

Dedicatória

Dedico essa tese a todos os pacientes diagnosticados com câncer e/ou Síndrome de Li-Fraumeni que participaram dos nossos estudos. Também dedico ao meu irmão e padrasto falecidos, William e Rubinho, a minha mãe Lia e ao meu namorado Kendi. Muito obrigado por TUDO e por TANTO, sem vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Agradecimentos

Aos meus orientadores, Profa. Patricia Ashton-Prolla e Dr. Gabriel de Souza Macedo, pelo aprendizado enorme e pelas oportunidades incríveis de crescimento profissional que me proporcionaram nos últimos 9 anos em que faço parte do grupo de pesquisa, bem como pela confiança no meu trabalho e pelo apoio, paciência e compreensão nos momentos desafiadores da minha vida pessoal. À Patricia (a partir de agora prometo que vou abrir mão das formalidades), agradeço pela maneira gentil e pelo “olhar humano” que sempre teve comigo. Mesmo diante da sua rotina intensa, sempre teve um sorriso no rosto e demonstrou leveza, cuidado e preocupação em saber como eu estava me sentindo (“- Igor, primeiro me conta: como tu estás?...tudo bem contigo?...e as novidades?”). Você é um exemplo de professora e pesquisadora-gestora no qual me espelho para seguir minha carreira acadêmica, e me sinto honrado em poder dizer que sou um dos seus “filhos científicos”. Ao Gabriel, agradeço pelos inúmeros ensinamentos desde o período da IC que contribuíram para o meu amadurecimento como “cientista”, por ter me transmitido a autoconfiança que, inicialmente, eu não tinha no meu trabalho, bem como a tranquilidade e a motivação necessárias para eu seguir nessa jornada (“- Igor, não te estressa com isso, lembra que tem coisas mais importantes nessa vida”) e, especialmente, por ter sido quem apostou em mim e “abriu as portas” do laboratório em 2013.

A todos os colaboradores dos projetos de pesquisa vinculados ao doutorado, em especial àqueles que participaram ativamente no desenvolvimento dos artigos que compõem esta tese: Eduarda Pezzi, Isabel Bandeira, Bruna Fernandes, Larissa Reis, Fernanda Vianna, Tiago Andreis, Yasminne Rocha, Edenir Palmero, Maria Isabel Achatz, Dirce Carraro e Maria Nirvana Formiga. Agradeço a minha amiga do coração e colaboradora Isabel pelo apoio, parceira científica motivadora e produtiva, e imensa ajuda na concepção e condução dos estudos sobre os miRSNPs; além das ex-alunas de IC envolvidas no meu projeto, Eduarda e Bruna, que se tornarem minhas amigas para vida. A vocês duas, deixo registrada minha gratidão pela grande dedicação, profissionalismo e por terem sido os meus “braços direito e esquerdo” na organização e execução das atividades de bancada.

A todos os colegas e amigos do Laboratório de Medicina Genômica (LMG) que não foram mencionados anteriormente: Pati Silva, Cleandra Gregório, Liliane Todeschini, Marina Scheid, Bruno Côrrea, Guilherme Viola, Bárbara Alemar, Camila Bittar, Mariana Botton, Taiana Haag, Clévia Rosset, Mari Furtado, Johanna Nehm, Gustavo Stumpf, Thayne Kowalski e Ivaine Sartor. Obrigado pela parceria, incentivo e aprendizado durante a convivência no laboratório.

Aos grandes “amigos” que me acompanharam durante essa jornada do doutorado: Isabel, Ethi, Marcus, Ane, Martiela, Joice, Bruno, Ju Amaral, Pati Lu e o meu amigo canino Bruce. A vocês, deixo registrada minha gratidão pela amizade verdadeira, que acabou se consolidando nessa fase mais madura da minha vida. Obrigado pela força e apoio psicológico (o valioso “ombro amigo”), pelas risadas, gordices e inúmeras horas de terapia gratuita.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa Experimental do HCPA, especialmente o Everaldo Almeida pelo constante suporte, parceria e atenção. Ao Elmo do PPGBM, muito obrigado pela ajuda em todas as questões burocráticas, agilidade e atenção de sempre. Aos membros da banca de avaliação desta tese, pelas contribuições e disponibilidade em avaliar nosso trabalho.

A todos os professores que fizeram parte da minha formação, desde as séries iniciais até a pós-graduação, pelo seu nobre trabalho, dedicação e empatia. Em especial, à Profa. Marlen Santana, que durante suas aulas no ensino médio despertou, pela primeira vez, o meu interesse pela área de Genética e Biologia Molecular. O ensino público, aliado ao comprometimento e à paixão que adquiri por estudar, transformou a minha vida e a da minha família. Ele me presenteou em 2010 com a aprovação em último lugar no vestibular para Biomedicina na UFRGS, um dos momentos mais felizes e marcantes da minha história.

A todos os pacientes diagnosticados com câncer e/ou Síndrome de Li-Fraumeni que aceitaram participar dos nossos estudos, nosso muito obrigado por terem acreditado na ciência e contribuído para a aquisição de novos conhecimentos nas áreas de Oncogenética e Oncologia Molecular.

A minha família: mãe Lia, pai Rubinho (*in memorium*) e mano William (*in memorium*). Agradeço o apoio e zelo incondicionais, bem como a educação e valores recebidos, mas principalmente pelo grande esforço para que não me faltasse nada durante minha caminhada de estudos. Muito obrigado por acreditarem no meu potencial, por viverem esse sonho comigo e ajudarem a concretizá-lo. Ao Rubinho e ao William (*in memorium*), agradeço por toda a torcida e boas energias que estão me transmitindo lá da “morada de paz” na qual se encontram. Embora tenhamos enfrentado muitas adversidades e conflitos nesta vida terrena, minha maior felicidade é saber que o amor (aquele mais genuíno), o carinho e a aceitação sempre se renovaram e prevaleceram em nossa família. Por fim, minha gratidão eterna ao meu namorado Kendi por ser um companheiro de vida maravilhoso, pelo amor, carinho, amizade e cumplicidade, por ter assumido praticamente todos os afazeres do nosso lar na reta final do doutorado, e pela paciência e conselhos nos momentos de correria e dificuldade. 愛してる (Aishiteru), MOR!

(A música me acompanhou nos melhores e piores momentos da vida, e agora não seria diferente...)

***“...People tell me honey
Yalla balaganim
One day dreams will become true
Set me free
Feel my beating heart in perfect harmony
Don't let me down...”***

Set Me Free, canção escrita por Amit Mordechai, Ido Netzer, Noam Zaltin e Ron Carmi. Interpretada por Eden Alene, representante de Israel no *Eurovision* 2021.

Sumário

Resumo	8
Abstract	10
Lista de abreviaturas.....	11
Capítulo I – Introdução	12
1.1. Síndromes de predisposição hereditária ao câncer	13
1.2. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF).....	15
1.3. O gene <i>TP53</i> e a proteína p53: estrutura, domínios e funções celulares	21
1.4. Variabilidade genética no gene <i>TP53</i>	24
1.4.1. Variante fundadora patogênica <i>TP53</i> c.1010 G>A (p.Arg337His)	27
1.4.2. Região 3'UTR e a variante funcional <i>TP53</i> rs78378222.....	32
1.5. Modificadores de fenótipo na SLF	34
1.6. miRNAs e miRSNPs: potenciais modificadores de fenótipo na SLF.....	37
1.6.1. miRNAs: da biogênese aos mecanismos de regulação.....	38
1.6.2. miRNAs em câncer, regulação de p53 e papel de miRSNPs na SLF	40
Capítulo II – Justificativa.....	44
Capítulo III – Objetivos	46
3.1. Objetivo geral.....	47
3.2. Objetivos específicos	47
Capítulo IV – Artigo 1.....	48
<i>Prevalence of the Brazilian TP53 Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients?</i>	
Manuscrito publicado	
Capítulo V – Artigo 2.....	59
<i>Revisiting the prevalence of a TP53 polyadenylation signal variant (rs78378222) in cohorts of lung and prostatic adenocarcinomas: further evidence from southern Brazil and overview of previous functional findings</i>	
Manuscrito a ser submetido	

Capítulo VI – Artigo 3.....	92
<i>MIR605 rs2043556 is associated with the occurrence of multiple primary tumors in TP53 p.(Arg337His) mutation carriers</i>	
Manuscrito publicado	
Capítulo VII – Artigo 4.....	98
<i>Functional pri-miR-34b/c rs4938723 and KRAS 3'UTR rs61764370 SNPs: novel phenotype modifiers in Li-Fraumeni syndrome?</i>	
Manuscrito a ser submetido	
Capítulo VIII – Resultados adicionais.....	140
8.1. Introdução.....	141
8.2. Metodologia	142
8.3. Resultados parciais e discussão preliminar.....	143
Capítulo IX – Discussão Geral	148
9.1. Prevalência das variantes funcionais em <i>TP53</i> rs121912664 (R337H, éxon 10) e rs7837822 (3'UTR) em coortes de pacientes com diferentes tipos de tumores.....	149
9.2. Estudos de modificadores de fenótipo da SLF e da regulação da via de p53 por miRNAs	152
Capítulo X – Conclusões e Perspectivas	158
Capítulo XI – Referências Bibliográficas.....	164
Capítulo XII – Produção Científica Adicional no Período.....	182
12.1. Artigos publicados no período do doutoramento	183
12.2. Artigos em preparação ou aceitos no período do doutoramento	184
Capítulo XIII – Anexos	185
13.1. Premiação na 40ª Semana Científica do HCPA	186
13.2. Prêmio de produtividade do PPGBM-UFRGS	187
13.3. Premiação na 38ª Semana Científica do HCPA	188
13.4. Cartas de aprovação dos projetos de pesquisa.....	189
13.4.1. Investigação das variantes funcionais de <i>TP53</i> em casos de adenocarcinomas de pulmão e próstata e leiomioma uterino.....	189
13.4.2. Estudo dos modificadores de fenótipo na SLF	201

Resumo

Introdução: A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo risco aumentado de câncer de mama, sarcomas, tumores cerebrais e adrenocorticais (tumores centrais da SLF), bem como outras neoplasias em idade jovem em indivíduos portadores de variantes germinativas patogênicas (VGP) em *TP53*. Nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a VGP fundadora *TP53* R337H está presente em 0,3% da população geral. Outra variante funcional no gene, rs78378222 (A>C), altera o sinal de poliadenilação e tem sido associada com risco para câncer em geral. **Objetivos:** Considerando a heterogeneidade clínica observada em portadores da VGP R337H e a importância dos miRNAs como reguladores de p53, os objetivos desta tese foram: **(a)** determinar a prevalência das variantes funcionais *TP53* R337H e rs78378222 em pacientes com diferentes tipos de tumores da região Sul do Brasil; **(b)** atualizar a rede de miRNAs envolvida na regulação da via de p53; e **(c)** investigar o papel de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes de miRNAs (miRSNPs) que regulam indiretamente p53 como potenciais modificadores de fenótipo em portadores da variante R337H. **Resultados:** Dentre os principais achados podemos destacar: **(a)** identificação de uma baixa prevalência tanto de portadores da VGP fundadora R337H em amostras de adenocarcinoma de pulmão (análise somática; 1,2%), quanto da variante funcional rs78378222 em cortes de pacientes com adenocarcinomas de pulmão (análise somática; 1%) e próstata (análise germinativa; 0,65%), em comparação com achados prévios; **(b)** obtenção de uma rede atualizada contendo 26 genes da via de p53 e 238 interações miRNA-alvo validadas experimentalmente; e **(c)** seleção de miRSNPs funcionais relacionados a miR-605 (rs2043556 A>G) e miR-34 (rs4938723 T>C), permitindo identificar que, em portadores da R337H, o genótipo *MIR605* rs2043556[G/G] está associado com a ocorrência de múltiplos tumores primários e *pri-miR-34b/c* rs4938723[C/C] associado com o desenvolvimento de tumores não-centrais da SLF. **Conclusões:** Em comparação com estudos anteriores, as prevalências das variantes funcionais de *TP53* aqui obtidas sugerem que existem variações regionais e tumor-específicas, enquanto os achados do papel dos miRSNPs no contexto da SLF mostram a importância da análise de genes de miRNAs reguladores da atividade de p53 como potenciais modificadores de fenótipo da doença.

Palavras-chave: Síndrome de Li-Fraumeni, proteína p53, modificadores de fenótipo, miRNAs.

Abstract

Introduction: Li-Fraumeni syndrome (LFS) is an autosomal dominantly inherited disorder characterized by an increased risk of early-onset breast cancer, sarcomas, brain and adrenocortical tumors (LFS core tumors) and other neoplasms in individuals harboring germline *TP53* pathogenic variants (GPV). In Southern and Southeastern regions of Brazil, the founder GPV *TP53* R337H has been detected in 0.3% of the general population. Another functional variant in the gene, rs78378222 (A>C), changes the polyadenylation signal and has been associated with increased risk of cancer in general. **Objectives:** Given the clinical heterogeneity observed in carriers of GPV R337H and the importance of miRNAs as regulators of p53 expression, the objectives of this thesis were: **(a)** determine the prevalence of the functional variants *TP53* R337H and rs78378222 in patients with different tumor types from Southern Brazil; **(b)** update the network of miRNAs involved in the p53 pathway regulation; and **(c)** investigate the role of single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in miRNA genes (miRSNPs) that indirectly regulate p53 as potential phenotype modifiers in R337H carriers. **Results:** Among the main findings, we can highlight: **(a)** when compared with previous findings, identification of a low carriers' prevalence of both the founder GPV R337H in lung adenocarcinoma samples (somatic analyses; 1.2%) and the functional variant rs78378222 in cohorts of patients diagnosed with lung (somatic analyses; 1%) and prostate adenocarcinomas (germinative analyses; 0.65%); **(b)** generation of an updated network containing 26 genes of the p53 signaling pathway and 238 experimentally validated miRNA-target interactions; and **(c)** selection of functional miRSNPs related to miRNA families miR-605 (rs2043556 A>G) and miR-34 (rs4938723 T>C), allowing to identify that the *MIR605* rs2043556[G/G] homozygous genotype is associated with the occurrence of multiple primary tumors as well as *pri-miR-34b/c* rs4938723[C/C] genotype is associated with the development of LFS non-core or atypical tumors in R337H carriers. **Conclusions:** Compared to previous studies, the prevalence of functional *TP53* variants found here suggest that there may be regional and tumor-specific frequency variations, while the findings about the role of miRSNPs in the LFS context demonstrate the importance in evaluating genes encoding miRNAs that regulate p53 activity as potential phenotype modifiers.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, p53 protein, phenotype modifiers, miRNAs.

Lista de abreviaturas

- APC** - *Adenomatous Polyposis Coli Gene*
- BRCA1** - *Breast Cancer Susceptibility Gene 1*
- BRCA2** - *Breast Cancer Susceptibility Gene 2*
- CNVs** - Variações no número de cópias de DNA (*Copy Number Variations*)
- DBD** - Domínio de ligação ao DNA de p53 (*DNA Binding Domain*)
- DNA** - Ácido Desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
- HBOC** - Câncer de mama e ovário hereditários (*Hereditary Breast and Ovarian Cancer*)
- IARC** - Agência Internacional de Pesquisas em Câncer (*International Agency for Research on Cancer*)
- KRAS** - *v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
- LFL** - Síndrome de Li-Fraumeni-like (*Li-Fraumeni-like Syndrome*)
- MAF** - Frequência do alelo menos comum (*Minor Allele Frequency*)
- miRISC** - Complexo de Silenciamento Induzido por RNA (*miRNA-Induced Silencing Complex*)
- miRNA** - **microRNA**
- miRSNPs** – SNPs em genes de miRNAs
- mRNA** - RNA mensageiro (*messenger RNA*)
- OD** - Domínio de oligomerização de p53 (*Oligomerization Domain*)
- PAS** - Sinal de poliadenilação (*Polyadenylation Signal*)
- pb** - Pares de bases (*base pairs*)
- PIN3** - Polimorfismo do íntron 3 de *TP53* (*Polymorphism Intron 3*)
- p53 RE** - Elemento de resposta a p53 (*p53 Response Element*)
- p53wt** - Proteína p53 selvagem (*p53 wild-type*)
- p53mut** - Proteína p53 mutante (*p53 mutant*)
- RNA** - Ácido Ribonucleico (*Ribonucleic acid*)
- R337H** - Arg337His (mutação fundadora brasileira no gene *TP53*)
- SLF** - Síndrome de Li-Fraumeni (*Li-Fraumeni Syndrome*)
- SNP** - Polimorfismo de nucleotídeo único (*Single Nucleotide Polymorphism*)
- TP53** - *Tumor Protein p53 Gene*
- VGP** - Variantes Germinativas Patogênicas
- 3'UTR** - Região 3' não-traduzida (*3' Untranslated Region*)

1.1. Síndromes de predisposição hereditária ao câncer

A maioria das neoplasias humanas resulta de interações complexas entre o componente genético do indivíduo e os fatores de exposição ambientais, o que chamamos de herança multifatorial. No entanto, um pequeno percentual destes casos decorre principalmente de alterações herdadas na sequência do DNA, conferindo um risco aumentado para o desenvolvimento de tumores em comparação com aquele observado na população geral (INCa, 2009; Kinzler e Vogelstein, 1998). Um estudo de 1866 que avaliou diferentes gerações de uma família com vários casos de tumores de mama em idade precoce foi o primeiro a especular sobre formas hereditárias de câncer (Hodgson, 2008). Quando o tumor ocorre como parte de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer, a alteração inicial causadora do mesmo é herdada através da linhagem germinativa e, portanto, já está presente em cada célula do corpo, desde a formação do embrião (Garber e Offit, 2005; De la Chapelle e Peltomäki, 1998). Atualmente, estima-se que cerca de 5 a 10% de todos os tumores estejam relacionados à predisposição hereditária e diretamente associados a variantes germinativas patogênicas (VGP) situadas em genes de alta e moderada penetrância para o câncer (Ferreira e Rocha, 2010; Han e Kim, 2021).

Nas últimas cinco décadas, grande parte dos avanços no conhecimento sobre as bases moleculares do câncer tem sido realizados. Dezenas de genes envolvidos no desenvolvimento de neoplasias foram identificados e divididos em 3 classes principais: genes supressores de tumor, oncogenes e genes de reparo do DNA (De la Chapelle e Peltomäki, 1998). Os genes supressores de tumor geralmente são reguladores negativos da proliferação celular e sua perda de função promove o desenvolvimento de câncer. Esses genes atuam, na maioria das vezes, de uma forma recessiva, uma vez que sua perda de função decorre da inativação bialélica na célula diploide somática por meio de variantes deletérias ou outros mecanismos que interfiram na sua expressão, levando à inativação funcional total ou parcial da proteína codificada pelo gene (Osborne et al., 2004). Essa “hipótese de dois eventos” foi inicialmente proposta pelo pesquisador Alfred Knudson no contexto de tumorigênese do retinoblastoma, neoplasia na qual ambos os alelos do gene *RB1* devem ser inativados para desencadear o fenótipo maligno (Knudson, 1971). Em contraste, os proto-

oncogenes são responsáveis por estimular a proliferação celular em condições normais. Quando mutados, seus produtos proteicos podem adquirir uma atividade ou função aumentada, passando a ser chamados de oncogenes (Croce, 2008; Osborne et al., 2004). Dessa forma, alterações ativadoras em uma única cópia de um proto-oncogene podem exibir um efeito dominante em promover a proliferação celular, conferindo predisposição ao câncer. Um proto-oncogene pode ser convertido de um gene celular considerado “normal” (desempenhando suas funções constitutivas) a um oncogene através de variações de sequência pontuais, pequenas deleções/inserções, translocações cromossômicas e amplificação gênica (Ferreira e Rocha, 2010; Weinstein e Joe, 2008). Por fim, os genes de reparo do DNA são aqueles envolvidos nos processos constitutivos de reparo a danos no DNA, sejam eles espontâneos ou induzidos por fatores ambientais. Os danos ao DNA frequentemente são causados pela interação com o ambiente (exposição a radiações, nicotina e demais substâncias carcinogênicas) ou por conta do envelhecimento. A inativação desses genes de reparo leva ao acúmulo de alterações somáticas, o que pode ocasionar o favorecimento de uma instabilidade genômica (Bauer et al., 2015; Murga e Fernández-Capetillo, 2007). Geralmente o desenvolvimento de tumores ocorre quando o ambiente adverso contribui para esta instabilidade por um período suficientemente longo para permitir o acúmulo de um número crítico de alterações genéticas, especialmente em genes supressores de tumor e oncogenes (Ferreira e Rocha, 2010; Hanahan e Weinberg, 2011).

Este conhecimento culminou com a identificação dos genes associados às síndromes de câncer hereditário. Dentre estes, destacam-se os genes supressores de tumor *TP53* para a Síndrome de Li-Fraumeni (alvo do presente estudo) (Malkin et al., 1990); *APC* para a Polipose Adenomatosa Familiar (Grodin et al., 1991); e *BRCA1* e *BRCA2* para a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1994); bem como os genes do sistema de reparo de pareamento incorreto do DNA (sistema MMR, *Mismatch Repair*) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2* para Síndrome de Câncer Colorretal Hereditário não-Polipomatoso ou Síndrome de Lynch (Leach et al., 1993; Liu et al., 1996), entre outros. A maioria dessas síndromes apresenta um padrão de herança autossômico dominante e é causada por VGP de perda de função em genes supressores de tumor (Tucker e Friedman, 2002). Além

disso, foi verificado que o espectro de tipos tumorais desenvolvido nas famílias afetadas tende a ser característico de cada síndrome (Committee, 2019; Garber e Offit, 2005). Estas descobertas permitiram a criação de abordagens metodológicas para diagnóstico molecular destas síndromes de câncer hereditário e estimularam o desenvolvimento de programas de avaliação clínica, aconselhamento genético de famílias em risco e proposição de intervenções de redução de risco (Biesecker e Garber, 1995; Ponder, 1997; Sidransky, 1997).

1.2. Síndrome de Li-Fraumeni (SLF)

No ano de 1969, os pesquisadores Frederick Li e Joseph Fraumeni, ao revisar registros médicos e atestados de óbito de 648 crianças norte-americanas diagnosticadas com rhabdomyosarcoma (neoplasia maligna originada a partir das células dos músculos estriados da musculatura esquelética), identificaram uma alta incidência de diferentes tipos de câncer em idade precoce entre os seus familiares. A partir dessa análise, observaram quatro famílias que apresentavam sarcomas de partes moles, câncer de mama e outros tumores acometendo crianças ou jovens adultos. A suscetibilidade aumentada ao câncer nestas famílias não foi caracterizada apenas pelo grande número de indivíduos afetados, mas também pela alta ocorrência de múltiplos tumores primários em jovens. A distribuição dos casos de câncer nesses agregados familiares sugeria um padrão de herança autossômico dominante e levou à descrição de uma nova síndrome de câncer familiar, denominada Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (Li e Fraumeni, 1969a, 1969b).

A SLF (OMIM #151623) consiste em uma síndrome monogênica, autossômica dominante e altamente penetrante de predisposição hereditária a vários tipos de tumores diagnosticados em idade precoce (Li e Fraumeni, 1969b; Malkin et al., 1990). O espectro de tumores observado em famílias SLF é heterogêneo, incluindo tumores pediátricos e tumores diagnosticados na vida adulta (Schneider et al., 2019). Conforme mostrado na **Figura 1**, os tumores mais frequentes em indivíduos com a doença, também denominados tumores centrais da síndrome (“*core tumors*”), são o câncer de mama (tumor mais frequente em mulheres afetadas), os sarcomas de partes moles e osteosarcomas, tumores do sistema nervoso central (em especial meduloblastoma e carcinoma de plexo

coroide) e carcinoma adrenocortical (IARC TP53 database, 2019; Li et al., 1988; Malkin, 2011). Outros tumores, tais como leucemias, melanoma, cânceres gástrico, colorretal, de tireoide, pulmão, rim e próstata, tumores de células germinativas e tumor de Wilms já foram descritos em várias famílias com SLF (Formiga et al., 2017; Gonzalez et al., 2009; Hartley et al., 1989; Masciari et al., 2011; Ruijs et al., 2010). Variações de sequência germinativas patogênicas (VGP) localizadas no gene supressor tumoral *TP53* estão associadas com a síndrome (Malkin et al., 1990).

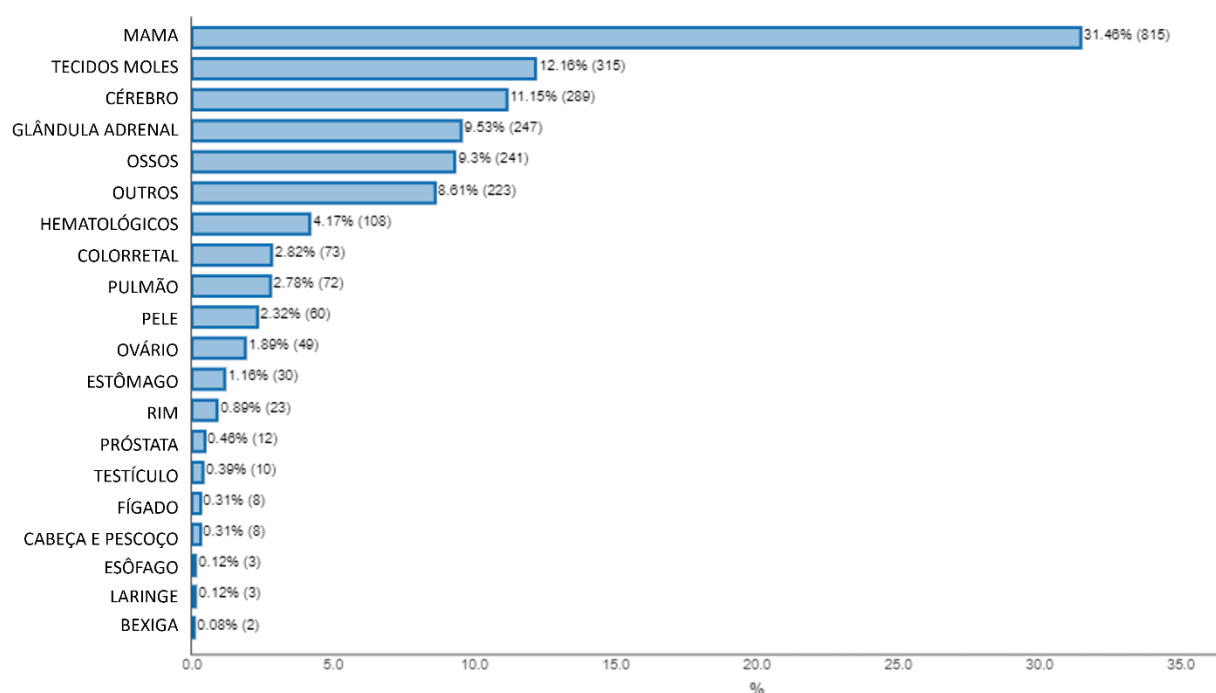


Figura 1. Tipos de tumores diagnosticados em portadores de variantes germinativas patogênicas no gene *TP53* (N=2591). **Modificado de IARC TP53 database (versão R20, julho de 2019).**

A suspeita clínica da SLF é baseada nos padrões de tumores observados no probando com suspeita da síndrome e em seus familiares de primeiro e segundo grau. O fenótipo clássico da SLF foi inicialmente caracterizado pela concentração familiar da ocorrência de tumores centrais da síndrome (Li e Fraumeni, 1969b; Malkin et al., 1990), sendo definido pela presença de todos os seguintes critérios: (1) a presença de um probando com diagnóstico de sarcoma antes dos 45 anos de idade; (2) acompanhado de um familiar em primeiro grau com algum câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade; (3) outro familiar em primeiro ou segundo grau também com câncer antes dos 45 anos de idade

ou um sarcoma em qualquer idade (Li et al., 1988). Sempre que presentes, estes critérios indicam claramente o teste genético para diagnóstico da síndrome (Figura 2).

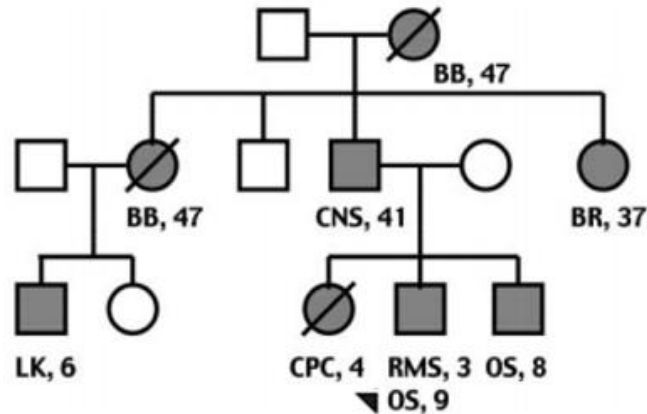


Figura 2. Exemplo de heredograma de uma família preenchendo os critérios clássicos para a SLF. O probando é indicado pela seta preta e os números representam a idade ao diagnóstico do tumor. BB, câncer de mama bilateral (*bilateral breast cancer*); CNS, tumor de sistema nervoso central (*central nervous system*); BR, câncer de mama unilateral (*breast cancer*); LK, leucemia (*leukemia*); CPC, carcinoma de plexo coroide; RMS, rabdomyosarcoma; OS, osteosarcoma. Modificado de Malkin, 2011.

Posteriormente, foram identificadas inúmeras famílias com VGP em *TP53* que apresentavam características clínicas incompletas (fenótipo mais brando) quando considerados os critérios clássicos da SLF. Nestas famílias com fenótipo similar, mas não inteiramente consistente com os critérios clássicos, foi verificada a ocorrência de outros tipos tumorais não descritos como “*core tumors*” (neoplasias hematológicas, melanoma, câncer gástrico e colorretal, entre outros), uma idade ao diagnóstico de câncer mais avançada e menor número de casos de câncer em comparação com as famílias preenchendo os critérios clássicos da síndrome (Frebourg et al., 2001; Olivier et al., 2003). Dessa forma, outros critérios menos restritivos, incluindo os de Birch e Eeles (Birch et al., 1994; Eeles, 1995), foram propostos para indicar o teste genético e investigação da SLF e de suas variantes fenotípicas, chamadas globalmente de Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL). É importante destacar que o termo LFL vem sendo cada vez menos utilizado, dando-se preferência à denominação genérica SLF para todas as famílias afetadas. Em 2001, Chompret e colegas sugeriram critérios mais amplos do que os clássicos, porém distintos dos critérios de Birch e Eeles

para selecionar pacientes com suspeita de LFS (Chompret et al., 2001), os quais foram atualizados no ano de 2015 (Bougeard et al., 2015). Atualmente, os critérios de Chompret revisados em 2015 tem sido recomendados pelo *The National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) para indicação de testes genéticos direcionados à suspeita clínica de SLF (Pilarski et al., 2019). A **Tabela 1** resume os diferentes critérios clínicos descritos até o momento para identificação de famílias e indivíduos com o fenótipo da síndrome.

O mecanismo molecular associado com a SLF foi esclarecido apenas em 1990 (Malkin et al., 1990). Anteriormente, análises de segregação já mostravam que a doença tinha uma etiologia genética. Variantes inativadoras somáticas no gene *TP53* já haviam sido detectadas nas formas esporádicas da maioria dos tipos de câncer associados com a SLF, incluindo osteossarcomas, sarcomas de partes moles, leucemias e carcinomas de mama (Nigro et al., 1989). Baseados nessas observações, Malkin e colaboradores (1990) sequenciaram o gene *TP53* em leucócitos de indivíduos com suspeita clínica de SLF. Estas análises resultaram na detecção de alterações entre os éxons 5-8 na região correspondente ao domínio de ligação ao DNA (DBD) da proteína p53, confirmando a associação entre VGP em *TP53* e o fenótipo SLF. Apesar da extensa investigação, até o momento este é o único gene que foi definitivamente associado à síndrome. Por outro lado, a prevalência de alterações germinativas identificadas nas regiões codificantes de *TP53* nas famílias SLF tem apresentado variação entre os diferentes estudos, sendo relatada uma prevalência destas alterações de aproximadamente 60-80% e 20-60% em famílias com SLF (forma clássica) e LFL (formas variantes), respectivamente (Bougeard et al., 2015; Kleihues et al., 1997; Malkin, 2011; McBride et al., 2014; Olivier et al., 2003; Varley, 2003).

Tabela 1. Diferentes critérios clínicos propostos para identificação de famílias com a Síndrome de Li-Fraumeni.

Critério	Referências	Descrição dos critérios
Clássico	(Li e Fraumeni, 1969b)	1) Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos); E 2) Familiar de 1º grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos); E 3) Familiar de 1º ou 2º grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
Birch	(Birch et al., 1994)	Câncer na infância ou sarcoma, tumor de SNC ou CAC antes dos 45 anos E familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da SLF em qualquer idade E familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 60 anos de idade.
Eeles	(Eeles, 1995)	1) Presença de dois familiares de 1º ou 2º grau com tumor típico da SLF em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor de SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata e pâncreas); OU 2) Sarcoma em qualquer idade no probando com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): câncer de mama (pacientes com idade ao diagnóstico inferior à 50 anos) e/ou tumor de SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata e pâncreas (pacientes com idade ao diagnóstico inferior à 60 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
Chompret 2001	(Chompret et al., 2001)	1) Sarcoma, tumor de SNC, CAC ou câncer de mama antes dos 36 anos E familiar de 1º ou 2º grau com câncer antes dos 46 anos ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade; OU 2) Múltiplos tumores, incluindo dois que sejam do tipo sarcoma, CAC, mama ou SNC, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar; OU 3) CAC em qualquer idade independente da história familiar.
Chompret 2009	(Bougeard et al., 2008; Tinat et al., 2009)	1) Probando com câncer típico da SLF antes dos 46 anos E familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da SLF antes dos 56 anos (exceto câncer de mama, caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores primários; OU 2) Probando com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da SLF e o primeiro antes dos 46 anos ou CAC em qualquer idade; OU 3) Câncer de mama antes dos 36 anos sem identificação de variante patogênica nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .
Chompret 2015	(Bougeard et al., 2015)	1) <u>Familiar</u> : Probando com tumor pertencente ao espectro tumoral clássico da SLF (por exemplo, câncer de mama na pré-menopausa, sarcoma de partes moles, osteossarcoma, tumor do SNC e carcinoma adrenocortical) antes dos 46 anos E pelo menos um parente de 1º ou 2º grau com tumor característico da SLF (exceto câncer de mama, se o probando tiver desenvolvido câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores; OU 2) <u>Múltiplos tumores primários</u> : Probando com múltiplos tumores (exceto múltiplos tumores de mama), dois dos quais pertencem ao espectro tumoral da SLF e o primeiro com ocorrência antes dos 46 anos de idade; OU 3) <u>Tumores raros</u> : Probando com carcinoma adrenocortical, tumor de plexo coroide ou rabiomiossarcoma do subtipo anaplásico embrionário, independentemente da história familiar; OU 4) <u>Câncer de Mama em idade jovem</u> : Câncer de mama antes dos 31 anos de idade

CAC, carcinoma adrenocortical; SNC, sistema nervoso central; SLF, Síndrome de Li-Fraumeni.

Estudos na Europa e Estados Unidos envolvendo participantes selecionados por história pessoal e familiar de câncer apontaram para uma taxa de portadores de mutação germinativa em *TP53* entre 1:5.000 a 1:20.000 nascidos-vivos (Gonzalez et al., 2009; Lalloo et al., 2006). Embora repositórios contendo dados de sequenciamento completo do genoma de indivíduos brasileiros sem história pessoal e familiar de câncer tenham sido disponibilizados recentemente (Lerario et al., 2020; Naslavsky et al., 20AD), a prevalência de variantes germinativas que ocorrem entre os éxons 5-8 do gene *TP53* na população geral do Brasil ainda não foi investigada de maneira aprofundada. A única alteração patogênica no gene com a frequência estimada na população geral brasileira (~0,3%) é a variante fundadora *TP53* p.(Arg337His), localizada no éxon 10 correspondente ao domínio de oligomerização (OD) de p53 (Custódio et al., 2013), descrita em maiores detalhes a seguir.

Em relação à penetrância das VGP em *TP53* observadas na SLF e que se localizam na região DBD de p53 (éxons 5-8), esta foi estimada em 90-95% para ocorrência de câncer ao longo da vida (Brosh e Rotter, 2009). Evidências anteriores apontaram que o risco cumulativo até os 40 anos de idade é, em média, 50% e até os 60 anos, 90%, comparado com 1% observado na população em geral (Birch et al., 1998; Royds e Iacopetta, 2006). Um estudo recente reportou que portadores de VGP nas regiões codificantes (éxons 2-11) de *TP53*, especialmente mulheres com idade inferior a 31 anos e homens com menos de 46 anos, apresentaram um risco estimado de 50% para o desenvolvimento de um ou mais tumores, enquanto que para indivíduos acima de 70 anos para ambos os sexos, o risco se aproximou de 70%, podendo chegar a 100% (Mai et al., 2016). Mais recentemente, Amadou e colegas (2017) estimaram que os portadores de VGP em *TP53* apresentam riscos de 58% e 80% para desenvolver uma neoplasia em idades inferiores a 40 ou 70 anos, respectivamente. Na fase adulta, a penetrância foi maior nas mulheres por conta da alta ocorrência de tumores de mama entre 33 e 36 anos de idade (Amadou, 2017). De fato, a penetrância tende a ser variável de acordo com a idade, sexo e o tipo de VGP em *TP53* apresentada pelo paciente (Amadou, 2017; Mai et al., 2016). Além disso, tem sido descrita a existência de padrões temporais para desenvolvimento de tumores relacionados à SLF: (1) fase infantil (0-15 anos, correspondendo a 22% de todos os tumores diagnosticados na síndrome), caracterizada

predominantemente pela ocorrência de carcinoma adrenocortical, carcinoma de plexo coroide, meduloblastoma e rabiomiossarcoma; (2) fase adulta jovem (16-50 anos, 51% dos tumores diagnosticados), apresentando um amplo espectro tumoral que inclui câncer de mama (tumor mais frequente e diagnosticado em mulheres), osteosarcoma, sarcomas de tecidos moles, leucemias, astrocitomas, glioblastomas, cânceres colorretal e de pulmão; e (3) fase adulta tardia (51-80 anos, 27% dos tumores), incluindo principalmente tumores de próstata e pâncreas (Amadou et al., 2018; Bougeard et al., 2015).

Em 2020, uma plataforma *online* foi concebida para integração de dados clínicos e moleculares sobre a SLF obtidos a partir de um consórcio internacional, que inclui um total de 1.354 portadores de VGP em *TP53* (Mai et al., 2021). Além de ser uma ferramenta para suporte e conscientização das famílias afetadas, essa iniciativa de pesquisa colaborativa representa um caminho promissor para novos avanços no entendimento da doença.

1.3. O gene *TP53* e a proteína p53: estrutura, domínios e funções celulares

A família de genes *TP53* se destaca pela conservação evolutiva por cerca de 1 bilhão de anos, desde os primeiros organismos multicelulares, bem como pelos 40 anos da descoberta de que o membro mais estudado desta família, o gene *TP53* (OMIM #191170), é um gene supressor tumoral com papel chave em mecanismos de tumorigênese (Lane e Levine, 2010; Levine, 2020). Este gene, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), codifica a proteína p53 (Levine, 1989). Conforme ilustrado na **Figura 3A**, esse gene compreende 20 kb de DNA genômico e está dividido em 11 éxons, sendo o primeiro deles não-codificante (Hulla e Schneider, 1993; Isobe et al., 1986). p53 é uma fosfoproteína tetramérica com aproximadamente 53 kDa. Cada monômero de p53 apresenta 393 aminoácidos organizados em cinco domínios estruturais e funcionais bem definidos (**Figura 3B**): (I) um domínio de transativação amino-terminal (resíduos 20-62), responsável pela transativação de genes-alvo; (II) um domínio rico em prolinas (resíduos 63-97), necessário para interação com proteínas indutoras de apoptose; (III) um domínio central DBD (resíduos 102-292), altamente conservado evolutivamente, responsável pela ligação de p53 a sequências consenso de DNA localizadas nas regiões promotoras dos seus genes-alvo,

também denominadas elementos de resposta a p53 (p53 RE); (IV) um domínio de oligomerização (OD, resíduos 323-356), fundamental para dimerização e posterior formação de homotetrâmeros de p53; (V) um domínio carbóxi-terminal, envolvido na regulação da ligação ao DNA (resíduos 363- 393) (Beckerman e Prives, 2010; Bourdon et al., 2005; Dornan et al., 2003; Lane e Levine, 2010; Levine, 1997).

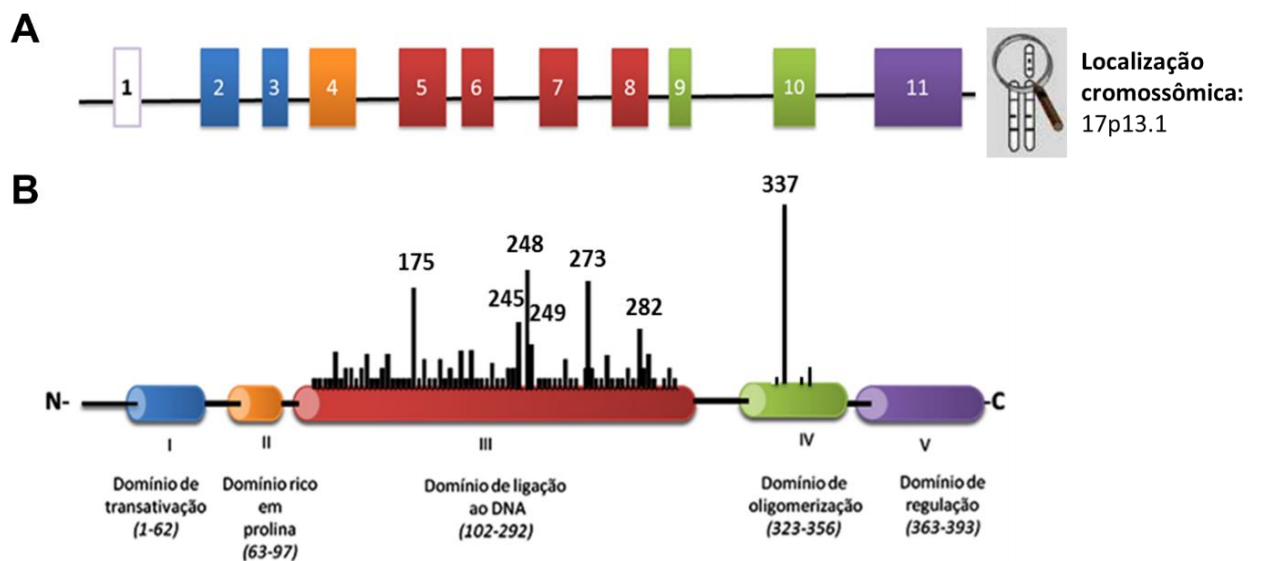


Figura 3. Representação esquemática da estrutura do gene *TP53* (A) e da proteína p53 com seus diferentes domínios funcionais (B). Nas Figuras A e B as diferentes cores correspondem aos domínios da proteína e os respectivos éxons codificantes (éxon 1 não é codificante). Em (B) são indicados os números dos resíduos de aminoácidos correspondentes a cada domínio. Também são mostrados os resíduos onde ocorrem as sete variantes patogênicas mais frequentes do gene, considerados códon “*hotspots*”, os quais estão situados no domínio de ligação ao DNA, com exceção do resíduo 337 no domínio de oligomerização, no qual ocorre a variante fundadora brasileira p.(Arg337His) que apresenta uma frequência populacional (cerca de 0,3%) maior do que qualquer outra já descrita para uma variante germinativa em *TP53*. Modificado de Bourdon et al., 2005 (Figura A), Brosh e Rotter, 2009 (Figura B), Achatz e Zambetti, 2016 (Figura B).

Em relação às funções celulares, p53 é um fator de transcrição de vida curta amplamente conhecido como “guardião do genoma”, devido ao seu papel fundamental na manutenção da fidelidade de replicação e integridade do material genético, bem como na indução de parada do ciclo celular, mecanismos de reparo do DNA e apoptose. p53 exerce essas múltiplas funções

antiproliferativas através do controle transcricional de diversos genes-alvo (**Figura 4**) e de interações proteína-proteína (Aubrey et al., 2016; Olivier et al., 2009). Em células normais não expostas a estresse, p53 selvagem (p53wt) é mantida em níveis muito baixos, devido a sua rápida degradação proteossomal mediada pela ubiquitina ligase MDM2, principal reguladora negativa da estabilidade e atividade de p53 codificada pelo gene *MDM2* (Luna et al., 1995; Vousden e Prives, 2009). As diferentes formas de estresse celular, especialmente eventos genotóxicos (dano ao DNA), promovem a estabilização e ativação de p53wt através de modificações pós-traducionais, permitindo que a proteína escape da degradação, seja translocada para o núcleo e tenha capacidade de se ligar em p53 RE situados nas regiões promotoras de centenas de genes-alvo, cuja expressão pode ser induzida ou reprimida dependendo do contexto celular e extensão do dano (Beckerman e Prives, 2010; Olivier et al., 2009).

A ativação de p53wt pode induzir a expressão de genes envolvidos em diversas funções celulares: parada de ciclo celular, apoptose, senescência, diferenciação, migração, reparo do DNA, inibição de angiogênese, e regulação do metabolismo energético e oxidativo (fosforilação oxidativa mitocondrial e defesa antioxidante) (Feng et al., 2011; Labuschagne et al., 2018; Lane e Levine, 2010; Sablina et al., 2005; Vousden e Lane, 2007). As duas últimas são as funções mais exploradas recentemente. A partir do estudo destas foi verificado um aumento na capacidade de fosforilação oxidativa e do estresse (dano) oxidativo em pacientes SLF portadores de diferentes VGP em *TP53* (Macedo et al., 2012; Wang et al., 2013), levando ao racional da testagem do fármaco metformina (inibidor de fosforilação oxidativa) como uma opção terapêutica potencial para redução do risco de câncer em pacientes SLF não-diabéticos (Walcott et al., 2020).

Em relação às propriedades funcionais da p53 mutante (p53mut), sabe-se que as variantes patogênicas em *TP53* associadas à ocorrência de tumores frequentemente causam não apenas perda das funções supressoras de tumor e um efeito dominante-negativo sobre as atividades da p53wt, mas também ganho de novas propriedades oncogênicas que promovem a tumorigênese independentemente da p53wt (ganho de função) (Brosh e Rotter, 2009; Yue et al., 2017; Zhang et al., 2016).

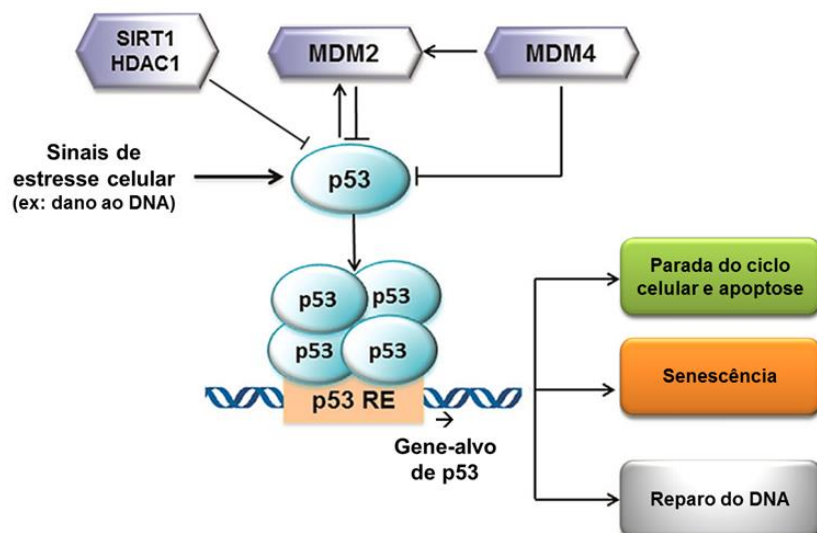


Figura 4. Esquema simplificado da via de p53 e suas principais funções supressoras de tumor. Em resposta aos sinais de estresse celular, p53 é ativado e, enquanto fator de transcrição com configuração de tetrâmero, regula a expressão de seus genes-alvo através do reconhecimento e ligação aos elementos de resposta a p53 (p53 RE) situados nas regiões promotoras destes genes, o que, por sua vez, modula diversos processos celulares, incluindo parada de ciclo celular, apoptose, senescência e reparo do DNA. **Modificado de Liu et al., 2017.**

1.4. Variabilidade genética no gene *TP53*

Variações de sequência somáticas em *TP53* ocorrem em praticamente todos os tipos de câncer. Cerca de 50% das neoplasias humanas contém alterações em *TP53*, sendo considerado o gene mais frequentemente mutado em tumores humanos (Olivier et al., 2004, 2010). Considerando todas as variantes somáticas e germinativas associadas a câncer identificadas em *TP53* e compiladas no banco de dados do IARC (*International Agency for Research on Cancer*), observa-se que a maioria delas é do tipo sentido trocado (*missense*) e estão concentradas na região correspondente ao DBD (éxons 5-8), podendo afetar a estrutura e a função da proteína (**Figura 5**) (IARC *TP53* database, 2019). Cerca de 30% das variantes *missense* patogênicas ocorrem em seis códons preferenciais ou *hotspots* (175, 245, 248, 249, 273 e 282), todos eles localizados no DBD de p53 (**Figuras 3B e 5B**). A distribuição de variantes germinativas associadas com a SLF é similar à de alterações somáticas, com a maioria das VGP *missense* (~80%) situadas nos mesmos resíduos *hotspots* (Hainaut e Hollstein, 1999; Hainaut e Pfeifer, 2016; Olivier et al., 2010; Petitjean et al., 2007).

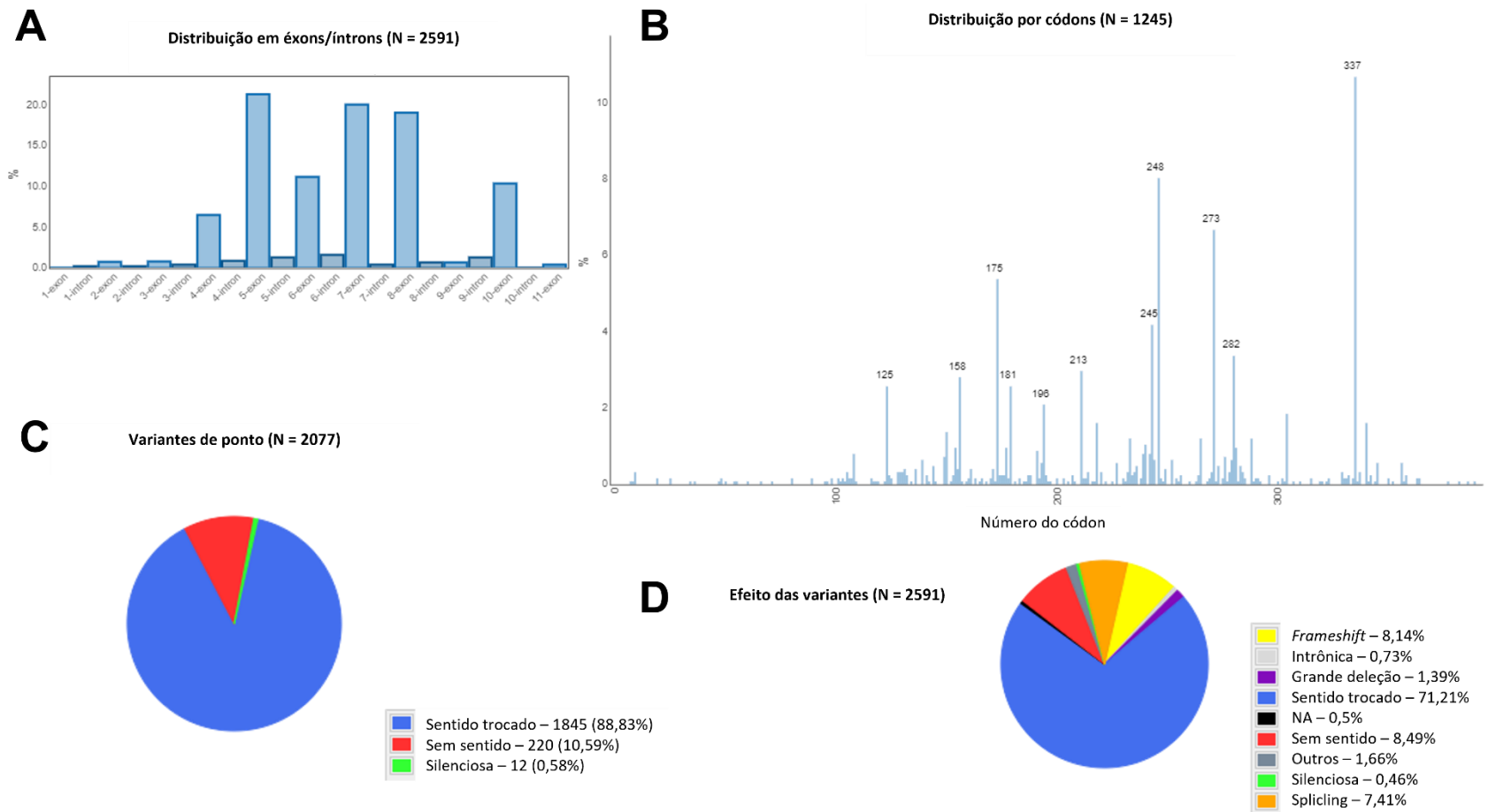


Figura 5. Distribuição das variações de sequência comumente identificadas em *TP53*, considerando a estrutura do gene e os domínios da proteína p53, bem como sua classificação quanto ao efeito funcional. **(A)** Distribuição das variantes mapeadas na estrutura do gene em diferentes tumores humanos. **(B)** Distribuição das alterações germinativas encontradas nos códons de *TP53* em famílias SLF. **(C)** Classificação das variantes de ponto detectadas no gene em tumores humanos quanto à troca de aminoácidos na proteína. **(D)** Classificação de todos os tipos de alterações de sequência encontrados em *TP53* em tumores quanto à localização no gene e efeito funcional. A maioria das variantes encontradas em *TP53* é do tipo sentido trocado (*missense*, Figuras C e D), situadas predominantemente nos éxons 5-8 (Figura A), correspondendo ao domínio de ligação ao DNA de p53 (códons 102 a 292, Figura B). **Modificado de IARC *TP53* database (versão R20).**

Grande parte das variantes *missense* patogênicas em *TP53* ocasionam a síntese de uma p53mut inativa, mas com estabilidade aumentada, levando ao aumento dos níveis de p53 no núcleo de células tumorais facilmente visualizado pela técnica de imuno-histoquímica (Bartek et al., 1991; Dowell et al., 1994; Yue et al., 2017). Entretanto, muitos tumores com variantes patogênicas não-*missense* no gene não apresentam acúmulo de p53mut, especialmente nos casos de variantes em sítios de *splicing*, *frameshift* e *nonsense* (Cole et al., 2016; Soussi e Bérout, 2001)

Por outro lado, dezenas de polimorfismos germinativos já foram identificados no locus *TP53*. Cerca de 90% deles estão localizados em íntrons e parecem não estar associados com suscetibilidade ao câncer. Embora para uma parcela significativa as alterações funcionais associadas ainda não tenham sido testadas, acredita-se que a maioria destas alterações não tenham um impacto fenotípico quanto à modulação do risco ao câncer (Doffe et al., 2021; Whibley et al., 2009). O polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) mais comum (MAF= 0,4) e estudado em *TP53* consiste na alteração *missense* c.215C>G p.(Pro72Arg, rs1042522). Ensaio *in vitro* e *in vivo* demonstraram que a proteína p53-Arg72 é um indutor mais potente de apoptose em comparação com aquela derivada do alelo Pro, caracterizando este como um SNP funcional (Dumont et al., 2003; Zhu et al., 2010). Estudos apontaram associações entre p.(Pro72Arg) e o risco para diversas neoplasias, mas os resultados são conflitantes (Van Heemst et al., 2005; Ørsted et al., 2007; Peng et al., 2013). No entanto, esse SNP tem sido consistentemente associado com resposta a agentes antineoplásicos em alguns tipos de tumor (Duldulao et al., 2013; Zha et al., 2016). Além disso, p.(Pro72Arg) está em desequilíbrio de ligação com PIN3 (*polymorphism intron 3*, rs17878362), um polimorfismo que consiste na duplicação de 16 pares de base (pb) no íntron 3 de *TP53* (Olivier et al., 2010; Pietsch et al., 2006).

Recentemente, alguns estudos têm reportado estimativas de prevalência populacional de alterações germinativas patogênicas e potencialmente patogênicas em *TP53* maior do que o esperado, a partir da análise de bancos de dados de sequenciamento completo de exoma e genoma obtidos de indivíduos não selecionados por história de câncer (de Andrade et al., 2017, 2019; Soussi et al., 2019). Uma destas estimativas, baseada em dados do gnomAD e utilizando critérios mais conservadores, é de 1 portador em 3.555-5.476

indivíduos (de Andrade et al., 2019), sugerindo que VGP em *TP53* podem ser mais frequentes na população geral do que se pensava, além da necessidade de uma avaliação mais aprofundada da penetrância destas variantes para o desenvolvimento de câncer. No entanto, também tem sido discutido que algumas variantes patogênicas em *TP53* identificadas inicialmente como germinativas podem ser na verdade somáticas e interpretadas equivocadamente como causadoras de SLF, mostrando que é essencial reconhecer quando uma variante patogênica é somática ao invés de germinativa, bem como diferenciar eventos de mosaicismos somáticos daqueles relacionados à hematopoiese clonal, ou seja, o surgimento de expansões clonais aberrantes contendo alterações de sequência em *TP53* restritas ao compartimento hematopoiético e associadas com a idade avançada e/ou exposição prévia a agentes quimioterápicos e radioterapia (Batalini et al., 2019; Weitzel et al., 2017).

1.4.1. Variante fundadora patogênica *TP53* c.1010 G>A (p.Arg337His)

Nas regiões sul e sudeste do Brasil, uma alteração germinativa patogênica localizada no OD de p53 (éxon 10 do gene *TP53*), a variante c.1010G>A (p.Arg337His, rs121912664), também conhecida como R337H, apresenta uma frequência na população geral muito maior a de qualquer outra VGP de *TP53* já descrita (Achatz et al., 2009; Pinto e Zambetti, 2020). Devido a um efeito fundador comprovado por diferentes estudos (Garritano et al., 2010; Paskulin et al., 2015; Pinto et al., 2004), a prevalência estimada desta variante é de 1 portador em cada 300 recém-nascidos vivos, sendo provavelmente responsável por uma parcela significativa dos casos de câncer diagnosticados nestas regiões brasileiras (Achatz e Zambetti, 2016; Custódio et al., 2013; Palmero et al., 2008). Por outro lado, é importante destacar que a ocorrência somática da alteração específica *TP53* c.1010G>A é extremamente rara, tendo sido identificada em apenas 4 de ~29.000 tumores sólidos no *IARC TP53 database* e em nenhum dos ~20.000 tumores no banco de dados denominado COSMIC (*Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer*) (COSMIC, 2020; IARC *TP53 database*, 2019).

Inicialmente, o alelo variante *TP53* p.(Arg337His) foi detectado em uma alta frequência (35/36, 97%) em crianças com carcinoma adrenocortical que

pertenciam a famílias sem histórico de incidência aumentada de câncer (Ribeiro et al., 2001), bem como em uma menor frequência (5/37, 13,5%) em adultos com tumores adrenocorticais esporádicos (Latronico et al., 2001). Investigações posteriores em famílias brasileiras associaram essa variante fundadora a um amplo espectro de tumores, similar ao observado em famílias com fenótipo clínico da síndrome de SLF. Nos últimos anos, tem sido relatado desde famílias portadoras da variante com um fenótipo idêntico ao da SLF até aquelas com poucos afetados por câncer, em que portadores permanecem saudáveis (sem desenvolver tumores) até uma idade avançada (Achatz et al., 2007; Giacomazzi et al., 2013a), evidenciando que esta é uma variante com penetrância incompleta.

Recentemente, dados de sequenciamento de tumores adrenocorticais pediátricos derivados de casos positivos para *TP53* p.(Arg337His) mostraram que todos eles compartilham uma sequência de *TP53* idêntica, contendo o alelo não duplicado para o polimorfismo intrônico PIN3 (rs17878362) e arginina no códon 72 (rs1042522) (Pinto et al., 2015). Também foi descrito que portadores da variante exibem uma predisposição para câncer ao longo da vida com uma distribuição bimodal da idade ao diagnóstico (**Figura 6**): um pico na primeira década de vida, associado principalmente com o desenvolvimento de tumores adrenocorticais; e outro pico na quinta década de vida, caracterizado pela ocorrência de diversos tipos de neoplasias, incluindo câncer de mama, tumores gastrointestinais e de pulmão (Mastellaro et al., 2017).

Em paralelo, vários grupos de pesquisa tem investigado a prevalência germinativa e/ou somática de portadores desta variante em coortes de pacientes diagnosticados com diferentes tipos de tumores, não selecionados por história familiar de câncer e provenientes de diferentes regiões do Brasil. Dentre estes estudos, destacam-se aqueles que avaliaram a prevalência de portadores em casos de carcinoma adrenocortical (90–97%, regiões Sul e Sudeste), câncer de mama em geral (2,4-8,6%, regiões Sul e Sudeste), neuroblastoma (8,4%, região Sudeste), sarcomas (8%, região Sudeste), tumores *phylloides* de mama (5,4%, regiões Sul e Sudeste), e adenocarcinoma de pulmão (2,4-8,9%, regiões Sudeste/São Paulo e Central/Minas Gerais) (Barbosa et al., 2020; Couto et al., 2017; Giacomazzi et al., 2013b, 2014; Mastellaro et al., 2018; Mathias et al., 2020; Ribeiro et al., 2001; Seidinger et al., 2011, 2015; Volc et al., 2020).

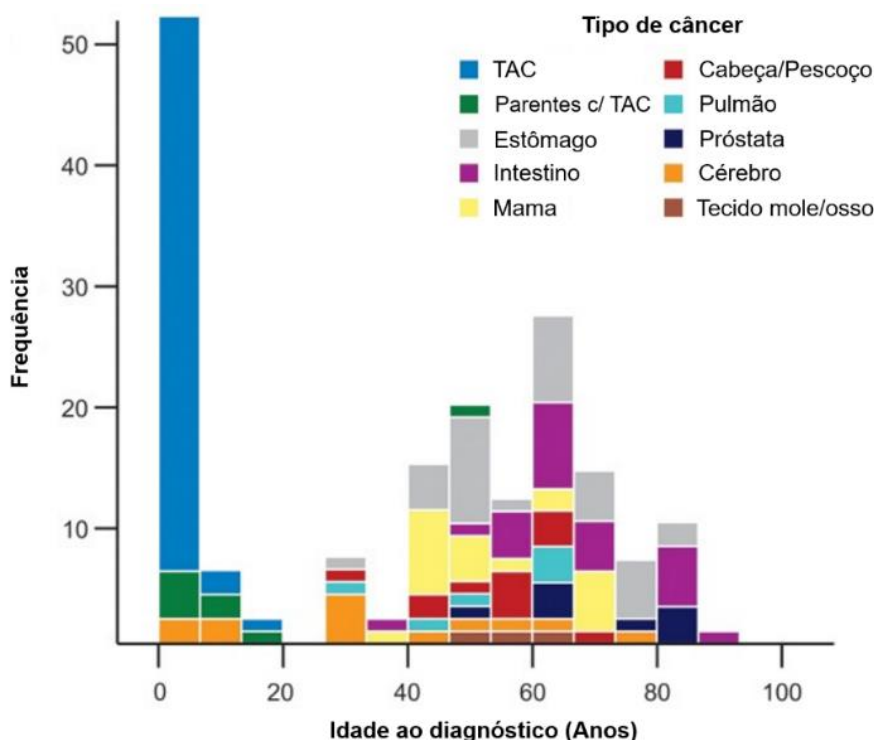


Figura 6. Distribuição de diferentes tipos de câncer de acordo com a idade ao diagnóstico em portadores da variante patogênica *TP53* p.(Arg337His), popularmente conhecida como R337H. TAC, tumor adrenocortical; c/, com. **Modificado de Mastellaro et al., 2017.**

Quanto ao impacto funcional desta variante, as primeiras evidências *in vitro* sugeriram que ela causaria uma alteração mais sutil da proteína, tornando-a uma p53mut funcionalmente deficiente mediante certas condições e em tecidos específicos. Conforme ilustrado pela **Figura 7A**, estes estudos iniciais apontaram que o resíduo Arg337 é um componente crítico de um motivo de alfa-hélice implicado na oligomerização da proteína. Especificamente, Arg337 está envolvido na formação de pontes salinas com o resíduo Asp352 que estabilizam o OD para dimerização e posterior formação de tetrâmeros de p53. A substituição do resíduo de arginina por histidina no códon 337 pode romper a conformação em tetrâmero (oligomerização) de p53 através de um mecanismo dependente de pH intracelular. Na faixa inferior de pH fisiológico (pH 7,0), a histidina na posição 337 é protonada e mantém a ponte salina com Asp352. No limite superior de pH fisiológico (pH 8,0), a histidina é desprotonada e a ponte salina com Asp352 é perdida, desfazendo o enovelamento dos dímeros de p53. Sendo assim, a deficiência de oligomerização associada à His337 tende a ocorrer em condições de pH levemente alcalino (DiGiammarino et al., 2002;

Hainaut, 2002), ocasionando uma diminuição na afinidade de ligação de p53 às sequências de DNA (p53 RE) (**Figura 7B**). Além disso, foi observado em dois estudos independentes que a p53mut R337H retém, ao menos em parte, a capacidade de transativação de genes-alvo, desempenhando uma atividade supressora de tumor parcial (Ribeiro et al., 2001; Zerdoumi et al., 2017). Esses achados indicaram que a variante pode ser classificada como parcialmente funcional.

Em 2018, Park e colaboradores reportaram o estabelecimento do primeiro modelo animal para estudo da variante. Este era um modelo *knock-in* contendo a variante homóloga à p53 R337H identificada em humanos (camundongos p53 R334H). Foi verificado que a presença da alteração desencadeia uma deficiência na capacidade de oligomerização no fígado de camundongos após exposição a um carcinógeno hepático específico, quando comparado à mesma condição em camundongos p53wt. Quando expostos ao carcinógeno, camundongos homozigotos para a alteração p53 R334H (p53^{R334H/R334H}) exibiram desenvolvimento aumentado de tumores hepáticos. Entretanto, camundongos p53^{R334H/R334H} que não foram expostos ao carcinógeno se desenvolveram normalmente, sem qualquer diferença significativa em termos de incidência de câncer ou tempo de vida em comparação com àqueles p53^{wt/wt} (Park et al., 2018, 2019). Corroborando os achados anteriores de que esta é uma variante hipomórfica e com penetrância incompleta, um estudo mais recente, que também foi baseado na geração de um modelo animal contendo a variante, demonstrou que p53mut R334H apresenta uma capacidade diminuída em formar tetrâmeros de p53 estáveis e confere um padrão de manifestação tardia de tumores (Jeffers et al., 2021).

No entanto, os fatores genéticos e ambientais que explicariam a grande heterogeneidade das manifestações clínicas observada em portadores dessa variante fundadora permanecem apenas parcialmente compreendidos. Outros achados relevantes obtidos em estudos anteriores acerca da variante TP53 p.(Arg337His) são mencionados nas seções de Introdução e Discussão do **Capítulo IV – Artigo 1**.

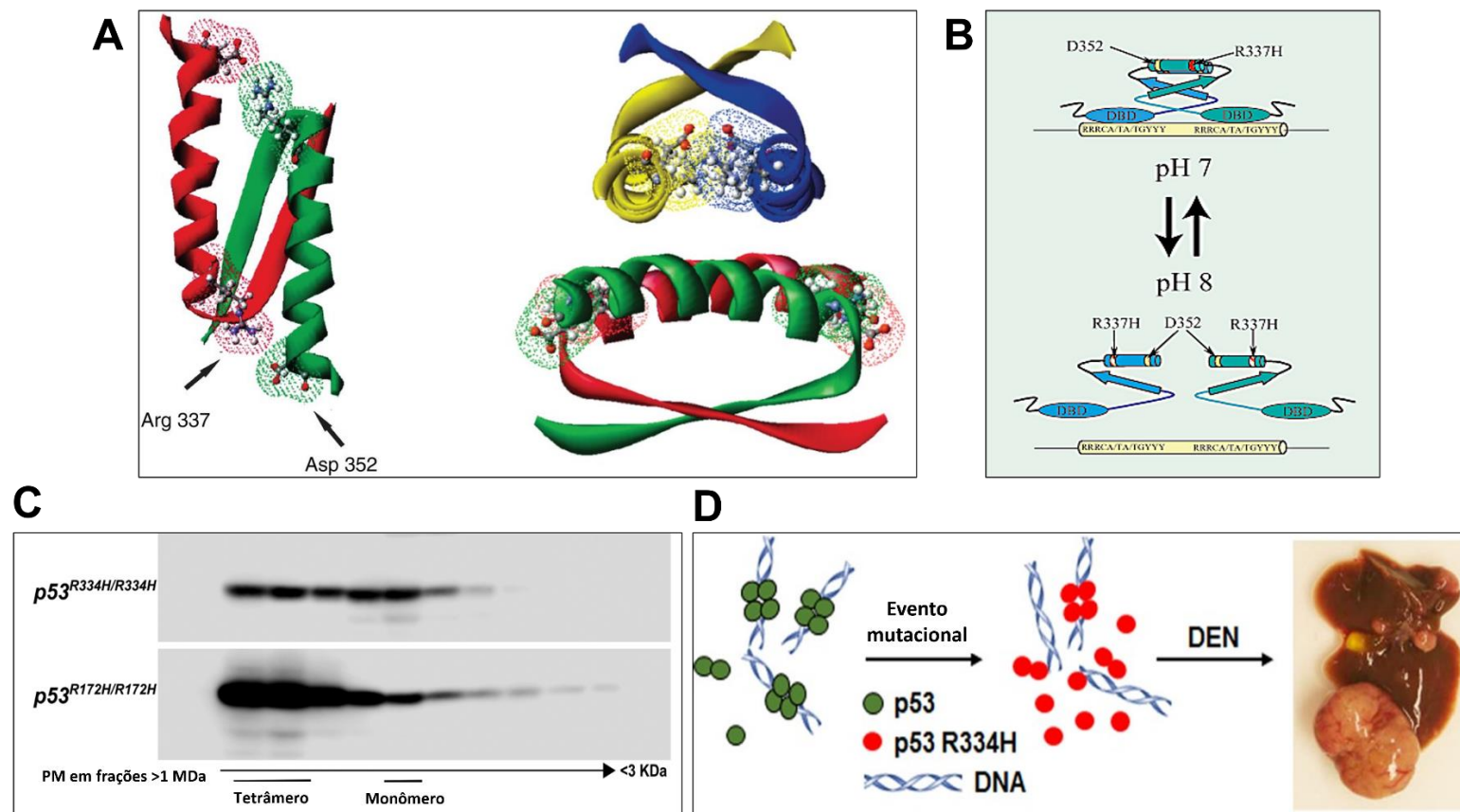


Figura 7. Principais achados funcionais *in vitro* e *in vivo* relacionados à variante fundadora brasileira *TP53* p.(Arg337His) ou R337H. **(A)** Estrutura tridimensional dos dímeros (à esquerda) e tetrâmeros (à direita) de p53, destacando-se a localização dos resíduos Arg337 e Asp352 envolvidos na formação de pontes salinas entre os domínios de oligomerização de cada monômero. **(B)** p53mut R337H apresenta capacidade de oligomerização sensível às condições de pH intracelular, interferindo na afinidade de ligação ao DNA (DBD, *DNA binding domain*). His337 protonada é indicada em vermelho. **(C)** Análise combinada de cromatografia e Western Blot mostrando um comprometimento na formação de tetrâmeros de p53 estáveis em células primárias derivadas de modelo animal contendo a variante p53 R334H, homóloga à R337H em humanos (PM, peso molecular). **(D)** p53mut R334H (em vermelho) forma menos dímeros e tetrâmeros de p53 para ligação ao DNA em comparação com p53wt (em verde) no fígado de camundongos após exposição ao carcinógeno hepático *diethylnitrosamine* (DEN), induzindo a formação aumentada de tumores neste órgão. **Modificado de Hainaut, 2002 (Figura 7A), DiGiammarino et al., 2002 (Figura 7B), Jeffers et al., 2021 (Figura 7C), e Park et al., 2019 (Figura 7D).**

1.4.2. Região 3'UTR e a variante funcional *TP53* rs78378222

A região 3' não-traduzida (3'UTR) em genes humanos contém elementos de sequência que podem regular a tradução e a estabilidade do mRNA. A classe mais abundante de elementos na 3'UTR são os sítios para ligação de microRNAs (miRNAs) (Friedman et al., 2009), os quais são discutidos mais detalhadamente a seguir (**Seção 6 deste Capítulo**). Sendo assim, variantes somáticas ou germinativas localizadas na região 3'UTR podem alterar a expressão gênica por abolir, enfraquecer ou criar complementariedade com miRNAs, possivelmente levando à variação fenotípica (Diederichs et al., 2016; Winter et al., 2009).

Adicionalmente, a região 3'UTR apresenta sequências regulatórias da poliadenilação, que consiste na etapa de processamento da extremidade 3' dos transcritos primários (pre-mRNAs). Conforme mostrado na **Figura 8A**, duas sequências regulatórias se destacam nesse processo: (1) o sinal de poliadenilação (do inglês *Polyadenylation Signal*, PAS), altamente conservado e constituído pelo hexâmero ou hexanucleotídeo canônico AAUAAA; e (2) o sítio de clivagem, que, por convenção, consiste em um dinucleotídeo CA. Ambas são reconhecidas por um grande complexo proteico associado ao domínio carboxi-terminal da RNA polimerase II, o qual cliva a fita simples do pre-mRNA na sua extremidade 3' para subsequente adição da cauda poli-A, uma sequência com cerca de duas centenas de adenilatos que previne a degradação do mRNA por 3'-5' exonucleases (Lemay et al., 2010; Lutz, 2008; Matoulkova et al., 2012). Os PAS já identificados em transcritos humanos apresentam variações funcionais da sequência consenso AAUAAA (**Figura 8B**), sendo que algumas posições desse hexâmero parecem ser tolerantes a trocas de bases únicas (Beaudoing et al., 2000; Tian et al., 2005; Vieira et al., 2019). Entretanto, variantes germinativas situadas em PAS de genes humanos já foram descritas em associação com diversas patologias humanas, incluindo câncer (Decorsière et al., 2012; Stacey et al., 2011). Essas VGP em PAS podem causar instabilidade na interação dessa sequência regulatória com o complexo proteico de clivagem e poliadenilação, o que, por sua vez, leva a uma diminuição nas taxas de transcritos poli-A(+) e, possivelmente, a uma redução dos níveis da proteína correspondente (Chen et al., 2006; Hollerer et al., 2014).

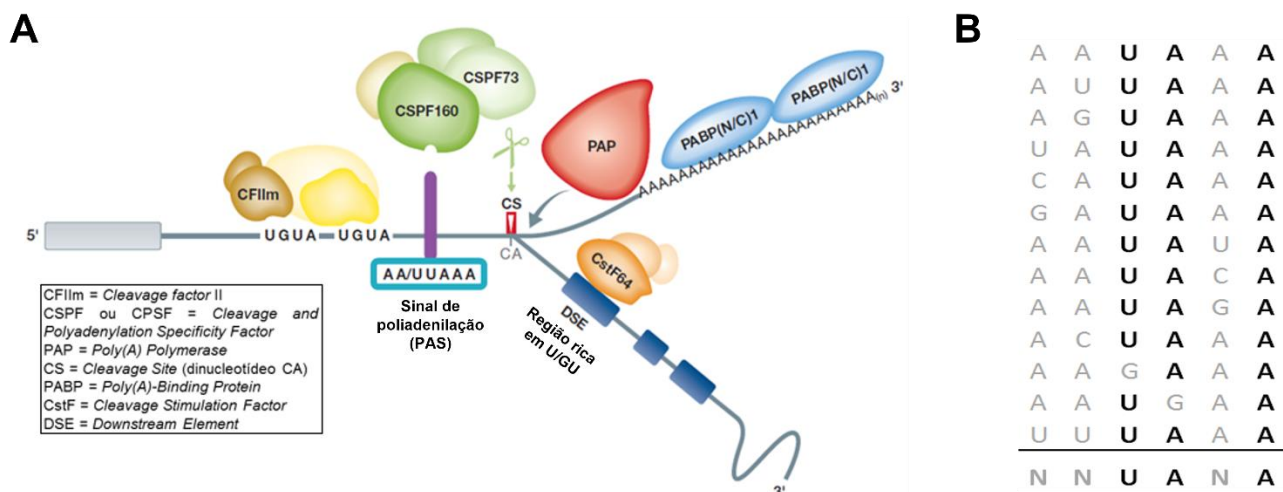


Figura 8. Processamento da extremidade 3' dos pre-mRNAs em eucariotos, seqüências regulatórias e proteínas envolvidas na clivagem e poliadenilação dos transcritos. Em **(A)** destaca-se a seqüência sinal de poliadenilação (PAS, hexanucleotídeo canônico AAUAAA), que é alterada no gene *TP53* na presença da variante rs78378222. Em **(B)** são mostradas as seqüências de PAS funcionais descritas até o momento em genes humanos. As posições em negrito são altamente conservadas, enquanto as em cinza parecem ser tolerantes a variantes de ponto. **Modificado de Hollerer et al., 2013 (Figura A), Beaudoin et al., 2000 e Tian et al., 2005 (Figura B).**

Recentemente, em um estudo do nosso grupo de pesquisa, a variante germinativa rara rs78378222 (A>C), que altera o PAS constitutivo localizado na região 3'UTR do gene *TP53* (AAUAAA>AAUACA), apresentou evidências de associação com a SLF (Macedo et al., 2016). Anteriormente, essa variante havia sido associada com diversos tipos de tumores, incluindo alguns descritos em famílias SLF, verificando-se níveis menores de mRNA *TP53* e de proteína p53 em indivíduos heterozigotos (genótipo AC), em comparação aos homozigotos selvagens (genótipo AA) (Deng et al., 2019; Li et al., 2013; Stacey et al., 2011). No estudo do nosso grupo, a variante não foi identificada em um grupo de pacientes SLF com VGP em *TP53*, mas foi detectada em heterozigose em uma alta frequência (7/129, 5,4%) no grupo de pacientes com fenótipo clínico da síndrome e sem VGP identificadas em regiões codificadoras do gene. Ainda, foi observada uma redução na expressão da proteína p53 em células normais (fibroblastos) de um dos pacientes SLF portadores da variante rs78378222 em relação a um indivíduo controle (Macedo et al., 2016). Estudos recentes mostraram que o alelo variante rs78378222[C] influencia na interação entre

miRNAs específicos e a região 3'UTR de *TP53*, enfraquecendo e criando sítios de ligação para estes reguladores (Deng et al., 2019; Zhao et al., 2016). Esses últimos achados corroboram a hipótese de que esta é uma variante hipomórfica, com um mecanismo de predisposição a diferentes tipos de câncer associado à haploinsuficiência de p53 (Macedo et al., 2016).

Uma revisão detalhada acerca desta variante de *TP53*, abrangendo os estudos de associação caso-controle com diversos tipos de câncer, dados de frequência em diferentes populações e achados funcionais, consta nas seções de Introdução, Resultados e Discussão do **Capítulo V – Artigo 2**.

1.5. Modificadores de fenótipo na SLF

Apesar das evidências relacionando a heterogeneidade na manifestação clínica da SLF com diferenças funcionais na atividade da proteína p53mut, dependente da localização das VGP nos diferentes domínios da proteína, essas correlações genótipo-fenótipo não explicam totalmente a heterogeneidade global e intrafamiliar da doença (Bougeard et al., 2008; Olivier et al., 2003). Essa variabilidade fenotípica é facilmente identificada pela presença ou ausência de história pessoal de câncer, diversidade de tipos tumorais desenvolvidos, diferença na idade de manifestação do primeiro tumor e número de tumores primários diagnosticados em pacientes com a mesma VGP em *TP53* (Bougeard et al., 2015; Schneider et al., 2019).

Nesse contexto, vários estudos foram desenvolvidos nos últimos 20 anos para avaliar fatores genéticos que podem modificar a função de p53mut e contribuir para um importante espectro dessas diferenças no fenótipo clínico (**Figura 9**). Entre eles, foram estudadas variantes germinativas funcionais situadas no próprio gene *TP53*, tais como p.(Pro72Arg) e PIN3 (duplicação de 16 pb no íntron 3), dois polimorfismos que estão em desequilíbrio de ligação (Olivier et al., 2010; Pietsch et al., 2006). A presença do alelo duplicado de PIN3 (alelo A2) foi associada com menores níveis de transcrito *TP53*, sugerindo que este polimorfismo possa afetar o encadeamento (*splicing*) do mRNA (Gemignani et al., 2004; Sagne et al., 2014). Além disso, PIN3 foi associado com um efeito modificador de fenótipo marcante: portadores do alelo duplicado de PIN3 em heterozigose (genótipo A1/A2) apresentaram uma idade média ao diagnóstico

do primeiro tumor 19 anos mais tardia, quando comparados aos homozigotos para o alelo não duplicado (A1/A1), em uma amostra de indivíduos brasileiros portadores de VGP em *TP53*. No mesmo grupo de pacientes, a ocorrência de câncer antes dos 35 anos foi exclusivamente observada em homozigotos A1/A1 (Marcel et al., 2009).

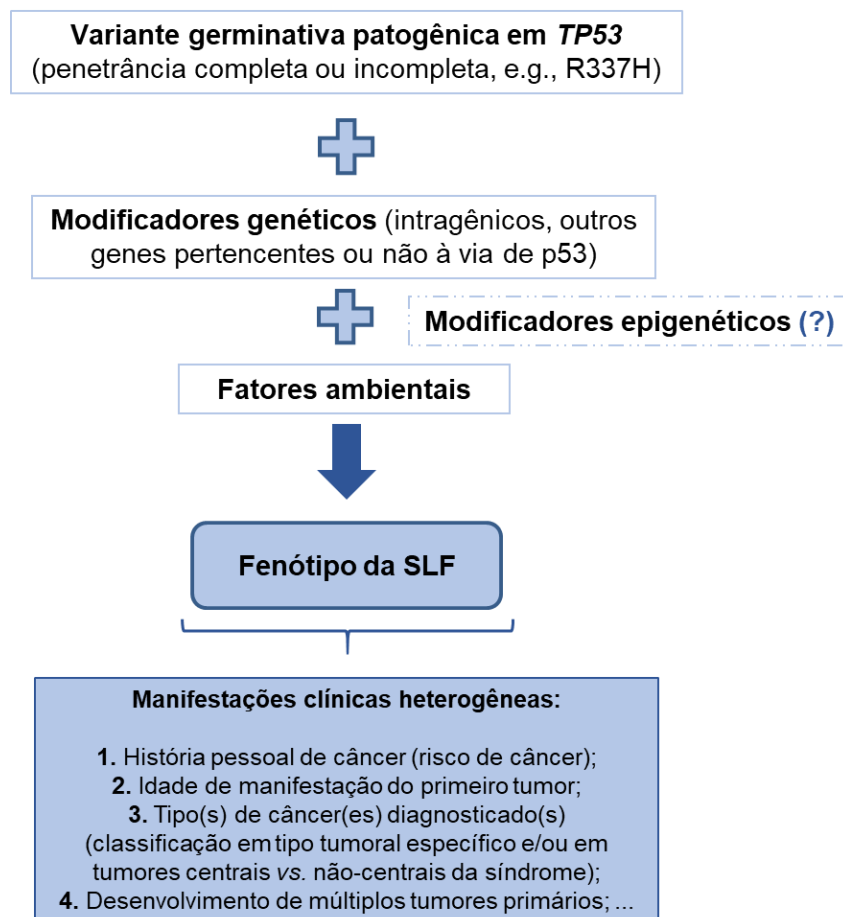


Figura 9. Racional para a investigação de modificadores de fenótipo na SLF. **Figura original.**

Algumas variantes germinativas com importância funcional localizadas em outros genes codificadores de proteínas da via de p53 tem sido investigadas quanto ao seu impacto no câncer em geral e no contexto do fenótipo da SLF (Barnoud et al., 2019; Basu e Murphy, 2016). O SNP309 (rs2279744 T>G), localizado no promotor do gene *MDM2*, principal regulador negativo de p53, é o exemplo de maior destaque. O alelo variante *MDM2* rs2279744[G] também já foi descrito como um modificador genético da idade ao diagnóstico do primeiro tumor em pacientes com SLF, predominantemente portadores de VGP no DBD de p53. A idade média do aparecimento de câncer em indivíduos apresentando

o alelo G foi significativamente mais precoce (cerca de 10 anos) do que a encontrada em portadores do alelo T em homozigose (Bougeard et al., 2006; Marcel et al., 2009; Ruijs et al., 2007). No entanto, análises posteriores deste SNP não replicaram esta associação (Pinto et al., 2009; Renaux-Petel et al., 2014).

Um estudo recente do nosso grupo de pesquisa identificou que o genótipo GG para *MDM2* SNP309 pode contribuir para uma idade mais precoce de manifestação dos carcinomas adrenocorticais e tumores de mama em portadores da variante fundadora brasileira *TP53* p.(Arg337His) com fenótipo SLF, ainda que sem diferença estatisticamente significativa (Macedo et al., 2018). Curiosamente, foram encontradas frequências do alelo rs2279744[G] e do genótipo GG significativamente maiores na coorte de portadores da variante *TP53* p.(Arg337His) do que no grupo controle, em concordância com relatos anteriores de que o SNP *MDM2* SNP309 poderia atuar como um fator genético adicional que contribui para o fenótipo SLF (Ruijs et al., 2007). Ademais, SNPs nos genes *MDM4* (rs1563828) e *USP7* (rs1529916), outros dois reguladores críticos da atividade de p53 (Brooks et al., 2007; Lee e Gu, 2010; Li et al., 2004; Perry, 2010), não exibiram associação com as variáveis clínicas analisadas em portadores da variante fundadora (Macedo et al., 2018).

É importante ressaltar que além dos polimorfismos funcionais em *TP53* e *MDM2*, as variações no número de cópias de DNA (CNVs) em excesso e o encurtamento de telômeros acelerado são outros fatores genéticos previamente associados com o padrão heterogêneo de tumores na SLF (Aury-Landas et al., 2013; Shlien et al., 2008; Silva et al., 2014; Tabori et al., 2007). O comprimento telomérico mais reduzido em alguns indivíduos SLF foi associado a uma idade de aparecimento de câncer mais precoce, ao serem analisadas sucessivas gerações da mesma família (fenômeno de antecipação genética) com genótipos idênticos para os SNPs nos genes *TP53* (p.Pro72Arg e PIN3) e *MDM2* (SNP 309) (Tabori et al., 2007). Em relação à análise de CNVs germinativos, um enriquecimento significativo desses eventos tem sido detectado no genoma de portadores de VGP em *TP53* com história familiar positiva para câncer, em comparação com indivíduos saudáveis, sugerindo um papel como modificador do risco de câncer (penetrância) em famílias SLF (Shlien et al., 2008; Silva et al., 2014).

Por outro lado, sabe-se que alterações na expressão gênica representam um dos mecanismos-chave a partir dos quais células normais progridem a um estado tumoral, portanto, polimorfismos germinativos localizados em sítios para ligação de miRNAs na região 3'UTR dos mRNAs-alvo podem influenciar no risco individual para o desenvolvimento de câncer (Diederichs et al., 2016; López de Silanes et al., 2007). Entre eles, destaca-se o caso do SNP rs61764370 (T>G) na região 3'UTR do proto-oncogene *KRAS*, cuja presença rompe a ligação do miRNA let-7, resultando em uma superexpressão de *KRAS* (Chin et al., 2008). Inicialmente, esse SNP foi identificado como um alelo de risco para câncer de pulmão não pequenas células (Chin et al., 2008) e, posteriormente, descrito como um biomarcador preditivo de prognóstico e resposta terapêutica em pacientes com diferentes neoplasias, tais como câncer colorretal metastático e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (Chung et al., 2014; Sclafani et al., 2015; Sebio et al., 2013). Embora evidências contraditórias tenham sido reportadas acerca do papel do alelo variante rs61764370[G] em tumores de mama e ovário esporádicos e hereditários (Hollestelle et al., 2011, 2016; Paranjape et al., 2011; Pharoah et al., 2011; Pilarski et al., 2012; Ratner et al., 2010), estudos caso-controle recentes em populações asiáticas mostraram que a presença do alelo G aumentou significativamente o risco de câncer de mama (forma esporádica), o tipo de tumor mais comum em famílias SLF (Mohthash et al., 2020; Sanaei et al., 2017). No entanto, a frequência e um possível efeito modificador de fenótipo desse SNP funcional ainda não foram avaliados no contexto da SLF.

1.6. miRNAs e miRSNPs: potenciais modificadores de fenótipo na SLF

Os miRNAs ou miRs consistem em uma classe de pequenos RNAs não-codificantes de fita simples (18 a 25 nucleotídeos) envolvidos na regulação pós-transcricional e sequência-específica da expressão gênica em todos os eucariotos multicelulares (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Estima-se que mais de 30% dos genes codificadores de proteínas sejam regulados por miRNAs em humanos (Rachagani et al., 2010). Atualmente, os miRNAs são reconhecidos como reguladores fundamentais da expressão gênica em plantas e animais (O'Brien et al., 2018).

1.6.1. miRNAs: da biogênese aos mecanismos de regulação

Em relação à via canônica (predominante) da biogênese de miRNAs, sabe-se que a transcrição dos genes codificadores de miRNAs é geralmente mediada pela RNA polimerase II. O transcrito primário, ou pri-miRNA, que possui 5' *cap* e cauda poli-A, é formado por centenas a milhares de nucleotídeos. O pri-miRNA é clivado no núcleo pelo complexo enzimático formado pela RNase III *Drosha* e proteínas associadas do Microprocessador, produzindo um miRNA precursor (pre-miRNA) de ~70 nucleotídeos. Este pre-miRNA é posteriormente clivado no citoplasma pelo complexo enzimático RNase III *Dicer/Argonauta*, a fim de gerar o miRNA maduro (Bartel, 2004; O'Brien et al., 2018).

Após a sua biogênese, o miRNA maduro é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que atua no reconhecimento dos sítios de ligação, em sua maioria, na região 3'UTR dos mRNAs-alvo, através de pareamento de bases imperfeito com o miRNA. Em geral, esse complexo miRNA e RISC (miRISC) regula negativamente a expressão gênica por meio de dois mecanismos pós-transcricionais: (1) inibição da tradução do mRNA, quando a complementaridade entre as bases do mRNA e do miRNA for parcial (predominante em animais); e (2) degradação do mRNA, quando essa complementaridade for total (mais comum em plantas) (Bartel, 2009; Fabian et al., 2010). No entanto, conforme representado na **Figura 10**, existe uma região correspondente aos nucleotídeos 2-8 da extremidade 5' do miRNA maduro, denominada sequência *seed*, na qual geralmente ocorre pareamento perfeito com o sítio de ligação na 3'UTR do mRNA-alvo, determinando em grande parte a especificidade do reconhecimento desses alvos e sendo crucial para a estabilidade e o carregamento da molécula de miRNA no complexo RISC (Bartel, 2009; Friedman et al., 2009).

As descrições mais recentes dos mecanismos de ação dos miRNAs indicam que eles podem ser tanto ativadores quanto repressores da expressão gênica ao se ligar a sequências reguladoras no DNA. A ligação complementar de miRNAs a regiões promotoras pode reprimir a transcrição através de uma impossibilidade física do alongamento do transcrito, bem como ativar a transcrição quando a sua ligação ocorre em regiões que recrutam modificadores

de histonas, conferindo a abertura da cromatina (Portnoy et al., 2011; Schwarzenbach et al., 2014).

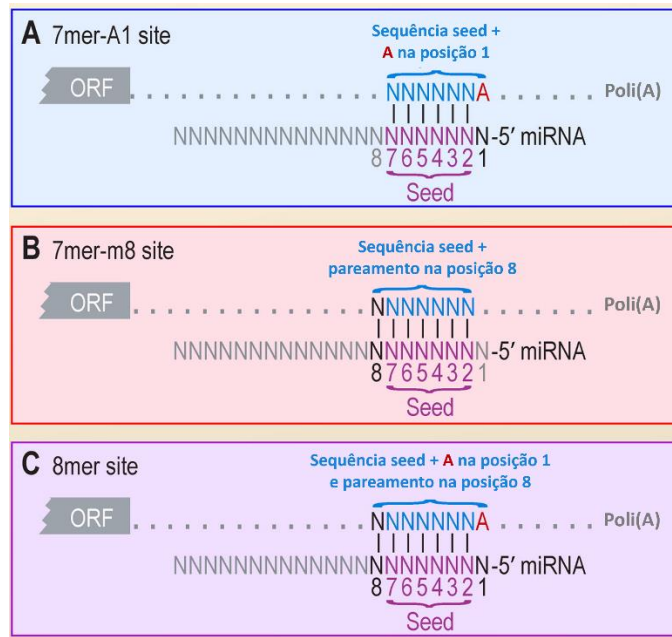


Figura 10. Sítios para ligação de miRNAs na região 3'UTR dos mRNAs (alvos), destacando a localização da sequência *seed*. As linhas verticais indicam pareamento de bases perfeito. Em **(A-C)** são mostrados apenas os sítios considerados canônicos, nos quais a complementaridade de bases ocorre do nucleotídeo 2 até o 7 ou 8 da extremidade 5' do miRNA (sítios *7mer* e *8mer*). ORF, *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura). **Modificado de Bartel, 2009.**

Considerando que, em animais, comumente os miRNAs ligam-se na região 3'UTR dos mRNAs através de complementaridade imperfeita de bases, a identificação de mRNAs-alvo tem sido cada vez mais complexa (Dweep et al., 2013). Por esse motivo, a maioria das ferramentas de bioinformática para predição de alvos leva em consideração essencialmente a sequência *seed*, exigindo uma complementaridade de bases perfeita entre ela e o seu sítio de ligação na região 3'UTR (Dweep et al., 2013; M. Witkos et al., 2011). Um número crescente dessas ferramentas tem sido proposto para realizar a predição das interações entre miRNAs e seus alvos, dentre as quais destacam-se *TargetScan* (Agarwal et al., 2015; Grimson et al., 2007) e *mirSVR* (Betel et al., 2010). Estudos resultantes dessas análises de predição mostraram que um único miRNA pode regular negativamente múltiplos alvos (até 200 mRNAs), com funções completamente distintas (Esquela-Kerscher e Slack, 2006; Ruan et al., 2009). Também tem sido descritos múltiplos sítios de ligação para um mesmo miRNA

em um determinado mRNA, o que pode aumentar o nível de regulação da expressão (Grimson et al., 2007). Adicionalmente, existem bancos de dados de interações miRNA-mRNA em humanos com validação experimental, compilando resultados de diversas metodologias e ensaios funcionais (Elton and Yalowich, 2015), dentre as quais destacam-se *miRTarBase* (Chou et al., 2016) e *TarBase* (Sethupathy et al., 2006).

1.6.2. miRNAs em câncer, regulação de p53 e papel de miRSNPs na SLF

Inúmeros estudos demonstraram o envolvimento dos miRNAs em mecanismos de tumorigênese. Eles participam de diversos processos biológicos, incluindo proliferação celular, diferenciação e apoptose, sendo que a desregulação desses processos está intimamente relacionada ao desenvolvimento de câncer (Di Leva et al., 2014; Lu et al., 2005). Cerca de 50% dos genes de miRNAs descritos em humanos estão localizados em regiões genômicas associadas ao câncer, pontos de quebra cromossômica e regiões de frequente perda de heterozigidade, mostrando que os miRNAs estão implicados na iniciação e progressão de diversos tipos tumorais (Calin et al., 2004; Rachagani et al., 2010).

Os miRNAs podem atuar como supressores de tumor ou oncogenes, sendo estes últimos chamados de “*oncomirs*” (Esquela-Kerscher e Slack, 2006; Rupaimoole e Slack, 2017). Em tecidos tumorais, duas alterações podem ser observadas em relação ao nível de expressão desses miRNAs, ambas relacionadas com falhas em algum ponto da sua biogênese: (a) a redução ou eliminação da expressão de um miRNA supressor de tumor, processo este que favoreceria a formação de tumores devido à não-repressão da expressão de oncoproteínas; e (b) a superexpressão de um miRNA oncogênico, resultando na diminuição da expressão de genes supressores de tumor críticos, também constituindo um mecanismo de carcinogênese (Esquela-Kerscher e Slack, 2006; Slack e Chinnaiyan, 2019).

Em particular, os miRNAs exercem um controle refinado da expressão de p53 e podem atuar como reguladores diretos e indiretos da sua função (**Figura 11**). Eles podem se ligar às sequências complementares na região 3'UTR dos transcritos *TP53* (regulação direta) e/ou aos sítios-alvos na 3'UTR dos mRNAs

derivados de outros genes da via de p53 (regulação indireta) (Goeman et al., 2017; Hermeking, 2012; Liu et al., 2017).

A primeira rede abrangente de regulação da via de p53 por miRNAs foi descrita por Hermeking em 2012 (**Figura 11A**), contendo apenas interações miRNA-mRNA validadas experimentalmente. Nela, foi possível observar que vários miRNAs regulam diretamente p53 e devem ser considerados oncogenes clinicamente relevantes, entre eles miR-125b, miR-504, miR-33 e miR-25 (Hermeking, 2012). miR-504 apresenta 2 sítios-alvo no mRNA *TP53*, e estudos funcionais demonstraram que a superexpressão desse miRNA reduz os níveis de p53 e prejudica suas funções, promovendo o crescimento de tumores *in vivo* (Hu et al., 2010). Estudos posteriores expandiram essa rede de regulação, incluindo novos miRNAs validados por ensaios funcionais e outras proteínas inibidoras da atividade de p53 (**Figuras 11B-11D**) (Goeman et al., 2017; Liu et al., 2017). Além disso, essas redes atualizadas mostraram que, enquanto fator de transcrição, p53wt desempenha um papel importante como regulador transcricional de miRNAs, induzindo ou inibindo a expressão de miRNAs específicos (**Figura 11E**), bem como é capaz de modular a expressão de proteínas relacionadas à biogênese e função de miRNAs em geral, tais como p68 (também conhecido como DDX5), RBM38 e AGO2 (Liu et al., 2017).

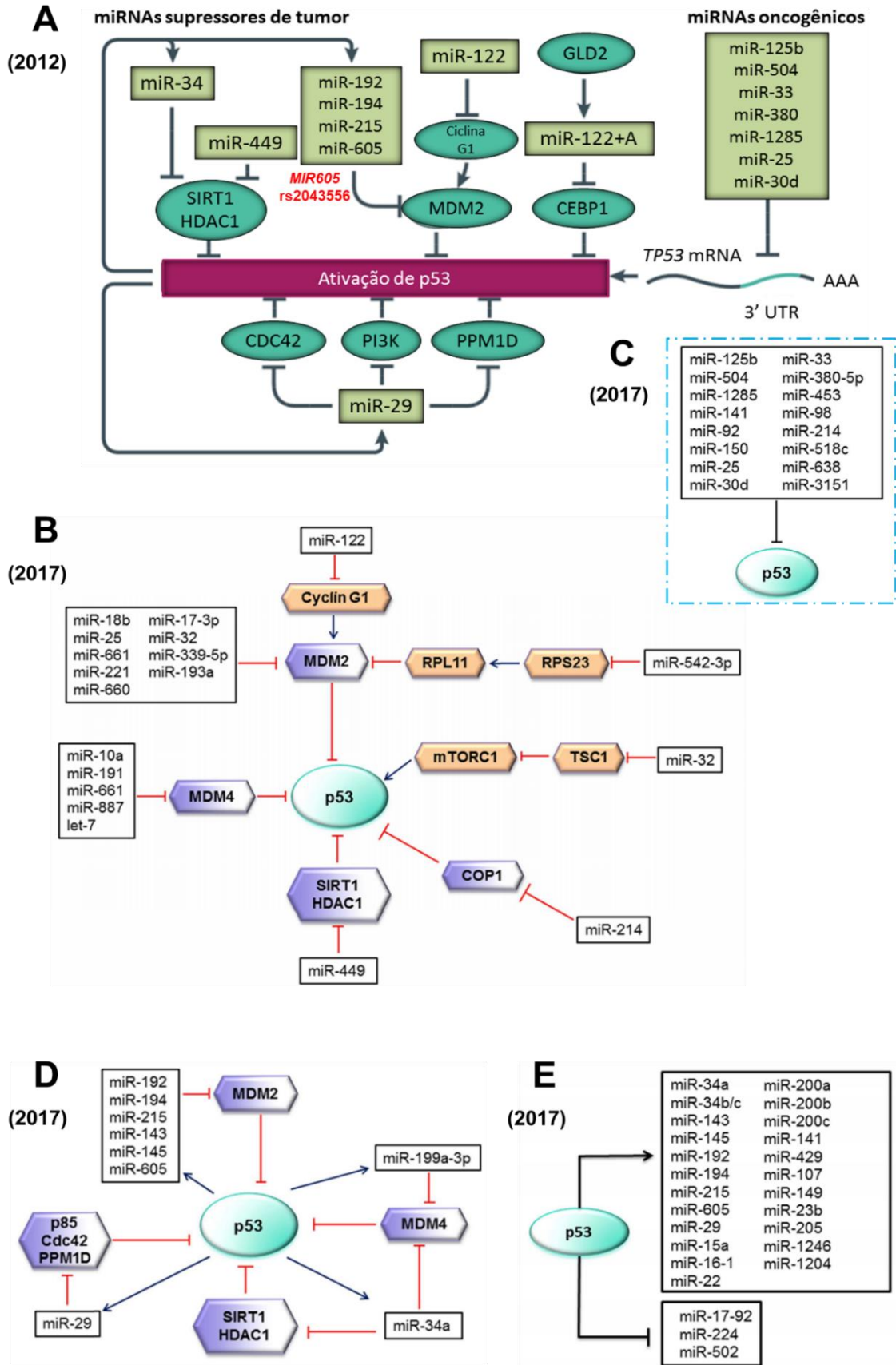


Figura 11. Regulação direta e indireta da atividade de p53 por miRNAs, bem como o papel de p53 como regulador transcripcional de determinados miRNAs. **(A)** Conforme a rede de regulação

envolvendo os genes da via de p53 e miRNAs publicada em 2012, os níveis de expressão de p53 podem ser regulados diretamente por miRNAs oncogênicos que apresentam sítios-alvo na região 3'UTR do mRNA *TP53* (à direita), bem como indiretamente pela atuação de miRNAs supressores de tumor que inibem a expressão de proteínas reguladoras negativas da ativação de p53 (à esquerda). Para um melhor entendimento do seu efeito funcional, o SNP rs2043556, localizado no gene *MIR605*, é indicado em vermelho na rede próximo ao miRNA maduro correspondente (miR-605). Conforme as redes de regulação atualizadas em 2017: **(B)** miRNAs regulam indiretamente p53, modulando a expressão dos seus principais reguladores positivos e negativos (MDM2, MDM4, mTORC1, entre outros); **(C)** miRNAs atuam como reguladores diretos de p53; **(D)** p53 modula a expressão de miRNAs que regulam indiretamente o próprio p53, formando alças de *feedback*; **(E)** p53 regula a transcrição de miRNAs específicos. **Modificado de Hermeking, 2012 (Figura A) e Liu et al., 2017 (Figuras B-E).**

Nesse contexto, SNPs germinativos localizados na sequência de genes codificadores de miRNAs, denominados miRSNPs, podem modular o risco de câncer e as características clínicas associadas (Hu et al., 2014). miRSNPs funcionais situados em regiões regulatórias dos genes de miRNAs podem afetar a sua eficiência de transcrição e processamento, o que, em última análise, pode alterar os níveis de expressão de múltiplos genes-alvo (Ryan, 2017; Ryan et al., 2010). Até o momento, o único miRSNP estudado como potencial modificador de fenótipo da SLF foi *MIR605* rs2043556 (A>G) (**Figura 11A**). Essa variante está localizada no gene que codifica miR-605, um importante regulador indireto da atividade de p53. Em resposta a diferentes formas de estresse celular, a expressão desse miRNA pode ser induzida por p53, assim como ele é capaz de regular negativamente MDM2 (inibidor crítico de p53), formando uma alça de *feedback* positivo p53:miR-605:MDM2 (**Figuras 11A e 11D**) (Xiao et al., 2011). Em um estudo anterior, foi verificado que o alelo variante *MIR605* rs2043556[G] compromete a eficiência de processamento do miRNA, levando a uma diminuição dos níveis de miR-605 maduro. Ainda nesse estudo, que foi realizado na população canadense, o alelo rs2043556[G] em heterozigose apresentou um efeito significativo como modificador da idade de manifestação de tumores em pacientes SLF portadores de VGP no DBD de p53 (Id Said e Malkin, 2015).

Capítulo II – Justificativa

Considerando que a variante fundadora patogênica *TP53* p.(Arg337His, rs121912664) tem sido descrita como responsável por uma parcela significativa dos casos de câncer no Brasil, especificamente nas regiões Sul e Sudeste, e que sua ocorrência enquanto evento somático é extremamente rara, muitos estudos passaram a investigar a prevalência somática (tecido tumoral) e/ou germinativa dessa variante em coortes de pacientes com diferentes tipos de tumores, não selecionados por idade ao diagnóstico e história familiar de câncer. Dois estudos independentes reportaram previamente prevalências de portadores dessa variante de 2,4 (somática) e 8,9% (germinativa) em séries de casos não selecionados de adenocarcinoma de pulmão das regiões Sudeste (SP) e Central (MG) do Brasil, respectivamente. Em contrapartida, ao nosso conhecimento, apenas um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa avaliou a frequência de uma variante germinativa do PAS de *TP53* (rs78378222) em indivíduos brasileiros diagnosticados com câncer. Considerando que o conhecimento acerca da prevalência destas variantes funcionais de *TP53* em indivíduos com tumores esporádicos ainda é bastante limitado na população brasileira, torna-se relevante determiná-la em coortes de pacientes com adenocarcinomas de pulmão e/ou próstata provenientes da região Sul do Brasil e, a partir dos resultados obtidos, analisar se o rastreamento dessas alterações genéticas em indivíduos com os tumores de interesse seria justificado em nossa população.

Por outro lado, a SLF caracteriza-se essencialmente pela penetrância e expressividade variáveis, levando a um perfil de manifestações clínicas heterogêneas. Ao menos parte desta variação fenotípica encontrada em famílias portadoras de VGP em *TP53* pode ser explicada pela atuação de genes modificadores ou de modificadores intragênicos, sugerindo a importância da descoberta de biomarcadores úteis (conjunto de SNPs com efeito modificador de fenótipo significativo, por exemplo) para auxiliar o manejo terapêutico e o monitoramento dos pacientes SLF. Sendo assim, o presente estudo buscou contribuir para uma melhor compreensão dos potenciais eventos que modificam a expressão e função da proteína p53 mutante (p53mut), especialmente o papel de miRSNPs funcionais relacionados a miRNAs que regulam indiretamente p53. Os achados desta caracterização poderão ajudar na identificação de grupos de pacientes SLF de maior risco que se beneficiariam com programas de prevenção e detecção precoce de neoplasias.

Capítulo III – Objetivos

3.1. Objetivo geral

Investigar novos aspectos moleculares relacionados ao gene *TP53* e à Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), com ênfase na epidemiologia molecular de variantes germinativas funcionais de *TP53* em pacientes com diferentes tipos de tumores, bem como na regulação da via de p53 por miRNAs e na identificação de potenciais modificadores de fenótipo em famílias SLF das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

3.2. Objetivos específicos

3.2.1. Determinar a prevalência da variante fundadora patogênica *TP53* c.1010G>A (p.Arg337His, amplamente conhecida como R337H) em uma coorte retrospectiva de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pulmão provenientes da região Sul do Brasil;

3.2.2. Investigar a prevalência da variante funcional *TP53* rs78378222 (região 3'UTR do gene) em coortes de pacientes com diferentes tipos de tumores provenientes da mesma região do Brasil, incluindo adenocarcinomas de pulmão e próstata e leiomioma uterino;

3.2.3. Atualizar a rede de miRNAs envolvida na regulação da via de p53 utilizando-se ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos;

3.2.4. Avaliar o papel de SNPs em genes de miRNAs (miRSNPs) reguladores indiretos da expressão de p53 (famílias miR-605 e miR-34), bem como do SNP funcional *KRAS* 3'UTR rs61764370, como potenciais modificadores de fenótipo em pacientes SLF provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil;

3.2.5. Determinar a frequência dos miRSNPs selecionados (*MIR605* rs2043556 e *pri-miR-34b/c* rs4938723), além da variante funcional *KRAS* rs61764370, em pacientes SLF portadores da variante *TP53* p.(Arg337His) e de variantes de DBD no gene *TP53* provenientes das mesmas regiões do Brasil;

3.2.6. Investigar se existe efeito modificador de fenótipo dos miRSNPs selecionados e do alelo variante *KRAS* rs61764370[G] quanto ao risco de câncer, idade ao diagnóstico do primeiro tumor, tipos de tumores diagnosticados e ocorrência de múltiplos tumores primários em portadores da variante patogênica p.(Arg337His) e de VGP clássicas (DBD) em *TP53* provenientes das mesmas regiões do Brasil.

Capítulo IV – Artigo 1

Prevalence of the Brazilian *TP53* Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients?

Manuscrito publicado na revista *Frontiers in Genetics*. 2021 Feb;12:606537.



Prevalence of the Brazilian *TP53* Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients?

Igor Araujo Vieira^{1,2†}, Tiago Finger Andreis^{1,2†}, Bruna Vieira Fernandes^{2,3}, Maria Isabel Achatz⁴, Gabriel S. Macedo^{2,5}, Daniel Schramek^{6,7} and Patricia Ashton-Prolla^{1,2,5*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Joan Brunet,
Catalan Institute of Oncology, Spain

Reviewed by:

Ernest Nadal,
Catalan Institute of Oncology, Spain
Judith Balmaña,
Vall d'Hebron University Hospital,
Spain

*Correspondence:

Patricia Ashton-Prolla
pprolla@hcpa.edu.br;
pprolla@gmail.com

[†] These authors have contributed
equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to
Genetics of Common and Rare
Diseases,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 15 September 2020

Accepted: 11 January 2021

Published: 02 February 2021

Citation:

Vieira IA, Andreis TF,
Fernandes BV, Achatz MI,
Macedo GS, Schramek D and
Ashton-Prolla P (2021) Prevalence
of the Brazilian *TP53* Founder
c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung
Adenocarcinoma: Is Genotyping
Warranted in All Brazilian Patients?
Front. Genet. 12:606537.
doi: 10.3389/fgene.2021.606537

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ² Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ³ Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ⁴ Departamento de Oncogenética, Hospital Sírio Libanês, São Paulo, Brazil, ⁵ Programa de Medicina Personalizada, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil, ⁶ Centre for Molecular and Systems Biology, Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada, ⁷ Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

In Southern and Southeastern Brazil, there is a germline pathogenic variant with incomplete penetrance located in the oligomerization domain of *TP53*, c.1010G>A (p.Arg337His). Due to a founder effect, the variant is present in 0.3% of the general population of the region. Recently, this variant was identified in 4.4 and 8.9% of two apparently unselected, single center case series of Brazilian lung adenocarcinoma (LUAD) patients from the Southeastern and Central regions of the country, respectively. In the present study, our aim was to examine *TP53* c.1010G>A allele and genotype frequencies in LUAD samples obtained from patients diagnosed in Southern Brazil. A total of 586 LUAD samples (tumor DNA) recruited from multiple centers in the region were tested, and the mutant allele was identified using TaqMan[®] assays in seven cases (7/586, 1.2%) which were submitted to next generation sequencing analyses for confirmation. Somatic *EGFR* mutations were more frequent in *TP53* c.1010G>A carriers than in non-carriers (57.1 vs. 17.6%, respectively). Further studies are needed to confirm if *TP53* c.1010G>A is a driver in LUAD carcinogenesis and to verify if there is a combined effect of *EGFR* and germline *TP53* c.1010G>A. Although variant frequency was higher than observed in the general population, it is less than previously reported in LUAD patients from other Brazilian regions. Additional data, producing regional allele frequency information in larger series of patients and including cost-effectiveness analyses, are necessary to determine if *TP53* c.1010G>A screening in all Brazilian LUAD patients is justified.

Keywords: *TP53* gene, p53 protein, lung adenocarcinoma, founder variant, *TP53* (p.Arg337His), R337H, non-small cell lung cancer, Li-Fraumeni syndrome

INTRODUCTION

In Southern and Southeastern Brazil, a germline founder pathogenic variant with incomplete penetrance, c.1010G>A (rs121912664), also known as R337H or p.(Arg337His) has been detected in 0.3% of the general population (Achatz et al., 2009; Custódio et al., 2013). It is located in the oligomerization domain (exon 10) of *TP53*, and it is associated with Li-Fraumeni syndrome (LFS). Carriers are at a high risk for developing a wide spectrum of tumors and are prone to develop multiple primary cancers at different ages. The core tumors in LFS patients include early onset breast cancer, soft-tissue sarcomas, brain tumors and adrenocortical carcinomas (Achatz et al., 2007; Giacomazzi et al., 2013; Achatz and Zambetti, 2016). Lung cancer (LC), especially lung adenocarcinoma (LUAD) of the lepidic subtype, has been reported in LFS families and is included in the Chompret criteria for genetic testing of suspected patients, but there is limited evidence for a strong association of its occurrence with germline *TP53* variants (Tinat et al., 2009; Ricordel et al., 2015; Caron et al., 2017). Although *TP53* is considered one of the most commonly mutated genes in solid tumors, somatic occurrence of *TP53* c.1010G>A is extremely rare. In the IARC *TP53* database [International Agency for Research on Cancer *TP53* database (Iarc), 2020], c.1010G>A has been described in only 4 of 28,869 solid tumors. In other public databases, its frequency in solid tumors is also very low. In COSMIC [Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (Cosmic), 2020], for instance, among over 20,000 samples, *TP53* c.1010G>A is not present, although G > T and G > C alterations in codon 1,010 do occur. In contrast, two lung tumors harboring germline c.1010G>A have been described in the IARC *TP53* database. Finally, Nogueira et al. (2015) reported a mixed acinar/bronchiolo-alveolar carcinoma in a known germline carrier of the *TP53* c.1010G>A variant (Nogueira et al., 2015).

LC is the leading cause of cancer related deaths worldwide, responsible for 1.7 million deaths every year. In Brazil, the National Cancer Institute [Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Inca), 2020] estimated 30,200 new LC cases in 2020, rendering it the second most common solid tumor in the country. In Southern Brazil, LC is the third most common cancer diagnosed in adults, with non-small cell lung cancer (NSCLC) accounting for approximately 85% of all LCs cases. Recently, Couto et al. (2017) genotyped *TP53* c.1010G>A in 45 NSCLC patients from a single center in the central region of Brazil, where this variant has not been explored and its population prevalence has not been determined. They identified 4 (8.9%) heterozygotes, a surprisingly high variant frequency for a small, apparently unselected cohort (Couto et al., 2017). Importantly, a more recent single center study in Southeastern Brazil also observed a high prevalence of *TP53* c.1010G>A in an unselected series of 114 *EGFR*-positive LUAD patients: the variant was present in 4.4 and 12.5% of samples when considering diagnosis at any age or before the age of 50 years, respectively (Barbosa et al., 2020). Furthermore, the authors assessed LUAD tumors diagnosed in known *TP53* c.1010G>A carriers and observed that LUAD tumors from 8/9 (89%) *TP53* c.1010G>A carriers harbored an activating *EGFR* variant. To our

knowledge, the *TP53* c.1010G>A variant has not been described in other studies assessing somatic *TP53* variants in sporadic lung adenocarcinoma (LUAD) patients (Greenman et al., 2007; Ding et al., 2008; Hammerman et al., 2012; Imielinski et al., 2012; Peifer et al., 2012; Rizvi et al., 2015; Jordan et al., 2017). Thus, in the present study, our goal was to examine the *TP53* c.1010G>A allele and genotype frequencies in a series of 586 LUAD samples obtained from patients diagnosed in multiple centers of the three states of Southern Brazil, a region with the highest population frequency of this particular variant observed to date, regardless of their clinical features.

METHODS

Study Subjects and Ethical Aspects

A total of 586 LC samples derived from a cohort described in a previous study from our group (Andreis et al., 2019) were analyzed. Patients were originally recruited for somatic mutation testing in *EGFR* (exons 18–21), *KRAS* (exons 2 and 3), *BRAF* (exons 11 and 15), and *NRAS* (exons 2 and 3) genes from different hospitals and clinics distributed in 22 healthcare centers located in the three states of the southern region of Brazil: Rio Grande do Sul ($N = 496$), Santa Catarina ($N = 20$), and Paraná ($N = 70$). Patients were not selected on previous cancer history or family history of cancer. Pathologic analyses confirmed typical adenocarcinoma histology in all cases. However, histological subtype data were available for only a small proportion (72/586) of patients. The mutation status of *EGFR*, *BRAF*, *KRAS*, and *NRAS* genes was evaluated using technical procedures as previously reported (Andreis et al., 2019). Genotyping was performed in a central laboratory, a diagnostic precision medicine program established in a tertiary care hospital in southern Brazil. Before initiation of this study, age at LUAD diagnosis, *EGFR/KRAS/BRAF* status, and histological subtype (when available) were annotated and samples were posteriorly de-identified. A consent waiver was approved by the Institutional Review Board specifically for the *TP53* c.1010G>A analysis, given that patient identification using only age at diagnosis, *EGFR/KRAS/BRAF/TP53* status and LUAD histological subtype would not allow patient re-identification.

DNA Extraction and *TP53* c.1010G>A Genotyping

Tumor DNA was extracted using the ReliaPrep™ FFPE gDNA Miniprep System (Promega), according to the manufacturer's recommendations. Next, TaqMan® allelic discrimination analyses of the pathogenic variant *TP53* c.1010G>A (rs121912664) were performed according to Applied Biosystems® standard protocols (Applied Biosystems, Carlsbad, CA United States), using fluorescent allele-specific probes as previously published (Fitarelli-Kiehl et al., 2016). An attempt to confirm rs121912664-positive results identified by TaqMan® by next generation sequencing (NGS) for determination of allele frequencies was made. Briefly, NGS of the *TP53* entire coding region (exons 2–11) and 70 pb exon-intron boundaries was done using a custom panel (Thermo Fisher Scientific, CA,

United States, reference number TP53.20140108.designed) on the Ion Torrent-Personal Genome Machine (PGM) platform. Amplicon library was prepared using the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific, CA, United States). PCR products were then sequenced on the Ion GeneStudio S5 system (Ion Torrent Systems Inc., Gilford, NH, United States). NGS results were interpreted using the Ion Reporter software considering a minimum coverage of 100X by amplicon. Integrative Genomics Viewer (IGV) was used for visualization of the mapped reads. Human TP53 cDNA sequence corresponding to the NM_000546.5 was used as a wild-type (WT) reference.

Statistical Analyses

Genotype and allele frequencies were estimated by simple counting. Clinical and molecular features of LUAD patients were assessed using descriptive statistics. Considering the low number of mutant alleles found in our study and limitations in clinical data availability, it was not possible to perform any meaningful statistical test in our comparisons between groups of carriers and non-carriers (see more in Results section). SPSS® version 18 (SPSS® Inc., Chicago, IL, United States) was used for data handling and for all descriptive analyses.

RESULTS

A total of 586 LUAD samples were included in this study. Clinical and molecular data are summarized in **Table 1**. Histopathological subclassifications were available only for 72 cases (12.3%). The most common subtypes were acinar (65.3%) and lepidic (34.7%). Moreover, the majority of LUAD samples (502/586, 85.7%) were tested for somatic mutations in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS*

driver genes. Somatic mutations were mostly identified in *KRAS* (29.5%) and *EGFR* (21.1%).

Specific TP53 c.1010G>A (p.Arg337His) genotyping by TaqMan® resulted in the identification of seven heterozygotes (GA genotype). Heterozygous genotype and mutant allele (A) frequencies were thus defined at 7/586 (1.2%) and 7/1,172 (0.6%), respectively. All patients in this subgroup were diagnosed with LUAD after age 50 years, and the median age at tumor onset was 60 years. In addition, most c.1010G>A tumors also had somatic *EGFR* (4/7, 57.1%) variants and none of them had a *KRAS* variant. Importantly, heterozygous genotype was confirmed by NGS in five (p.Arg337His)-positive cases (5/586, 0.85%). In the other two positive samples, further analyses were not possible due limitations in sample availability. Mutant allele frequencies determined by NGS were close to 50% in 3/5 cases, suggesting that at least in these cases, the variant may also be present in the germline. Details on each of the heterozygous samples are summarized in **Table 2**. Additional TP53 alterations detected in the tumors by NGS are depicted in **Supplementary Table 1**.

Lastly, a comparison of the available clinical and molecular features between TP53 c.1010G>A carriers identified by TaqMan® and non-carriers is presented in **Table 3** and **Supplementary Figure 1**. A difference between groups was observed for median age at cancer diagnosis and histological subtype but the number of mutant allele carriers (7/586) was too small to make meaningful comparisons. LUAD from three carriers were of the lepidic subtype (3/7, 42.8%), however, it is important to emphasize that three of the seven heterozygotes had no complete histological data, which hindered our ability to analyze a possible association between the c.1010G>A variant and occurrence of the lepidic subtype. Interestingly, the presence of somatic *EGFR* mutations was found in a much higher frequency in TP53 c.1010G>A carriers than in non-carriers (57.1 vs. 17.6%, respectively).

TABLE 1 | Clinical and molecular features of 586 patients with lung adenocarcinoma (LUAD) included in this study.

Features	Median (IR)*	N (%)†
Age at tumor diagnosis, years	67 (16)	–
Gender		
Male		271 (46.2)
Female		315 (53.8)
Histological subtype		72 (12.3)
Acinar		47 (65.3)
Lepidic		25 (34.7)
Patients tested for somatic alterations‡		502 (85.7)‡
<i>EGFR</i> mutation		106 (21.1)
<i>KRAS</i> mutation		148 (29.5)
<i>BRAF</i> mutation		
None		233 (46.4)
Carriers of TP53 c.1010G>A (p.Arg337His)§		7 (1.2)§

*IR, interquartile range.

†The percentage was calculated over the total number of genotyped samples (586) and over the number of cases for which the specified clinical data was available.

‡Tested for somatic *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations. Specific regions evaluated in each gene are detailed in the "Materials and Methods."

§Seven carriers were identified using TaqMan® assays, but heterozygous genotype was confirmed by NGS in only five positive cases due to limitations in sample availability for the remaining two patients.

DISCUSSION

The TP53 founder variant c.1010G>A, widely referred as R337H, is likely responsible for a significant proportion of the cancer burden in the Southern and Southeastern regions of Brazil due to its high frequency in the population (Achatz et al., 2009; Garritano et al., 2010). In a landmark study conducted in 171,000 newborns from the Southern Brazilian State of Paraná the variant was identified in 461 individuals (~0.3%) (Custódio et al., 2013). Previous analyses performed by our research group (Palmero et al., 2008) identified a similar prevalence (2/750, ~0.3%) in a cohort of healthy, asymptomatic women participating in a community-based breast cancer screening program in the state of Rio Grande do Sul (Southern Brazil). Furthermore, it has been well-documented that the variant exhibits incomplete, variable penetrance resulting in significant inter- and intra-familial heterogeneity in phenotypic presentation with some carriers surviving without any cancer diagnosis to older ages and others having the typical LFS phenotype, with one or more cancers diagnosed in childhood and/or adult life (reviewed in Achatz and Zambetti, 2016). Unlike most TP53 somatic and/or germline

TABLE 2 | Characterization of LUAD tumors with an identifiable *TP53* c.1010G>A pathogenic variant.

Identifier	Gender	Age at LUAD diagnosis (years)	Histological subtype	Somatic <i>EGFR</i> mutation	<i>TP53</i> c.1010G>A zygosity	WT*/ <i>TP53</i> c.1010G>A allele frequency (coverage)	Percentage of tumor cells in the sample
1	Male	57	NA [†]	p.(Leu858Arg)	Heterozygous	0.52/0.48 (2,400x)	40%
2	Male	65	Lepidic	p.(Ser768_Asp770dup)	Heterozygous	0.37/0.63 (2,259x)	30%
3	Female	55	NA	p.(Leu858Arg)	Heterozygous	0.24/0.76 (4,000x)	60%
4	Female	60	Lepidic	None	Heterozygous	0.42/0.58 (1,802x)	40%
5	Female	74	NA	p.(Leu858Arg)	Heterozygous	0.42/0.58 (1,835x)	70%
6	Female	54	Lepidic	Inconclusive [§]	Heterozygous	NP [‡]	5%
7	Female	62	Acinar	Inconclusive	Heterozygous	NP	40%

* WT, wild-type allele; † NA, not available; ‡ NP, not performed; § Inconclusive status due to technical limitations, such as availability of a low concentration of DNA extracted from the tumor tissue, and/or poor quality/purity of the tumor DNA, leading to inadequate results (low coverage) in the NGS analysis.

deleterious variants involved in tumorigenesis (i.e., those located in the DNA-binding domain of p53 protein), c.1010G>A is located in the p53 oligomerization domain and has been associated with a unique intracellular pH-dependent effect on protein stability, through which the mutant protein retains some partial tumor suppressor activity (DiGiammarino et al., 2002; Zerdoumi et al., 2017). More recently, a knock-in animal model containing the homologous *TP53* R337H variant (mouse R334H) demonstrated that this alteration triggers reduced formation of p53 dimers and tetramers (deficient oligomerization capacity) compared to WT *p53* in mouse liver tissues after exposure to a specific carcinogen (Park et al., 2018). Interestingly, the homozygous *p53* R334H mutant mice exposed to this carcinogen showed an increased liver tumor development, while mice with the same genotype that were not under exposure to the liver carcinogen developed normally without any significant difference in terms of either cancer incidence or life span compared with WT mice (Park et al., 2018, 2019).

Given its relevance, prevalence of the mutant allele (germline and/or somatic DNA analysis) has been extensively investigated in different Brazilian cohorts of patients with several tumor types, regardless of cancer family history (FH). In three studies evaluating patients with adrenocortical carcinoma (ACC), c.1010G>A was present in 90–97%, independent of cancer FH (Ribeiro et al., 2001; Seidinger et al., 2011; Mastellaro et al., 2018). Moreover, the variant was found in 69, 8.4, and 7.3% of unselected subjects diagnosed with choroid plexus carcinoma, neuroblastoma and osteosarcoma, respectively (Seidinger et al., 2011, 2015). Prevalence of the variant in breast cancer (BC) patients from southern and southeastern Brazil was also studied. In three independent case series, prevalences of 3.4% (familial BC but without a clear LFS phenotype) and 2.5–8.6% (BC patients unselected for cancer FH diagnosed in different age groups) were observed (Giacomazzi et al., 2014; Hahn et al., 2018).

In the present study, we identified seven LUAD tumors harboring the founder *TP53* variant among 586 samples recruited

from patients in southern Brazil, a cohort described in detail elsewhere (Andreis et al., 2019). Remarkably, all variant-positive tumors were diagnosed over age 50 years. The late onset of LC in *TP53* c.1010G>A carriers is in agreement with a recent finding showing a lifelong cancer risk pattern characterized by a bimodal age distribution: one peak in the first 10 years of life associated mainly with ACC and CNS tumors, and a second peak in the fifth decade in which different tumor types occur, including LC (Mastellaro et al., 2017). Although LC (especially LUAD) is not among the core, most frequent tumors originally described in LFS, it has been described in Brazilian LFS families with the *TP53* c.1010G>A variant (Barbosa et al., 2020), together with other atypical tumors such as papillary thyroid and renal cancers (Achatz and Zambetti, 2016).

Although *TP53* c.1010G>A prevalence in LUAD reported in the present study (1.2%) is substantially higher than the

TABLE 3 | Comparison of clinical and molecular features between LUAD samples of *TP53* c.1010G>A carriers and non-carriers.

Features	Carriers, N = 7	Non-carriers, N = 579
Median age at diagnosis, years (IR)*	60 (10)	67 (16)
Histological subtype, N (%)	4 (57.1)	68 (11.7)
Acinar	1 (14.3)	46 (7.9)
Lepidic	3 (42.8)	22 (3.8)
Patients with other somatic alterations, N (%) [†]	5 (71.4)	497 (85.8)
<i>EGFR</i> mutation	4 (57.1)	102 (17.6)
<i>KRAS</i> mutation	0	148 (25.6)
<i>BRAF</i> mutation	0	15 (2.6)
Median age at diagnosis restricted to <i>EGFR</i> -mutant subtype, years (IR)	61 (16)	67.5 (20)

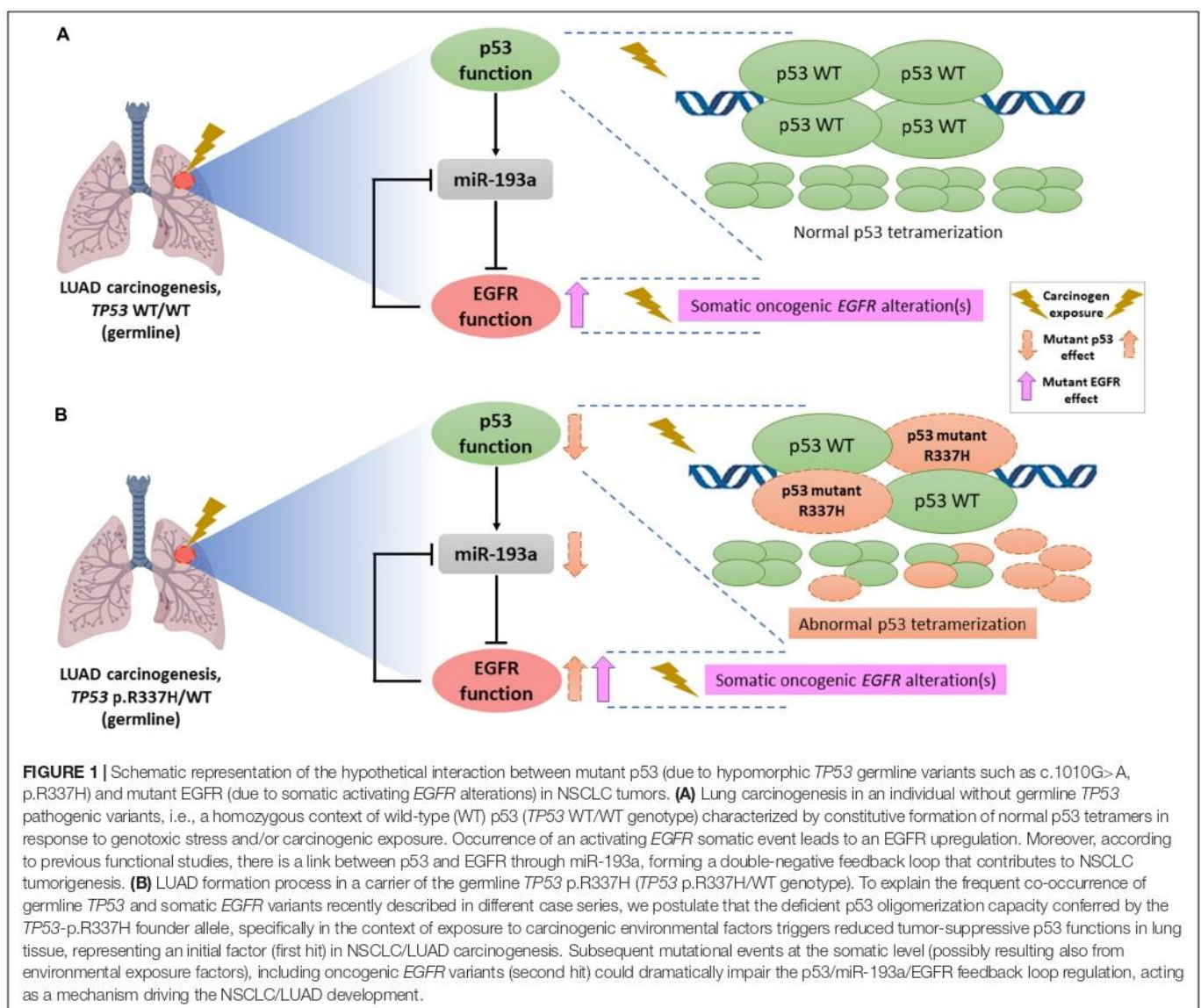
*IR, interquartile range.

[†]A total of 502/586 LUAD cases were tested for somatic *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* mutations.

population frequency observed in large cohorts of healthy individuals from the same Brazilian region (0.3%) (Palmero et al., 2008; Custódio et al., 2013), it is much lower than the prevalences previously described by Couto et al. (2017), and Barbosa et al. (2020). The conflicting results between our study and the study performed by Couto et al. (2017) may be explained by two main reasons: (a) small sample size along with a putative selection bias in patient recruitment in the study conducted by Couto et al. indirectly evidenced by high proportion of carriers identified with a cancer FH; and (b) employment of different variant screening approaches (PCR-RFLP vs. TaqMan®), since use of restriction endonucleases may be associated with increased false-positive rates (Uemura et al., 2004; Kang et al., 2009). The study by Barbosa et al. (2020), although performed on a larger sample size, is also a single center study developed in an institution that has been a reference center for the diagnosis and follow-up of LFS families. In addition, one cannot exclude presence of specific,

regional environmental factors (carcinogenic exposure, similar to what has been observed in mouse models) which might act triggering LUAD carcinogenesis in c.1010G>A carriers and result in a variable susceptibility to LUAD in carriers from different geographic regions.

Another interesting finding of our study was the co-occurrence of *TP53* c.1010G>A and activating *EGFR* mutations, which is in agreement with two previous reports (Barbosa et al., 2020; Mezquita et al., 2020). Studying LFS patients with a germline *TP53* pathogenic variant (either DNA-binding variants or the founder c.1010G>A) and LUAD, Barbosa et al. (2020) and Mezquita et al. (2020) identified somatic *EGFR* alterations in 89 and 85% of the tumors, respectively. In our study, *EGFR* variants occurred in 57.1% of the *TP53* c.1010G>A-positive tumors, a lower proportion than reported before, but our cohort was not of LFS patients. In addition, when looking at 114 LUAD patients with *EGFR* mutations from a non-LFS cohort,



Barbosa et al. (2020) observed a *TP53* codon 337 variant in 5.3%, which was further increased to 12.5% (4/32) when considering only patients diagnosed before age 50 years. In our study, *TP53* c.1010G>A was present in 4/106 (3.8%) LUAD samples with activating *EGFR* mutations, and all patients with both alterations were diagnosed after the age of 50 years. Importantly, ethnic ancestry has major impact on the incidence of *EGFR* mutation status in NSCLC patients, being lower (around 10%) in regions with higher European ancestry representation (Gahr et al., 2013). The prevalence of European ancestry in the population studied here, i.e., from Southern Brazil, has been estimated at 80–90%, the highest among all Brazilian regions (Ruiz-Linares et al., 2014). In agreement with this observation, several studies evaluating the human leukocyte antigen genotypic diversity in this region also confirmed a high European ancestry and a meaningful difference from Asians or even Brazilian indigenous populations (Castro et al., 2019).

Indeed, the frequent co-occurrence of *TP53* and *EGFR* sequence variants is striking and it might be explained by a p53/miR-193a/*EGFR* feedback loop mechanism previously reported as a driving force for NSCLC tumorigenesis (Wang et al., 2019). *In vitro* and *in vivo* studies demonstrated that WT p53 directly activates miR-193a transcription and, in turn, miR-193a directly targets *EGFR*, whereas *EGFR* functions as a transcriptional repressor to negatively control miR-193a expression, forming a feedback loop (Figure 1A). Considering the repeated reports of co-occurrence of *TP53* and *EGFR* variants in LUAD, including the present study, we hypothesize that occurrence of an activating *EGFR* somatic event on a background of a tissue already harboring a mutant (germline) *TP53* allele (such as c.1010G>A) may result in an impairment of this loop function, promoting NSCLC formation and tumor growth (Figure 1B). In parallel, it has been widely described that, upon conditions of genotoxic stress in the cellular context, presence of functional *TP53* germline variants, especially hypomorphic variants (c.1010G>A), leads to a loss of p53 tumor-suppressive functions (such as DNA damage repair and cell-cycle arrest), triggering a genomic instability that, in turn, may promote the accumulation of somatic mutations at different genes (Zerdoumi et al., 2017; Park et al., 2018), which could include the hotspot regions of somatic *EGFR* mutations. Additionally, a previous study suggested that radiation-induced cancers are more common among LFS patients (harboring germline *TP53* pathogenic variants) (Heymann et al., 2010). Although the underlying mechanism is not known, in recent reports of *EGFR*-mutated lung tumors in LFS patients, researchers hypothesized that the first genetic hit was a germline *TP53* mutation and suggested that chemotherapy or radiotherapy (i.e., genotoxic stress-inducing conditions) promoted a second hit, which might have consisted specifically of somatic *EGFR* mutations (Michalarea et al., 2014; Ricordel et al., 2015). Further functional studies are required to confirm this latter hypothesis, as well as to elucidate, mechanistically, the reason why patients with *TP53* germline mutations seem to harbor, more frequently, activating *EGFR* mutations in lung tissue.

Finally, the results of the current study must be interpreted with caution, considering its limitations. First, LUAD specimens

were obtained retrospectively from a diagnostic cohort de-identified for this study, hindering the inquiry about clinical data, such as histological subtype, smoking habit, cancer FH, and ethnic ancestry. Second, for the same reason, germline screening for the variant was not done and, thus, the study design employed here did not allow contact with R337H-positive patients or their relatives. Lastly, the limited availability of samples did not allow additional analyses of the tumor samples such as LOH testing.

In conclusion, when compared to previous studies in Brazilian patients with LUAD, the prevalence of *TP53* c.1010G>A, although higher than expected for the general population, was much lower in our series from Southern Brazil, suggesting that there may be regional variations. The variability observed so far, in the absence of large prevalence studies in different regions of the country, and also without a more detailed cost-effectiveness analysis, do not allow, in our view, proposition of a general recommendation of testing all Brazilian LUAD patients for *TP53* c.1010G>A. Further studies assessing presence of *TP53* germline variants, or at least the founder c.1010G>A variant, in Brazilian LUAD patients, regardless of the age at tumor diagnosis and especially if they harbor activating *EGFR* mutations, should be undertaken in order to determine if universal screening for *TP53* c.1010G>A is justified. Ultimately, predictive testing in healthy family members of variant-positive LUAD probands might be useful to assess the clinical actionability toward the occurrence of other tumor types, and future cost-effectiveness analysis should include this clinical actionability after predictive testing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

The studies involving human participants were reviewed and approved by Institutional Review Board from Hospital de Clinicas de Porto Alegre (IRB-HCPA). Written informed consent for participation was not required for this study in accordance with the national legislation and the institutional requirements.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

IV, TA, GM, and PA-P conceived the work and conception design of the brief research report. IV, TA, and PA-P designed the draft of the manuscript and carried out the statistical analyses. TA, GM, and PA-P were involved in recruitment of tumor DNA samples and retrospective search of clinical data. TA, BF, IV, GM, MA, and DS performed the genotyping and NGS analyses, as well as the interpretation of results from these experiments. IV, TA, MA, GM, DS, and PA-P helped to draft the manuscript. PA-P supervised the work. All authors revised the manuscript critically,

contributed with interpretation of the findings and gave final approval of the version to be published.

FUNDING

This study was supported in part by funds from Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, grant number #18-0099 to GM) and from the Canada-Israel Health Research Initiative, jointly funded by the Canadian Institutes of Health Research, the Israel Science Foundation, the International

Development Research Centre, Canada and the Azrieli Foundation (application #384428 2017-02-14/IDRC File #108587-001 to DS). PA-P. receives a researcher grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Bruno da Silveira Corrêa, Fernanda de Paris, Bárbara Alemar, and Kendi Nishino Miyamoto for their valuable contributions and technical support.

REFERENCES

- Achatz, M. I., Hainaut, P., and Ashton-Prolla, P. (2009). Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol.* 10, 920–925. doi: 10.1016/S1470-2045(09)70089-0
- Achatz, M. I., Olivier, M., Le Calvez, F., Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B. M., et al. (2007). The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 245, 96–102. doi: 10.1016/j.canlet.2005.12.039
- Achatz, M. I., and Zambetti, G. P. (2016). The Inherited p53 mutation in the Brazilian population. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6:a026195. doi: 10.1101/cshperspect.a026195
- Andreis, T. F., Correa, B. S., Vianna, F. S., De-Paris, F., Siebert, M., Leistner-Segal, S., et al. (2019). Analysis of predictive biomarkers in patients with lung adenocarcinomas from southern Brazil reveals a distinct profile from other regions of the country. *J. Glob. Oncol.* 5, 1–9. doi: 10.1200/JGO.19.00174
- Barbosa, M. V. R., de Lima, V. C., Formiga, M. N., de Paula, C. A., Torrezan, G. T., and Carraro, D. M. (2020). High prevalence of egfr mutations in lung adenocarcinomas from Brazilian patients harboring the TP53 p.R337H variant. *Clin. Lung Cancer* 21, e37–e44. doi: 10.1016/j.clcc.2019.11.012
- Caron, O., Frebourg, T., Benusiglio, P. R., Foulon, S., and Brugieres, L. (2017). Lung adenocarcinoma as part of the Li-Fraumeni syndrome spectrum. *JAMA Oncol.* 3, 1736–1737. doi: 10.1001/jamaoncol.2017.1358
- Castro, M. S., Issler, H. C., Gelmini, G. F., de Miranda, B. L. M., Calonga-Solis, V., Schmidt, A. H., et al. (2019). High-resolution characterization of 12 classical and non-classical HLA loci in Southern Brazilians. *HLA* 93, 80–88. doi: 10.1111/tan.13488
- Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (Cosmic) (2020). *Graphical View of Mutations Across TP53 Gene*. <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=TP53> (Accessed September 15, 2020).
- Couto, P. P., Bastos-Rodrigues, L., Schayek, H., Melo, F. M., Lisboa, R. G. C., Miranda, D. M., et al. (2017). Spectrum of germline mutations in smokers and non-smokers in Brazilian non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Carcinogenesis* 38, 1112–1118. doi: 10.1093/carcin/bgx089
- Custódio, G., Parise, G. A., Kiesel Filho, N., Komechen, H., Sabbaga, C. C., Rosati, R., et al. (2013). Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Oncol.* 31, 2619–2626. doi: 10.1200/JCO.2012.46.3711
- DiGiammarino, E. L., Lee, A. S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R. C., et al. (2002). A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat. Struct. Biol.* 9, 12–16. doi: 10.1038/nsb730
- Ding, L., Getz, G., Wheeler, D. A., Mardis, E. R., McLellan, M. D., Cibulskis, K., et al. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature* 455, 1069–1075. doi: 10.1038/nature07423
- Fitarelli-Kiehl, M., Macedo, G. S., Schlatter, R. P., Koehler-Santos, P., Matte, U. S., Ashton-Prolla, P., et al. (2016). Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53. *Genet. Mol. Biol.* 39, 203–209. doi: 10.1590/1678-4685-GMB-2014-0351
- Gahr, S., Stoehr, R., Geissinger, E., Ficker, J. H., Brueckl, W. M., Gschwendtner, A., et al. (2013). EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice. *Br. J. Cancer* 109, 1821–1828. doi: 10.1038/bjc.2013.511
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E. I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Le Calvez-Kelm, F., 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, 143–150. doi: 10.1002/humu.21151
- Giacomazzi, J., Graudenz, M. S., Osorio, C. A., Koehler-Santos, P., Palmero, E. I., Zagonel-Oliveira, M., et al. (2014). Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One* 9:e99893. doi: 10.1371/journal.pone.0099893
- Giacomazzi, J., Selistre, S. G., Rossi, C., Alemar, B., Santos-Silva, P., Pereira, F. S., et al. (2013). Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer* 119, 4341–4349. doi: 10.1002/cncr.28346
- Greenman, C., Stephens, P., Smith, R., Dalgliesh, G. L., Hunter, C., Bignell, G., et al. (2007). Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* 446, 153–158. doi: 10.1038/nature05610
- Hahn, E. C., Bittar, C. M., Vianna, F. S. L., Netto, C. B. O., Biazús, J. V., Cericatto, R., et al. (2018). TP53 p.Arg337His germline mutation prevalence in Southern Brazil: further evidence for mutation testing in young breast cancer patients. *PLoS One* 13:e0209934. doi: 10.1371/journal.pone.0209934
- Hammerman, P. S., Lawrence, M. S., Voet, D., Jing, R., Cibulskis, K., Sivachenko, A., et al. (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature* 489, 519–525. doi: 10.1038/nature11404
- Heymann, S., Delalogue, S., Rahal, A., Caron, O., Frebourg, T., Barreau, L., et al. (2010). Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Radiat. Oncol.* 5:104. doi: 10.1186/1748-717X-5-104
- Imielinski, M., Berger, A. H., Hammerman, P. S., Hernandez, B., Pugh, T. J., Hodis, E., et al. (2012). Mapping the hallmarks of lung adenocarcinoma with massively parallel sequencing. *Cell* 150, 1107–1120. doi: 10.1016/j.cell.2012.08.029
- Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (Inca) (2020). *Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil*. <https://www.inca.gov.br> (Accessed September 15, 2020)
- International Agency for Research on Cancer TP53 database (Iarc) (2020). *Selected Statistics on Somatic Mutations*. <http://p53.iarc.fr/TP53SomaticMutations.aspx> (Accessed September 15, 2020)
- Jordan, E. J., Kim, H. R., Arcila, M. E., Barron, D., Chakravarty, D., Gao, J., et al. (2017). Prospective comprehensive molecular characterization of lung adenocarcinomas for efficient patient matching to approved and emerging therapies. *Cancer Discov.* 7, 596–609. doi: 10.1158/2159-8290.CD-16-1337
- Kang, S. H., Cho, S. I., Chae, J. H., Chung, K. N., Ra, E. K., Kim, S. Y., et al. (2009). False homozygous deletions of SMN1 Exon 7 Using Dra I PCR-RFLP caused by a novel mutation in spinal muscular atrophy. *Genet. Test. Mol. Biomark.* 13, 511–513. doi: 10.1089/gtmb.2008.0158
- Mastellaro, M. J., Ribeiro, R. C., Oliveira-Filho, A. G., Seidinger, A. L., Cardinalli, I. A., Miranda, E. C. M., et al. (2018). Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. *J. Pediatr.* 94, 432–439. doi: 10.1016/j.jpeds.2017.06.009

- Mastellaro, M. J., Seidinger, A. L., Kang, G., Abrahão, R., Miranda, E. C. M., Pounds, S. B., et al. (2017). Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer* 123, 3150–3158. doi: 10.1002/cncr.30703
- Mezquita, L., Jové, M., Nadal, E., Kfoury, M., Morán, T., Ricordel, C., et al. (2020). High prevalence of somatic oncogenic driver alterations in patients With NSCLC and Li-Fraumeni Syndrome. *J. Thorac. Oncol.* 15, 1232–1239. doi: 10.1016/j.jtho.2020.03.005
- Michalarea, V., Calcasola, M., Cane, P., Tobal, K., Izatt, L., and Spicer, J. (2014). EGFR-mutated lung cancer in Li-Fraumeni syndrome. *Lung Cancer* 85, 485–487. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.06.017
- Nogueira, S. T. S., Lima, E. N. P., Nóbrega, A. F., Torres, I. C. G., Cavicchioli, M., Hainaut, P., et al. (2015). 18F-FDG PET-CT for surveillance of Brazilian Patients with Li-Fraumeni syndrome. *Front. Oncol.* 5:38. doi: 10.3389/fonc.2015.00038
- Palmero, E. I., Schüler-Faccini, L., Caleffi, M., Achatz, M. I., Olivier, M., Martel-Planche, G., et al. (2008). 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.* 261, 21–25. doi: 10.1016/j.canlet.2007.10.044
- Park, J. H., Li, J., Starost, M. F., Liu, C., Zhuang, J., Chen, J., et al. (2018). Mouse homolog of the human TP53 R337H mutation reveals its role in tumorigenesis. *Cancer Res.* 78, 5375–5383. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0016
- Park, J. H., Wang, P. Y., and Hwang, P. M. (2019). Modeling the prevalent germline TP53 R337H mutation in mouse. *Oncotarget* 10, 631–632. doi: 10.18632/oncotarget.26603
- Peifer, M., Fernández-Cuesta, L., Sos, M. L., George, J., Seidel, D., Kasper, L. H., et al. (2012). Integrative genome analyses identify key somatic driver mutations of small-cell lung cancer. *Nat. Genet.* 44, 1104–1110. doi: 10.1038/ng.2396
- Ribeiro, R. C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G. P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A. R., et al. (2001). An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 9330–9335. doi: 10.1073/pnas.161479898
- Ricordel, C., Labalette-Tiercin, M., Lespagnol, A., Kerjouan, M., Dugast, C., Mosser, J., et al. (2015). EGFR-mutant lung adenocarcinoma and Li-Fraumeni syndrome: report of two cases and review of the literature. *Lung Cancer* 87, 80–84. doi: 10.1016/j.lungcan.2014.11.005
- Rizvi, N. A., Hellmann, M. D., Snyder, A., Kvistborg, P., Makarov, V., Havel, J. J., et al. (2015). Mutational landscape determines sensitivity to PD-1 blockade in non-small cell lung cancer. *Science* 348, 124–128. doi: 10.1126/science.1243483
- Ruiz-Linares, A., Adhikari, K., Acuña-Alonzo, V., Quinto-Sanchez, M., Jaramillo, C., Arias, W., et al. (2014). Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals. *PLoS Genet.* 10:e1004572. doi: 10.1371/journal.pgen.1004572
- Seidinger, A. L., Fortes, F. P., Mastellaro, M. J., Cardinali, I. A., Zambaldi, L. G., Aguiar, S. S., et al. (2015). Occurrence of Neuroblastoma among TP53 p.R337H Carriers. *PLoS One* 10:e0140356. doi: 10.1371/journal.pone.0140356
- Seidinger, A. L., Mastellaro, M. J., Paschoal Fortes, F., Godoy Assumpção, J., Aparecida Cardinali, I., Aparecida Ganazza, M., et al. (2011). Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil. *Cancer* 117, 2228–2235. doi: 10.1002/cncr.25826
- Tinat, J., Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Bouvignies, E., et al. (2009). 2009 Version of the chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J. Clin. Oncol.* 27, e108–e109. doi: 10.1200/JCO.2009.22.7967
- Uemura, T., Hibi, K., Kaneko, T., Takeda, S., Inoue, S., Okochi, O., et al. (2004). Detection of K-ras mutations in the plasma DNA of pancreatic cancer patients. *J. Gastroenterol.* 39, 56–60. doi: 10.1007/s00535-003-1245-1
- Wang, W., Shen, X. B., Jia, W., Huang, D. B., Wang, Y., and Pan, Y. Y. (2019). The p53/miR-193a/EGFR feedback loop function as a driving force for non-small cell lung carcinoma tumorigenesis. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 11:1758835919850665. doi: 10.1177/1758835919850665
- Zerdoumi, Y., Lanos, R., Raad, S., Flaman, J. M., Bougeard, G., Frebourg, T., et al. (2017). Germline TP53 mutations result into a constitutive defect of p53 DNA binding and transcriptional response to DNA damage. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2591–2602. doi: 10.1093/hmg/ddx106

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Vieira, Andreis, Fernandes, Achatz, Macedo, Schramek and Ashton-Prolla. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Corrigendum: Prevalence of the Brazilian *TP53* Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients?

Igor Araujo Vieira^{1,2†}, Tiago Finger Andreis^{1,2†}, Bruna Vieira Fernandes^{2,3}, Maria Isabel Achatz⁴, Gabriel S. Macedo^{2,5}, Daniel Schramek^{6,7} and Patricia Ashton-Prolla^{1,2,5*}

¹Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

²Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

³Curso de Graduação em Biomedicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁴Departamento de Oncogenética, Hospital Sírio Libanês, São Paulo, Brazil

⁵Programa de Medicina Personalizada, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Brazil

⁶Centre for Molecular and Systems Biology, Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Canada

⁷Department of Molecular Genetics, University of Toronto, Toronto, ON, Canada

†These authors contributed equally to this work.

*Correspondence:

Patricia Ashton-Prolla
pprolla@hcpa.edu.br;
pprolla@gmail.com

Keywords: *TP53* gene, p53 protein, lung adenocarcinoma, founder variant, *TP53* (p.Arg337His), R337H, non-small cell lung cancer, Li-Fraumeni syndrome

Corrigendum on: Vieira IA, Andreis TF, Fernandes BV, Achatz MI, Macedo GS, Schramek D and Ashton-Prolla P (2021) Prevalence of the Brazilian *TP53* Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients? *Front. Genet.* 12:606537. doi: 10.3389/fgene.2021.606537

In the original article, there were two errors. Due to a misinterpretation of some findings described in the recent work conducted by Barbosa and colleagues (2020), two sentences reporting frequency data of *TP53* c.1010G>A obtained from this previous study were incorrectly written in our manuscript.

A correction has been made to Abstract, third sentence:

Recently, this variant was identified in **2.4** and **8.9% (overall frequency)** of two apparently unselected, single center case series of Brazilian lung adenocarcinoma (LUAD) patients from the Southeastern and Central regions of the country, respectively.

Another correction has been made to Introduction, second paragraph:

Importantly, a more recent single center study in Southeastern Brazil also observed a high prevalence of ***TP53* variants at codon 337 (predominantly c.1010G>A, p.Arg337His)** in an unselected series of 114 EGFR-positive LUAD patients: **these variants were present in 5.3** and **12.5%** of samples when considering diagnosis at any age or before the age of 50 years, respectively (Barbosa et al., 2020).

The authors apologize for these errors and state that this does not change the scientific conclusions of the article in any way. The original article has been updated.

Reference

Barbosa, M. V. R., de Lima, V. C., Formiga, M. N., de Paula, C. A., Torrezan, G. T., and Carraro, D. M. (2020). High prevalence of egfr mutations in lung adenocarcinomas from Brazilian patients harboring the TP53 p.R337H variant. *Clin. Lung Cancer* 21, e37–e44. doi: 10.1016/j.clcc.2019.11.012

Capítulo V – Artigo 2

Revisiting the prevalence of a *TP53* polyadenylation signal variant (rs78378222) in cohorts of lung and prostatic adenocarcinomas: further evidence from southern Brazil and overview of previous functional findings

Manuscrito a ser submetido como Artigo Original à revista *Gene*.

Revisiting the prevalence of a *TP53* polyadenylation signal variant (rs78378222) in cohorts of lung and prostatic adenocarcinomas: further evidence from southern Brazil and overview of previous functional findings

Igor Araujo Vieira^{1,2,*}, Eduarda Heidrich Pezzi^{2,*}, Thayne Woycinck Kowalski^{1,2,3,4,5,6}, Guilherme Danielski Viola^{1,2}, Bruna Vieira Fernandes², Tiago Finger Andreis^{1,2}, Yasminne Marinho de Araújo Rocha², Bruno da Silveira Corrêa², Luiza Mezzomo Donatti^{7,8}, Gabriela dos Santos Sant'Anna⁷, Helena von Eye Corleta^{7,9,10}, Ilma Simoni Brum^{7,8}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,3,4,5,11}, Gabriel S. Macedo^{1,2,12}, Edenir Inez Palmero^{13,14,15}, Patricia Ashton-Prolla^{1,2,12,16**}

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

² Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

³ Laboratório de Genética Médica e Populacional, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁴ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁵ Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁶ Complexo de Ensino Superior de Cachoeirinha (CESUCA), Cachoeirinha, Rio Grande do Sul, Brazil

⁷ Laboratório de Biologia Molecular Endócrino e Tumoral, Departamento de Fisiologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

⁸ Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

⁹ Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

¹⁰ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

¹¹ Laboratório de Imunobiologia e Imunogenética, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

¹² Programa de Medicina Personalizada, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

¹³ Laboratório de Diagnóstico Molecular, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, Hospital de Câncer de Barretos, Barretos, São Paulo, Brazil

¹⁴ Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

¹⁵ Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil

¹⁶ Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

*These authors contributed equally to this work.

** Corresponding author

E-mail: pprolla@gmail.com (PA-P)

Abstract

The *TP53* 3'UTR germline variant rs78378222 A>C has been associated with several tumor types in European populations. It modifies the polyadenylation signal (PAS) sequence of *TP53*, resulting in p53 expression's decrease in heterozygotes. Its prevalence is not yet known in all tumors and in admixed/non-European populations. Previous functional studies demonstrate that rs78378222 modulates p53 expression and function through impairment of the *TP53* mRNA polyadenylation efficiency and interference on the negative regulation by specific microRNAs. Herein, we examine germline or somatic prevalences of rs78378222 in cohorts of patients diagnosed with lung adenocarcinoma (LUAD, n=586), prostatic adenocarcinoma (PAC, n=153), benign prostatic hyperplasia (BPH, n=167), and uterine leiomyoma (ULM, n=41) in southern Brazil. The minor allele (C) was identified in 6/586 LUAD tumors (somatic prevalence = 1.02%). In the germline, the allele was observed in 1/153 (0.65%) PAC and 1/167 (0.6%) BPH patients. The variant was absent in the ULM cohort and the rs78378222[C/C] genotype was not identified. Further analyses including larger cohorts with different tumor types and patients from distinct regions of Brazil should be undertaken in order to confirm the low prevalence of rs78378222[C] in Brazilian population and determine if a broad screening for this *TP53* PAS variant is justified.

Keywords: rs78378222, polyadenylation signal, non-coding variant, 3' untranslated region, *TP53* gene, cancer risk.

1. Introduction

The p53 protein, encoded by the *TP53* gene, is a crucial tumor suppressor which regulates multiple anti-proliferative pathways in response to diverse cellular stress signals (Levine, 1997; Vogelstein et al., 2000; Beroud & Soussi, 2001). The protein is a transcription factor which binds to response elements in regulatory regions of multiple target genes, including genes mediating cell cycle arrest, apoptosis, autophagy, senescence, energetic metabolism, and DNA repair (Vogelstein et al., 2000; Soussi & Beroud, 2001; Biegging et al., 2014). Somatic *TP53* sequence variants are the most frequent alterations in human cancers, while pathogenic germline variants in this gene are the underlying cause of Li-Fraumeni syndrome (LFS), which is characterized by increased early-onset cancer predisposition (Li et al., 1988; Malkin et al., 1990; Petitjean et al., 2007). Most reported and studied *TP53* variants are single-base substitutions, missense variants distributed throughout the coding sequence, predominantly located within exons 5–8, corresponding to the DNA-binding domain (DBD) of p53 protein (Hainaut & Hollstein, 2000; Petitjean et al., 2007; Bouaoun et al., 2016).

Although most studies have focused on molecular analyses encompassing exonic regions and exon-intron boundaries, sequence variants in 5' and 3' untranslated regions (UTR) of *TP53* have been recently explored and described as tumor-promoting alterations (Stacey et al., 2011; Li et al., 2013; Diederichs et al., 2016; Deng et al., 2019). Indeed, 5'- and especially 3'UTR, are highly conservative elements and commonly suggested as microRNA (miRNA) binding sites (Jardin & Coiffier, 2013). Therefore, sequence variants in these elements may have a greater impact on protein expression since 3'UTR contains polyadenylation regulatory sequences, controlling mRNA stability, localization and the efficiency of protein translation (Matoulkova et al., 2012; Erson-Bensan, 2020). In this context, Li and colleagues (2013) first analyzed both UTRs of the *TP53* gene and showed that somatic alterations occurred frequently in these regions and that they had prognostic value in a large cohort of tumor specimens from patients with a subtype of lymphoma (Li et al., 2013).

The contribution of 3'UTR noncoding variants to the inherited predisposition to cancer is not fully understood (Erson-Bensan, 2020). However, the detection of a novel germline rare variant (rs78378222, NM_000546.5:c.*1175A>C) within the sole polyadenylation signal (PAS) sequence of *TP53* has brought attention to this hypothesis, since this variant exhibited a minor allele frequency (MAF) ranging from 0.003 to 0.044 in controls and cancer-affected individuals

from European ancestry cohorts, respectively, and was consistently associated with increased cancer risk (Stacey et al., 2011). In 2011, a genome wide association study (GWAS) first reported *TP53* rs78378222 in Icelanders. In the same study, rs78378222 A-to-C transition was associated with an increased risk of developing cutaneous basal cell carcinoma, prostate cancer, glioma and colorectal adenoma in Iceland and other European populations (Stacey et al., 2011). The nucleotide alteration changes the *TP53* PAS from AATAAA to AATACA and results in impaired *TP53* 3'-end processing, thereby decreasing p53 protein expression, which may in turn also affect other genes indirectly, through alterations in p53 downstream functions such as apoptosis (Stacey et al., 2011; Li et al., 2013; Macedo et al., 2016).

Ten years after its first description, the rs78378222[C] allele has been described as a risk allele for development of other tumors, including brain cancers (predominantly glioma and neuroblastoma), esophageal squamous cell carcinoma, uterine leiomyoma, soft-tissue sarcoma, and non-melanomatous skin cancer mainly in cohorts of European ancestry (Zhou et al., 2012; Enciso-Mora et al., 2013; Diskin et al., 2014; Rafnar et al., 2018; Deng et al., 2019; Di Giovannantonio et al., 2021). Importantly, a meta-analysis conducted by Wang and colleagues (2016) identified that this variant confers susceptibility to cancer in general (Wang et al., 2016). More recent studies focused on molecular mechanisms that lead to the tumor-promoting behavior seen in association with the variant. In addition to the disruption of the PAS sequence, *in vitro* and *in vivo* analyses demonstrated that the variant creates and alters miRNA binding sites in the *TP53* 3'UTR, which definitely confirmed the initial hypothesis that it was a functional variant (Deng et al., 2019; Zhang et al., 2021).

Previous findings indicated that rs78378222[C] minor allele was not associated with lung cancer (not specified distribution of histological types) in a case series from the USA (Guan et al., 2013), while it was significantly associated with increased risk for prostate cancer and uterine leiomyoma (ULM) in European populations (Stacey et al., 2011; Rafnar et al., 2018). Interestingly, the prevalence of rs78378222[C] carriers in non-tumoral conditions, such as benign prostatic hyperplasia (BPH), has not yet been assessed. In this context, Brazil has an admixed population with a highly heterogeneous genetic background, including European, African and Native American ancestries (Moura et al., 2015; Souza et al., 2019). Surprisingly, a previous study from our research group is the only report to date evaluating rs78378222 in cancer cohorts from the Brazilian population, and it focused on a sample from the southern region of the country (Macedo et al., 2016). Thus, the allele and genotype frequencies of this

TP53 noncoding variant in patients with different tumor types from southern and other regions of Brazil have not been completely described. Hence, the aim of this study was to determine the prevalence of the *TP53* rs7837822 (A>C) variant in a group of lung adenocarcinoma (LUAD) tumors and ULM cases (somatic analyses) and in cohorts of patients with prostatic adenocarcinoma (PAC) and BPH (germline analyses) from Southern Brazil. Additionally, we also characterized the clinical and molecular features associated with variant-positive patients and provide an overview of the main findings about molecular mechanisms disrupted by this alteration and case-control association studies described so far.

2. Results

Clinical samples obtained from a total of 947 individuals diagnosed with LUAD, PAC, BPH and ULM were included in this study. General clinical data according to the study groups are summarized in **Table 1**. The largest group of analysis comprised 586 LUAD tumor samples, of which 315 (53.8%) were women. PAC (n=153), BPH (n=167) and ULM (n=41) groups were predominantly composed of self-identified ethnicity as white. Due to the retrospective study design for recruitment of LUAD specimens, self-identified ethnic ancestry data was not available for this group. The mean or median age at tumor/condition diagnosis was concentrated in the sixth decade of life in the LUAD, PAC and BPH cohorts, while in the fourth decade in ULM-affected women. Other specific clinical features of each tumor/condition are presented in **Table S1**. All PAC tumors had a Gleason score assigned of 6 or higher, and most ULM cases (51.5%) presented uterine location classified as intramural.

Allele and genotype frequencies of *TP53* rs78378222 in each group of analysis are shown in **Table 2**. Among 586 LUAD tumor specimens, we detected only 6 tumors with the PAS variant in heterozygosity. Therefore, the somatic frequencies of the rs78378222[A/C] genotype and C allele were 6/586 (1.02%) and 6/1172 (0.51%), respectively. However, although this PAS variant was robustly associated with risk for prostate cancer and ULM in previous studies, it was identified in only 1 PAC-affected patient (germline frequency of heterozygous genotype 0.65%) and 1 BPH case (germline frequency of heterozygotes 0.6%). Beyond the low prevalence of rs78378222[C] in the PAC (0.33%) and BPH (0.29%) cohorts, as expected for a rare variant, it was not observed in our small case series of ULM (additional group of analysis, n=41).

Considering all rs78378222[A/C] heterozygotes identified in the overall sample (n=8), only one patient had a cancer diagnosis at an early age: a LUAD-affected female diagnosed at age 44, with a somatic activating *EGFR* alteration in the tumor (**Table 3**). In addition, two LUAD tumors harboring the rs78378222[C] allele exhibited another somatic oncogenic driver variant, namely *KRAS* p.(Gly12Cys). Other LUAD variant-positive specimens had no identifiable somatic *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* alterations. Detailed characterization regarding the testing status for somatic variants in our LUAD case series is presented in **Table S2**. Although the number of rs78378222[C]-positive samples in the LUAD cohort (6/586) was small to perform meaningful comparisons, we were able to verify a similar mean or median age at tumor diagnosis between variant allele carriers and non-carriers' groups (**Table S2**). Additional somatic sequence alterations in the *TP53* coding regions and exon-intron boundaries were detected by NGS in four variant-positive LUAD tumors (**Table S3**). All of these tumors had at least one pathogenic/likely pathogenic alteration in the p53 DBD, of which three (75%) exhibited the previously reported alteration *TP53* c.751A>C (p.Ile251Leu) with a low allele frequency (<0.05) in tumor DNA. In the other two positive LUAD cases, NGS analyses were not performed due to limitations in sample availability.

Interestingly, most of the heterozygotes were diagnosed with cancer late in life (>70 years; 6/7, 85.7%). Both heterozygotes identified in the PAC and BPH cohorts were self-identified as white males. Of particular interest, the PAC-affected patient harboring the variant had a family history of prostate cancer (affected father).

Importantly, homozygous individuals for the minor allele C were not identified in any of the study groups (**Table 2**). To better understand this finding, we queried updated frequency data of this variant (**Table S4**) and provided an overview of all case-control association analyses and functional evidence previously reported in the literature (**Table S5**). Among 18 initial search results addressing the rs78378222 variant, one review article was excluded as it mentions the variant but does not provide original data (Rice et al., 2016), while another study classified as review remained in our analysis because it represents the first meta-analysis of the relationship between this variant and overall cancer risk (Wang et al., 2016). Additionally, a meta-analysis of GWAS datasets reporting new statistical data about rs78378222 and risk of glioma subtypes (Melin et al., 2017) was included from its citation in one of the initial search results, totaling 18 articles in our final analysis. As depicted in **Figure 1**, functional evidence from these previous studies demonstrates that different genotypes for rs78378222 variant

modulate p53 expression levels and function through two main molecular mechanisms: (1) impairment of the polyadenylation efficiency of *TP53* transcripts, and (2) influence on their negative regulation by certain miRNAs, such as miR-382-5p, miR-325-3p and miR-125b. Given that it is a hypomorphic (i.e. multiple descriptions of p53 downregulation in clinical samples and cancer cell lines harboring the minor C-allele) and rare variant (MAF ranging from 0.002 to 0.02 in African and European populations, respectively), there are only a few reports of rs78378222[C/C] homozygotes in previous studies and different population databases (**Table S4**).

Lastly, we investigated whether other variants in the *TP53* gene would be differentially coinherited with rs78378222 in different populations (**Table S6**). Pairwise linkage disequilibrium data were available only to European ancestry populations, because this variant was not genotyped in other populations at the time of the 1000 Genomes project. Thus, specific data regarding the Brazilian *TP53* c.1010G>A (rs121912664, widely known as R337H) founder variant (Custodio et al., 2013) were not found. The rare noncoding variant rs35850753 (MAF=0.005), mapping to 5'UTR of the Δ 133 isoform of *TP53*, exhibited a strong linkage disequilibrium with the studied variant, having higher r^2 correlation values in UK, Italy and Finland. In contrast, rs17884306, a low-frequency 3'UTR variant recently identified in elderly individuals from southeastern Brazil (ABraOM database, MAF=0.03) (Naslavsky et al., 2020) had estimated r^2 values with rs78378222 below 0.3, suggesting that both *loci* are not in linkage disequilibrium in the European populations analyzed.

3. Discussion

Rare sequence variants (MAF<0.05), mainly those located in regulatory, noncoding regions of the genome have been proposed to contribute to the “missing heritability” in cancer (Bodmer & Tomlinson, 2010). Several studies suggest that rare variants have a more important functional consequence than common variants, and they tend to exhibit a stronger effect size than its counterparts (Gorlov et al., 2011). Therefore, rare variants are likely to be an essential element of the genetic basis of common human pathologies, including cancer (Bomba et al., 2017). In the past decade, a rare germline variant in the *TP53* 3'UTR, rs78378222 (A>C), initially reported by Stacey and colleagues (2011) as a risk allele for certain tumor types in European and USA populations has been described. Independent studies showed association

of this variant with susceptibility to prostate cancer, colorectal adenomas, brain tumors (mainly glioma and neuroblastoma), esophageal squamous cell carcinoma, uterine leiomyoma, soft-tissue sarcoma, and non-melanomatous skin cancer in different populations (Stacey et al., 2011; Egan et al., 2012; Zhou et al., 2012; Enciso-Mora et al., 2013; Diskin et al. 2014; Wang et al. 2015; Melin et al. 2017; Rafnar et al., 2018; Deng et al., 2019; Di Giovannantonio et al., 2020). Moreover, a meta-analysis reported association of the rs78378222[C] variant allele with an increased risk of cancer in general (Wang et al., 2016). This broad association with benign and malignant neoplasms is supported by functional analyses indicating that the presence of the minor allele C results in altered post-transcriptional *TP53* regulation (Stacey et al., 2011; Li et al., 2013; Macedo et al., 2016; Zhao et al., 2016; Deng et al., 2019; Zhang et al., 2021).

An overview of the functional consequences related to this variant from all available original articles (n=18) published to date shows that the A-to-C transition changes the canonical sequence of *TP53* PAS from AATAAA to AATACA and impairs *TP53* mRNA 3'-end processing, producing aberrant transcripts and thereby decreasing expression levels of both *TP53* mRNA and p53 protein. Reduced p53 levels were identified in cancer cell lines, animal model tissues and many different human clinical specimens (normal and tumor tissue samples) from rs78378222[A/C] heterozygotes (Stacey et al., 2011; Li et al., 2013; Diskin et al., 2014; Macedo et al., 2016; Wang et al., 2016; Deng et al., 2019). The presence of the C nucleotide also hinders negative *TP53* regulation exerted by miRNAs. Specifically, it creates a binding site for miR-382-5p and compromises miR-325-3p site, promoting the p53 downregulation, as demonstrated in miRNA expression analyses from a mouse model harboring the variant (Deng et al., 2019). Another study involving functional experiments in cultured lens epithelial cells demonstrated that the C-allele introduces a miR-125b targeting site in the *TP53* 3'-UTR mRNA (Zhao et al., 2016). Remarkably, a more recent work described four main findings regarding this variant: (1) significant enrichments of uncleaved, improperly terminated “run-on” *TP53* transcripts in cancer cell lines carrying the C-allele compared with the A-allele; (2) lower global levels of both WT and mutant mRNA *TP53* in a large cohort of tumors from The Cancer Genome Atlas (TCGA) harboring the rs78378222 minor allele and without somatic *TP53* copy number variations; (3) in a group of patients with WT *TP53* tumors from the TCGA cohort, those with the minor C-allele have significantly worse clinical outcomes (progression-free interval and overall survival) and treatment response (radiotherapy response) compared with those without the minor allele; (4) significant association of the minor allele with specific subtypes of breast

and ovarian cancers (estrogen receptor positive and low-grade serous, respectively) (Zhang et al., 2021). Together, these data confirm our previous hypothesis that rs78378222 confers susceptibility to different tumors through a mechanism of reduction in *TP53* dosage (haploinsufficiency) (Macedo et al., 2016).

Regarding the MAF of rs78378222 in cases and controls from different populations, it has been observed from a higher frequency (3-4%) in tumor-affected individuals with European ancestry (Stacey et al., 2011), to a lower frequency (~0,3%) in population controls with Latino and African ancestry according to the gnomAD v2.1.1 dataset. This great variability in variant frequencies was also verified in our previous study focusing on the populations of southern and southeastern Brazil (Macedo et al., 2016). These Brazilian regions are of particular interest due to their high frequency of another functional *TP53* variant in the general population (~0,3%, the highest value ever described for a *TP53* germline variation), the germline founder pathogenic variant c.1010G>A (rs121912664), commonly known as R337H or p.(Arg337His) (Pinto et al., 2004; Custodio et al., 2013; Achatz & Zambetti, 2016). Notably, in our previous analyses, rs78378222[C] carriers were not found in a group of LFS patients harboring germline *TP53* pathogenic variants (n=130) but were detected at a high frequency in patients with the LFS phenotype but no identifiable coding *TP53* pathogenic variants (7/129, 5.4%) (Macedo et al., 2016).

Herein, we identified a low somatic or germline prevalence of rs78378222[C] carriers in LUAD, PAC and BPH patients (1.02% - somatic, 0.65% and 0.6% - both germline, respectively) from southern Brazil, as well as the absence of this variant (somatic analyses) in a small cohort of ULM-affected women from the same population. The low prevalence of rs78378222[C] carriers observed in each of the cohorts, as well as in the overall sample of the current study (8/947, 0.84%), is similar to the carrier frequency of about 1.2% (14/1,171) recently reported in a Brazilian repository of whole-genome sequencing data from unrelated and healthy elderly individuals from general population of São Paulo, Brazil's largest city located in southeastern Brazil (ABraOM, SABE-WGS-1171 dataset) (Naslavsky et al., 2017; Naslavsky et al., 2020) and with our previous findings in population controls (1%) (Macedo et al., 2016).

When comparing our data with the only previous study to evaluate rs78378222[C] in lung cancer cases (not specified histological classification), there is a two-fold increase in carrier frequency (21/1013, 2,12%) among non-Hispanic caucasians from the USA population diagnosed with this tumor type (Guan et al., 2013). However, in the same case-control study

rs78378222 was not associated with risk of lung cancer and, unlike our study, it had been genotyped in the germline. A high germline prevalence of carriers (~2%) has also been previously reported in a robust meta-analysis of two GWAS involving ULM-affected women from Iceland and UK (n = 16,595 cases) but this study found a significant association between the variant and ULM in these populations (OR = 1.74, 95% CI = 1.6 to 1.89) (Rafnar et al., 2018). Moreover, germline frequency of rs78378222[A/C] heterozygotes in our cohort of PAC patients (0.65%) was much smaller than that obtained in the study conducted by Stacey and colleagues (2011) in European and USA populations (reaching up to 2.6%), which also revealed an association of this variant with prostate cancer (OR = 1.44, 95% CI = 1.24 to 1.68) (Stacey et al., 2011). In this context, a limited number of studies have explored the somatic occurrence of this variant in different tumor types (Li et al., 2013; Wang et al., 2016; Voropaeva et al., 2020; Zhang et al., 2021). Importantly, our study described, for the first time, the low somatic prevalence of minor C-allele in LUAD cases. Together, these data suggest that the rs78378222 variant does not play a determining role in the occurrence of tumors investigated here (LUAD, PAC and ULM) in the population of southern Brazil. Although we were unable to perform refined ancestry analysis of the patients included in the study, we speculate that the lower prevalence found might be explained by two main reasons: (1) rs78378222[C] is probably an allele of European origin, which is evidenced by its higher frequency in European ancestry populations; and (2) the population of southern Brazil and other regions of the country have one of the most heterogeneous genetic constitutions in the world with a predominant tri-hybrid composition (European, African and Native American) and an extensive admixture (Marrero et al., 2005; Souza et al., 2019), which may have triggered a decrease in the overall frequency of the “putative European variant” rs78378222 in these specific populations.

Other interesting findings from the present study can be highlighted. First, we explored the presence of other somatic *TP53* functional/pathogenic variants in lung cancer specimens from rs78378222[C] carriers by NGS analyses of the *TP53* coding (exons 2–11) and flanking intronic regions, which allowed us to identify that all four variant-positive tumors with sample availability had additional pathogenic or likely pathogenic variants in the *TP53* coding regions. Most of the LUAD tumors (3/4, 75%) had the same pathogenic/likely pathogenic sequence variant, namely *TP53* c.751A>C (p.Ile251Leu), located in the p53 DBD and reported to cause loss of transactivation capacity (Kato et al., 2003), and previously detected in one LFS family (Wu et al., 2011) and in a neoplasm of ovary (ClinVar database, 2021). In contrast with our

findings in LUAD tumors, recent studies have identified that, regardless of tumor type, rs78378222[C] is more frequent in tumors with no somatic-coding pathogenic *TP53* variants, i.e. WT *TP53* tumors (Voropaeva et al., 2020; Zhang et al., 2021). Second, in our linkage disequilibrium analyses, we identified that the *TP53* 3'UTR variant studied here and rs35850753 (*TP53* 5'UTR) are preferentially coinherited in certain European populations. Estimated r^2 correlation value of 1 was observed in British/UK population according to the data from the 1000 Genomes Phase 3, indicating that both loci are in complete linkage disequilibrium in this population. Interestingly, these two noncoding variants have been robustly associated with risk of neuroblastoma in African and European ancestry cohorts (Diskin et al., 2014). Furthermore, rs35850753 is a rare germline variant mapped to the 5'UTR of the $\Delta 133$ isoform of *TP53*, an oncogenic short isoform lacking the N-terminus shown to have a dominant negative effect whereby it inhibits the tumor suppressive functions of full-length *TP53* (Fujita et al., 2009; Slatter et al., 2011).

The results of the current study must be interpreted in the context of the following limitations: (1) although our overall sample size is almost 1000 individuals and a recent study in the Russian population described a very high somatic frequency of rs78378222[C] carriers analyzing only 136 cases of a lymphoma subtype (11/136, 8.1%) (Voropaeva et al., 2020), our cancer cohorts actually have a relatively small number of patients for analysis of a rare variant, especially PAC ($n = 153$) and ULM ($n = 41$) groups; (2) LUAD tumor samples were obtained from a retrospective study and de-identified for use in the current study, hindering the complete clinical characterization of this case series regarding the ethnic ancestry, cancer family history, and histological subtype; and (3) due to the inability to re-contact patients (or their relatives) and limited availability of samples, the confirmation of all rs78378222[C]-positive results detected by TaqMan[®] assays through Sanger sequencing have not been carried out.

In conclusion, when compared to previous studies from different populations, the prevalence of *TP53* rs78378222[C] carriers in our case series from Southern Brazil (0.84%, overall sample), although similar to that observed in the admixed-general population of the country (~1%) was lower than that reported in controls and cancer-affected individuals with European ancestry (2-2.6%). It was also much lower than that observed previously by our group in Brazilian patients with a phenotype suggestive of LFS but without identifiable *TP53* germline pathogenic variants (2.7%). These comparisons suggest that frequency variations may be influenced by ethnic ancestry and cancer family history in the selected sample. Despite the

lower frequencies found in our BPH and cancer cohorts, this is the largest study to date evaluating this germline-noncoding *TP53* functional variant in Brazilians, and it represents the first report of the minor C-allele frequency in a non-tumoral condition (BPH). Additionally, our study examined, for the first time, the somatic frequency of this *TP53* 3'UTR variant in lung cancer specimens with known histological classification (LUAD). Remarkably, we also provided a comprehensive and integrative overview of all functional implications of this hypomorphic allele described so far. Further studies genotyping rs78378222 in larger series of patients diagnosed with different types of sporadic tumors and/or unselected for cancer family history from distinct populations should be undertaken in order to confirm our findings and determine if screening for this alteration is justified in Brazilian population.

4. Materials and Methods

4.1. Study subjects, sample types and ethical aspects

Patients diagnosed with tumor types of interest or with a noncancerous condition of prostate (benign prostatic hyperplasia, BPH) were recruited from different tertiary care public or private hospitals and clinics located in the three states of the southern region of Brazil (Rio Grande do Sul, Santa Catarina, and Paraná), predominantly from the southernmost state of the country (Rio Grande do Sul). Patients were not selected on previous cancer diagnosis or cancer family history. No subjects under 18 years were recruited. Two main groups of cancer-affected patients were included in this study: lung adenocarcinoma (LUAD, n= 586), and prostatic adenocarcinoma (PAC, n= 153). Pathologic analyses confirmed typical adenocarcinoma histology in all lung and prostate cancer cases.

LUAD specimens (tumor tissue) were obtained from a case series originally reported in a previous retrospective study from our group, who underwent somatic molecular testing in *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* genes (Andreis et al., 2019). This somatic mutation testing was conducted in a central laboratory, a precision medicine program established in the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, Rio Grande do Sul). Specific regions evaluated in each gene and technical procedures employed were detailed in our previous study (Andreis et al., 2019). The same LUAD sampling used here (n= 586) was included in a recent work of our group analyzing the prevalence of a *TP53* founder variant (Vieira et al., 2021). For the cohort

of PAC-affected men, peripheral blood samples (germline analyses) were collected from a prospective study involving patients enrolled at the Urology Service of the HCPA with inclusion criteria and ethnicity data detailed elsewhere (Silva Neto et al., 2008; Zambra et al., 2013).

Additional groups of analysis consisted of benign prostatic hyperplasia (BPH)-affected men (n= 167) and uterine leiomyoma (ULM)-affected women (n= 41). Both groups were derived from two prospective cohort studies: (1) peripheral blood samples (germline analyses) were collected from BPH patients recruited at the Urology Service of the HCPA, and (2) tumor and tumor-adjacent normal tissue samples (somatic analyses) were obtained from ULM cases diagnosed at the Gynecology and Obstetrics Service of the HCPA. Inclusion criteria and ethnic origin for the BPH cohort were described elsewhere (Biolchi et al., 2012). PAC, BPH and ULM cohorts included predominantly Caucasians/Euro-descendant individuals, while ethnic ancestry data were not available for the LUAD cohort due to the retrospective design for recruitment.

All methods were carried out in accordance with relevant guidelines and regulations. Informed consent was obtained from all subjects of PAC, BPH and ULM groups. Before the beginning of the LUAD retrospective study (Andreis et al., 2019), age at LUAD diagnosis, *EGFR/KRAS/BRAF/NRAS* status, and histological subtype (when available) were annotated and samples were further de-identified. A consent waiver was approved by the Research Ethics Committee (REC) specifically for the rs78378222 genotyping in LUAD tumors, given that patient identification using only clinical and molecular features previously mentioned would not allow patient re-identification. All genetic analyses were previously approved by the REC of HCPA, Brazil (No. 2018-0099 for LUAD cohort, No. 2019-0170 for PAC and BPH cohorts, and No. 2018-0517 for ULM cohort) and registered under the Certificate of Presentation for Ethical Appreciation (CAAE No. 83557418.5.0000.5327 for LUAD, No. 9346919900005327 for PAC and BPH, and No. 93970518.0.0000.5327 for ULM).

4.2. Molecular analyses

DNA from the formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) LUAD tumor specimens, previously selected containing a high percentage of tumor cells, was extracted using the ReliaPrep FFPE gDNA Miniprep System (Promega, Madison, WI) according to the manufacturer's instructions. Genomic DNA extraction from peripheral blood leukocytes

obtained from PAC and BPH patients was conducted through a salting out procedure described elsewhere with minor modifications (Miller et al., 1988). For the frozen tumor (uterine fibroids) and tumor-adjacent normal tissue (myometrium) samples from ULM-affected women, DNA extraction and purification were carried out using GenElute™ Mammalian Genomic DNA Miniprep Kit (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO) according to the manufacturer's recommendations.

TP53 rs7837822 genotyping was performed in duplicate by real-time PCR using fluorescent allele-specific TaqMan® probes (reference and catalog numbers C_102214636_10 and 4351379, respectively), according to the Applied Biosystems® standard protocols (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). Detection of additional somatic *TP53* sequence variants in rs78378222[C]-positive LUAD tumors was performed by next generation sequencing (NGS) analyses of the *TP53* entire coding region (exons 2–11) and 70 bp exon-intron junctions (not including the position of the studied variant at 3'UTR) using a custom panel (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA; reference number TP53.20140108.designed) on the Ion Torrent PGM platform (Thermo Fisher Scientific). Amplicon library was prepared using the Ion AmpliSeq™ Library Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) and then the PCR products were sequenced on the Ion GeneStudio S5 system (Ion Torrent Systems Inc., Gilford, NH). Data were analyzed on the bioinformatics platform Ion Reporter version 5.0 with a minimum coverage of 100X by amplicon. Sequence NM_000546.5 was used as a wild-type (WT) *TP53* reference. These NGS analyses were performed using research-use-only reagents with internal validation.

4.3. Query in population databases, search strategy for previous studies and linkage disequilibrium analyses

The frequency of the rs78378222[C] variant allele was investigated in the following population databases: gnomAD v2.1.1 data set (GRCh37/hg19) (Karczewski et al., 2020), 1000 Genomes Project (Genomes Project et al., 2015), Exome Aggregation Consortium (ExAC) Browser (Karczewski et al., 2017), Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) (Taliun et al., 2021), Fabulous Ladies Over Seventy (FLOSSIES) (Walsh et al., 2010), and Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM, SABE-WGS-1171 dataset) (Naslavsky et al., 2017; Naslavsky et al., 2020). The literature search addressing the studied variant was based on a simplified strategy using PubMed and the search terms "TP53 AND rs78378222" and "rs78378222 AND

cancer", excluding from further analysis only review articles without original data. When performing a detailed reading of the manuscripts obtained from the search results, we also seek to include articles cited in their reference section that could present original data about the variant. Pairwise linkage disequilibrium of the rs78378222 variant with other selected *TP53* variants was accessed in the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/index.html>), evaluating data from the 1000 Genomes project (Phase 3) for all the available populations.

4.4. Statistical analyses

Genotype and allele frequencies were estimated by simple counting. Clinical and molecular features of patients were assessed using descriptive statistics. Considering the low number of individuals harboring the variant allele found in our study and limitations in clinical data availability, it was not possible to perform any meaningful statistical test in our comparisons between groups of carriers and non-carriers (see more in Results section). SPSS® version 18 (SPSS® Inc., Chicago, IL, USA) was used for data handling and for all descriptive analyses.

Competing interests

The authors have no conflicts of interest to declare.

Funding

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, grant number #478430/2012-4 to Patricia Ashton-Prolla), and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA, grant numbers #18-0099 to Gabriel S. Macedo and #19-0170 to Ilma Simoni Brum). Patricia Ashton-Prolla receives a researcher grant from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Acknowledgments

We would like to thank Fernanda de Paris, Bárbara Alemar, Marina Siebert, Vinícius Lorandi and Kendi Nishino Miyamoto for their valuable contributions and technical support.

References

- Achatz, M. I., & Zambetti, G. P. (2016). The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 6(12). doi:10.1101/cshperspect.a026195
- Andreis, T. F., Correa, B. S., Vianna, F. S., De-Paris, F., Siebert, M., Leistner-Segal, S., Macedo, G. S. (2019). Analysis of Predictive Biomarkers in Patients With Lung Adenocarcinoma From Southern Brazil Reveals a Distinct Profile From Other Regions of the Country. *J Glob Oncol*, 5, 1-9. doi:10.1200/JGO.19.00174
- Bieging, K. T., Mello, S. S., & Attardi, L. D. (2014). Unravelling mechanisms of p53-mediated tumour suppression. *Nat Rev Cancer*, 14(5), 359-370. doi:10.1038/nrc3711
- Biolchi, V., Silva Neto, B., Koff, W., & Brum, I. S. (2012). Androgen receptor CAG polymorphism and the risk of benign prostatic hyperplasia in a Brazilian population. *Int Braz J Urol*, 38(3), 373-379. doi:10.1590/s1677-55382012000300010
- Bodmer, W., & Tomlinson, I. (2010). Rare genetic variants and the risk of cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 20(3), 262-267. doi:10.1016/j.gde.2010.04.016
- Bomba, L., Walter, K., & Soranzo, N. (2017). The impact of rare and low-frequency genetic variants in common disease. *Genome Biol*, 18(1), 77. doi:10.1186/s13059-017-1212-4
- Bouaoun, L., Sonkin, D., Ardin, M., Hollstein, M., Byrnes, G., Zavadil, J., & Olivier, M. (2016). TP53 Variations in Human Cancers: New Lessons from the IARC TP53 Database and Genomics Data. *Hum Mutat*, 37(9), 865-876. doi:10.1002/humu.23035
- ClinVar database (2021). <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. Accessed June 12, 2021.
- Custodio, G., Parise, G. A., Kiesel Filho, N., Komechen, H., Sabbaga, C. C., Rosati, R., . . . Figueiredo, B. C. (2013). Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol*, 31(20), 2619-2626. doi:10.1200/JCO.2012.46.3711
- Deng, Q., Hu, H., Yu, X., Liu, S., Wang, L., Chen, W., Li, Y. (2019). Tissue-specific microRNA expression alters cancer susceptibility conferred by a TP53 noncoding variant. *Nat Commun*, 10(1), 5061. doi:10.1038/s41467-019-13002-x

- Di Giovannantonio, M., Harris, B. H., Zhang, P., Kitchen-Smith, I., Xiong, L., Sahgal, N., Bond, G. L. (2021). Heritable genetic variants in key cancer genes link cancer risk with anthropometric traits. *J Med Genet*, 58(6), 392-399. doi:10.1136/jmedgenet-2019-106799
- Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J. C., Frose, K., Heitmann, J., Hoppe, C., Wullenkord, R. (2016). The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol Med*, 8(5), 442-457. doi:10.15252/emmm.201506055
- Diskin, S. J., Capasso, M., Diamond, M., Oldridge, D. A., Conkrite, K., Bosse, K. R., Maris, J. M. (2014). Rare variants in TP53 and susceptibility to neuroblastoma. *J Natl Cancer Inst*, 106(4), dju047. doi:10.1093/jnci/dju047
- Egan, K. M., Nabors, L. B., Olson, J. J., Monteiro, A. N., Browning, J. E., Madden, M. H., Thompson, R. C. (2012). Rare TP53 genetic variant associated with glioma risk and outcome. *J Med Genet*, 49(7), 420-421. doi: 10.1136/jmedgenet-2012-100941
- Enciso-Mora, V., Hosking, F. J., Di Stefano, A. L., Zelenika, D., Shete, S., Broderick, P., . . . Houlston, R. S. (2013). Low penetrance susceptibility to glioma is caused by the TP53 variant rs78378222. *Br J Cancer*, 108(10), 2178-2185. doi:10.1038/bjc.2013.155
- Erson-Bensan, A. E. (2020). RNA-biology ruling cancer progression? Focus on 3'UTRs and splicing. *Cancer Metastasis Rev*, 39(3), 887-901. doi:10.1007/s10555-020-09884-9
- Fujita, K., Mondal, A. M., Horikawa, I., Nguyen, G. H., Kumamoto, K., Sohn, J. J., Harris, C. C. (2009). p53 isoforms Delta133p53 and p53beta are endogenous regulators of replicative cellular senescence. *Nat Cell Biol*, 11(9), 1135-1142. doi:10.1038/ncb1928
- Genomes Project, C., Auton, A., Brooks, L. D., Durbin, R. M., Garrison, E. P., Kang, H. M., Abecasis, G. R. (2015). A global reference for human genetic variation. *Nature*, 526(7571), 68-74. doi:10.1038/nature15393
- Gorlov, I. P., Gorlova, O. Y., Frazier, M. L., Spitz, M. R., & Amos, C. I. (2011). Evolutionary evidence of the effect of rare variants on disease etiology. *Clin Genet*, 79(3), 199-206. doi:10.1111/j.1399-0004.2010.01535.x
- Guan, X., Wang, L. E., Liu, Z., Sturgis, E. M., & Wei, Q. (2013). Association between a rare novel TP53 variant (rs78378222) and melanoma, squamous cell carcinoma of head and neck and lung cancer susceptibility in non-Hispanic Whites. *J Cell Mol Med*, 17(7), 873-878. doi:10.1111/jcmm.12076
- Hainaut, P., & Hollstein, M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res*, 77, 81-137. doi:10.1016/s0065-230x(08)60785-x
- Jardin, F., & Coiffier, B. (2013). TP53 and outcome in DLBCL: not only the coding region. *Blood*, 121(22), 4433-4434. doi:10.1182/blood-2013-04-493486

- Karczewski, K. J., Weisburd, B., Thomas, B., Solomonson, M., Ruderfer, D. M., Kavanagh, D., MacArthur, D. G. (2017). The ExAC browser: displaying reference data information from over 60 000 exomes. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D840-D845. doi:10.1093/nar/gkw971
- Karczewski, K. J., Francioli, L. C., Tiao, G., Cummings, B. B., Alföldi, J., Wang, Q., Collins, R. L., Laricchia, K. M., Ganna, A., Birnbaum, D. P., Gauthier, L. D., Brand, H., et al (2020). The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature*, 581(7809), 434-443. doi: 10.1038/s41586-020-2308-7.
- Kato, S., Han, S. Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., & Ishioka, C. (2003). Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(14), 8424-8429. doi:10.1073/pnas.1431692100
- Levine, A. J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell*, 88(3), 323-331. doi:10.1016/s0092-8674(00)81871-1
- Li, F. P., Fraumeni, J. F., Jr., Mulvihill, J. J., Blattner, W. A., Dreyfus, M. G., Tucker, M. A., & Miller, R. W. (1988). A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*, 48(18), 5358-5362
- Li, Y., Gordon, M. W., Xu-Monette, Z. Y., Visco, C., Tzankov, A., Zou, D., Young, K. H. (2013). Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. *Blood*, 121(22), 4529-4540. doi:10.1182/blood-2012-12-471722
- Macedo, G. S., Araujo Vieira, I., Brandalize, A. P., Giacomazzi, J., Inez Palmero, E., Volc, S., . . . Ashton-Prolla, P. (2016). Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3' UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet*, 209(3), 97-106. doi:10.1016/j.cancergen.2015.12.012
- Malkin, D., Li, F. P., Strong, L. C., Fraumeni, J. F., Jr., Nelson, C. E., Kim, D. H., et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250(4985), 1233-1238. doi:10.1126/science.1978757
- Marrero, A. R., Das Neves Leite, F. P., De Almeida Carvalho, B., Peres, L. M., Kommers, T. C., Da Cruz, I. M., . . . Bortolini, M. C. (2005). Heterogeneity of the genome ancestry of individuals classified as White in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. *Am J Hum Biol*, 17(4), 496-506. doi:10.1002/ajhb.20404
- Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., & Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol*, 9(5), 563-576. doi:10.4161/rna.20231
- Melin, B. S., Barnholtz-Sloan, J. S., Wrensch, M. R., Johansen, C., Il'yasova, D., Kinnersley, B., . . . Bondy, M. L. (2017). Genome-wide association study of glioma subtypes identifies

- specific differences in genetic susceptibility to glioblastoma and non-glioblastoma tumors. *Nat Genet*, 49(5), 789-794. doi:10.1038/ng.3823
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res*, 16(3), 1215. doi:10.1093/nar/16.3.1215
- Moura, R. R., Coelho, A. V., Balbino Vde, Q., Crovella, S., & Brandao, L. A. (2015). Meta-analysis of Brazilian genetic admixture and comparison with other Latin America countries. *Am J Hum Biol*, 27(5), 674-680. doi:10.1002/ajhb.22714
- Naslavsky, M. S., Yamamoto, G. L., de Almeida, T. F., Ezquina, S. A. M., Sunaga, D. Y., Pho, N., . . . Zatz, M. (2017). Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat*, 38(7), 751-763. doi:10.1002/humu.23220
- Naslavsky, M. S., Scliar, M. O., Yamamoto, G. L., Wang, J. Y. T., Zverinova, S., Karp, T., Nunes, K., Ceroni, J. R. M., Carvalho, D. L., Simões, C. E. S., Bozoklian, D., Nonaka, R., et al. (2020). Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). bioRxiv 2020.09.15.298026; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.15.298026>
- Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*, 28(6), 622-629. doi:10.1002/humu.20495
- Pinto, E. M., Billerbeck, A. E., Villares, M. C., Domenice, S., Mendonca, B. B., & Latronico, A. C. (2004). Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 48(5), 647-650. doi:10.1590/s0004-27302004000500009
- Rafnar, T., Gunnarsson, B., Stefansson, O. A., Sulem, P., Ingason, A., Frigge, M. L., Stefansson, K. (2018). Variants associating with uterine leiomyoma highlight genetic background shared by various cancers and hormone-related traits. *Nat Commun*, 9(1), 3636. doi:10.1038/s41467-018-05428-6
- Rice, T., Lachance, D. H., Molinaro, A. M., Eckel-Passow, J. E., Walsh, K. M., Barnholtz-Sloan, J., Wrensch, M. R. (2016). Understanding inherited genetic risk of adult glioma - a review. *Neurooncol Pract*, 3(1), 10-16. doi:10.1093/nop/npv026
- Silva Neto, B., Koff, W. J., Biolchi, V., Brenner, C., Biolo, K. D., Spritzer, P. M., & Brum, I. S. (2008). Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. *Cancer Invest*, 26(1), 74-80. doi:10.1080/07357900701638251

- Slatter, T. L., Hung, N., Campbell, H., Rubio, C., Mehta, R., Renshaw, P., Braithwaite, A. W. (2011). Hyperproliferation, cancer, and inflammation in mice expressing a Delta133p53-like isoform. *Blood*, *117*(19), 5166-5177. doi:10.1182/blood-2010-11-321851
- Soussi, T., & Beroud, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer*, *1*(3), 233-240. doi:10.1038/35106009
- Souza, A. M., Resende, S. S., Sousa, T. N., & Brito, C. F. A. (2019). A systematic scoping review of the genetic ancestry of the Brazilian population. *Genet Mol Biol*, *42*(3), 495-508. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2018-0076
- Stacey, S. N., Sulem, P., Jonasdottir, A., Masson, G., Gudmundsson, J., Gudbjartsson, D. F., . . . Stefansson, K. (2011). A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat Genet*, *43*(11), 1098-1103. doi:10.1038/ng.926
- Taliun, D., Harris, D. N., Kessler, M. D., Carlson, J., Szpiech, Z. A., Torres, R., Abecasis, G. R. (2021). Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed Program. *Nature*, *590*(7845), 290-299. doi:10.1038/s41586-021-03205-y
- Vieira, I. A., Andreis, T. F., Fernandes, B. V., Achatz, M. I., Macedo, G. S., Schramek, D., & Ashton-Prolla, P. (2021). Prevalence of the Brazilian TP53 Founder c.1010G>A (p.Arg337His) in Lung Adenocarcinoma: Is Genotyping Warranted in All Brazilian Patients? *Front Genet*, *12*, 606537. doi:10.3389/fgene.2021.606537
- Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature*, *408*(6810), 307-310. doi:10.1038/35042675
- Voropaeva, E. N., Orlov, Y. L., Pospelova, T. I., Gurageva, A. A., Voevoda, M. I., Maksimov, V. N., Churkina, M. I. (2020). The rs78378222 prevalence and the copy loss of the protective allele A in the tumor tissue of diffuse large B-cell lymphoma. *PeerJ*, *8*, e10335. doi:10.7717/peerj.10335
- Walsh, T., Lee, M. K., Casadei, S., Thornton, A. M., Stray, S. M., Pennil, C., King, M. C. (2010). Detection of inherited mutations for breast and ovarian cancer using genomic capture and massively parallel sequencing. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(28), 12629-12633. doi:10.1073/pnas.1007983107
- Wang, Z., Rajaraman, P., Melin, B. S., Chung, C. C., Zhang, W., McKean-Cowdin, R., Michaud, D., Yeager, M., Ahlbom, A., Albanes, D., Andersson, U., Freeman, L. E., Buring, J. E. (2015). Further Confirmation of Germline Glioma Risk Variant rs78378222 in TP53 and Its Implication in Tumor Tissues via Integrative Analysis of TCGA Data. *Hum Mutat*, *36*(7), 684-688. doi: 10.1002/humu.22799
- Wang, Y., Wu, X. S., He, J., Ma, T., Lei, W., & Shen, Z. Y. (2016). A novel TP53 variant (rs78378222 A > C) in the polyadenylation signal is associated with increased cancer susceptibility: evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, *7*(22), 32854-32865. doi:10.18632/oncotarget.9056

- Wu, C. C., Krahe, R., Lozano, G., Zhang, B., Wilson, C. D., Jo, E. J., .Strong, L. C. (2011). Joint effects of germ-line TP53 mutation, MDM2 SNP309, and gender on cancer risk in family studies of Li-Fraumeni syndrome. *Hum Genet*, 129(6), 663-673. doi:10.1007/s00439-011-0957-1
- Zambra, F. M., Biolchi, V., Brum, I. S., & Chies, J. A. (2013). CCR2 and CCR5 genes polymorphisms in benign prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Hum Immunol*, 74(8), 1003-1008. doi:10.1016/j.humimm.2013.04.031
- Zhang, P., Kitchen-Smith, I., Xiong, L., Stracquadanio, G., Brown, K., Richter, P. H., Bond, G. L. (2021). Germline and Somatic Genetic Variants in the p53 Pathway Interact to Affect Cancer Risk, Progression, and Drug Response. *Cancer Res*, 81(7), 1667-1680. doi:10.1158/0008-5472.CAN-20-0177
- Zhao, Y., Li, X., & Zhu, S. (2016). rs78378222 polymorphism in the 3'-untranslated region of TP53 contributes to development of age-associated cataracts by modifying microRNA-125b-induced apoptosis of lens epithelial cells. *Mol Med Rep*, 14(3), 2305-2310. doi:10.3892/mmr.2016.5465
- Zhou, L., Yuan, Q., & Yang, M. (2012). A functional germline variant in the P53 polyadenylation signal and risk of esophageal squamous cell carcinoma. *Gene*, 506(2), 295-297. doi:10.1016/j.gene.2012.07.007

Table 1. General clinical features from patients included in this study according to the tumor type (or noncancerous condition, BPH).

Clinical features	Main groups		Additional groups	
	Lung adenocarcinoma, LUAD (n=586)	Prostatic adenocarcinoma, PAC (n=153)	Benign prostatic hyperplasia, BPH (n=167)	Uterine leiomyoma, ULM (n=41)
<u>Gender, N (%)</u>				
Male	271 (46.2)	153 (100)	167 (100)	NAP
Female	315 (53.8)	NAP	NAP	41 (100)
<u>Self-identified ethnicity, N (%)^a</u>				
White	NAV	82 (83.7)	104 (97.2)	24 (70.6)
Black	NAV	16 (16.3)	3 (2.8)	10 (29.4)
<u>Age at diagnosis</u>				
Mean, years (\pm SD)	66.1 (11.9)	64.3 (7.1)	66.8 (8.2)	43.7 (5)
Median, years (IR)	67 (16)	65 (9.2)	67 (9.5)	44 (6.5)

SD, standard deviation; IR, interquartile range; NAP, not applicable; NAV, not available due to the retrospective study design for recruitment of LUAD specimens, hindering the inquiry about ethnic ancestry.

^a The percentage was calculated over the total number of genotyped samples for each study group, and over the number of cases for which the specified clinical data was available.

Table 2. *TP53* rs78378222 (A>C) genotyping results.

Genotype	Main groups		Additional groups	
	LUAD ^a	PAC ^b	BPH ^b	ULM ^c
	N (%)	N (%)	N (%)	N (%)
	n=586	n=153	n=167	n=41
AA	580 (100)	152 (99.3)	166 (99.4)	41 (100)
AC	6 (1.02)	1 (0.65)	1 (0.60)	0
CC	0	0	0	0
C allele frequency	0.0051	0.0033	0.0029	0

^a Somatic analyses (tumor tissue samples).

^b Germline DNA (peripheral blood samples).

^c Somatic analyses, matched DNA samples obtained from tumor specimens and tumor-adjacent normal tissue (myometrium).

Table 3. Clinical and molecular findings from LUAD, PAC and BPH-affected patients harboring the functional variant *TP53* rs78378222.

Identifier	Tumor/ condition	Gender	Ethnicity	Age at diagnosis (years)	Cancer FH ^a	Status of somatic variants, LUAD ^c	PSA levels (ng/ml)	Gleason score, PAC
#1	LUAD	Female	NAV	51	NAV	Negative	NAP	NAP
#2	LUAD	Male	NAV	80	NAV	Negative	NAP	NAP
#3	LUAD	Female	NAV	77	NAV	Positive; <i>KRAS</i> p.(Gly12Cys) ^d	NAP	NAP
#4	LUAD	Male	NAV	73	NAV	Positive; <i>KRAS</i> p.(Gly12Cys) ^d	NAP	NAP
#5	LUAD	Female	NAV	71	NAV	Negative	NAP	NAP
#6	LUAD	Female	NAV	44	NAV	Positive; <i>EGFR</i> p.(Met766_Ala767insAlaSerVal) ^e	NAP	NAP
#7	BPH	Male	Caucasian	70	No	NAP	3.58	NAP
#8	PAC	Male	Caucasian	75	Yes ^b	NAP	6	6 (3+3)

NAP, not applicable; NAV, not available due to the retrospective study design for recruitment of LUAD specimens, hindering the inquiry about clinical data, such as ethnic ancestry, cancer family history, and histological subtype.

^a Cancer FH, presence of cancer family history.

^b First-degree relative (father) with prostate cancer diagnosis.

^c LUAD cases were tested for somatic *EGFR*, *KRAS*, *BRAF* and *NRAS* variants. Specific regions evaluated in each gene were detailed in our previous study (PMID: 31532708).

^d Missense pathogenic variant located in the exon 2 of *KRAS* gene; it is an oncogenic (activating), clinically actionable *KRAS* alteration commonly identified in LUAD tumors.

^e Insertion located in the exon 19 of *EGFR* gene, representing a somatic oncogenic driver alteration in LUAD carcinogenesis.

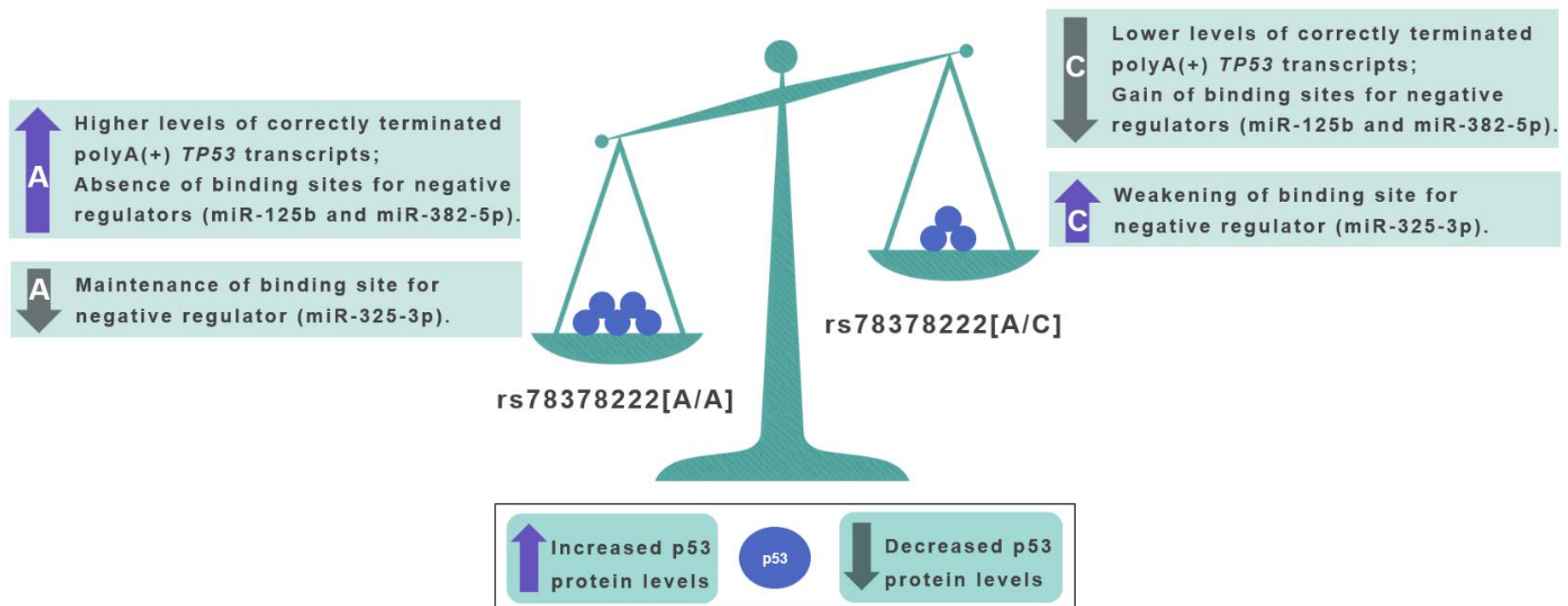


Figure 1. Overview of functional findings regarding the rs78378222[C] variant allele. It has been hypothesized that the different genotypes for this noncoding variant (AA and AC, since homozygotes for the minor allele have rarely been described so far) influence the global balance of *TP53* transcript and p53 protein expression levels. rs78378222[C] disrupts the sole polyadenylation signal sequence of *TP53*, which has been confirmed by detection of correctly terminated polyA(+) mRNAs predominantly derived from the wild-type allele (A), and decreased p53 levels in rs78378222[A/C] heterozygotes. More recent studies demonstrated that presence of the C minor allele also impacts the negative regulation exerted by miRNAs in the *TP53* 3'UTR mRNA, creating binding sites for miR-125b and miR-382-5p, as well as compromising a miR-325-3p site. All functional evidence mentioned here were reported by Stacey et al., 2011; Li et al., 2013; Macedo et al., 2016; Zhao et al., 2016; Deng et al., 2019 and Zhang et al. 2021.

Table S1. Specific clinical features according to the study groups (tumor types and BPH).

Clinical data	Main groups		Additional groups	
	Lung adenocarcinoma, LUAD (n=586)	Prostatic adenocarcinoma, PAC (n=153)	Benign prostatic hyperplasia, BPH (n=167)	Uterine leiomyoma, ULM (n=41)
<u>Histological subtype</u> , N (%)	72 (12.3) ^{a,b}	NA	NA	NA
Acinar	47 (65.3)	NA	NA	NA
Lepidic	25 (34.7)	NA	NA	NA
<u>PSA levels</u> , N (%)		100 (65.3) ^{a,c}	77 (46.1) ^{a,c}	
Mean, ng/ml (\pm SD)	NA	11.3 (14.5)	4.9 (3.9)	NA
Median, ng/ml (IR)	NA	8.1 (7.1)	3.9 (5.33)	NA
<u>Gleason score</u> , N (%)		118 (77.1) ^{a,d}		
6 (3+3)	NA	43 (36.5)	NA	NA
7 (3+4)	NA	51 (43.2)	NA	NA
7 (4+3)	NA	24 (20.3)	NA	NA
<u>Uterine location</u> , N (%)				33 (80.5) ^{a,e}
Intramural	NA	NA	NA	17 (51.5)
Subserosal	NA	NA	NA	1 (3.1)
Intramural/Subserosal	NA	NA	NA	8 (24.2)
Intramural/Subserosal/ Submucosal	NA	NA	NA	7 (21.2)

SD, standard deviation; IR, interquartile range; NA, not applicable; PSA, Prostate-Specific Antigen.

^a The percentage was calculated over the total number of genotyped samples for each study group, and over the number of cases for which the specified clinical data was available.

^b Histological subtype data were available for only a small proportion (72/586) of LUAD patients.

^c PSA level results were available for only 100 and 77 PAC and BPH-affected patients, respectively.

^d Traditional Gleason score was available for the most (118/153) of PAC patients.

^e Uterine location for the ULM's group was available for the most (33/41) affected women.

Table S2. Comparison of clinical and molecular features between LUAD samples of *TP53* rs78378222[C] variant allele carriers and non-carriers.

Features ^a	All samples	Carriers	Non-carriers
	n=586	n=6	n=580
<u>Age at diagnosis, N (%)^b</u>	586 (100) ^b		
Mean, years (\pm SD)	66.1 (11.9)	66 (14.8)	66.1 (11.9)
Median, years (IR)	67 (16)	72 (20)	66 (16)
<u>Patients tested for somatic alterations, N (%)^{b,c}</u>	502 (85.7) ^{b,c}	6 (100)	496 (85.5)
<i>EGFR</i> variant	106 (21.1)	1 (16.7)	105 (21.2)
<i>KRAS</i> variant	148 (29.5)	2 (33.3)	146 (29.4)
<i>BRAF</i> variant	15 (3)	0	15 (3)
None	233 (46.4)	3 (50)	230 (46.4)

SD, standard deviation; IR, interquartile range.

^a Histological subtype data were available for only a small proportion (72/586) of LUAD patients. None of the rs78378222[C] carriers found in this study had available histological data.

^b The percentage was calculated over the total number of genotyped samples (586) and over the number of cases for which the specified clinical or molecular data was available.

^c A total of 502/586 LUAD cases were tested for somatic *EGFR*, *KRAS*, *BRAF*, and *NRAS* variants. Specific regions evaluated in each gene are detailed in our previous study (PMID: 31532708). *NRAS* somatic variants were not found in our case series.

Table S3. Additional *TP53* alterations identified by next generation sequencing analyses of the *TP53* entire coding region and exon-intron junctions (not including 3'UTR) in tumor DNA from four LUAD patients harboring the variant allele rs78378222[C].

Identifier ^a	WT ^b /mutant allele frequency	Coverage	ClinVar classification
#1	c.215C>G (0.56/0.44)	858x	Drug response ^c
	c.672+62A>G (0.002/0.998)	990x	Benign
	c.751A>C (0.96/0.04)	1,512x	Pathogenic/Likely pathogenic^d
#2	c.215C>G (0.47/0.53)	1,043x	Drug response ^c
	c.672+62A>G (0.01/0.99)	1,013x	Benign
	c.751A>C (0.97/0.03)	1,569x	Pathogenic/Likely pathogenic^d
#3	c.215C>G (0.96/0.04)	1,220x	Drug response ^c
	c.524G>T (0.85/0.15)	717x	Pathogenic/Likely pathogenic^e
	c.672+62A>G (0.04/0.96)	947x	Benign
#4	c.215C>G (0.68/0.32)	1,128x	Drug response ^c
	c.536A>T (0.63/0.37)	744x	Uncertain significance^f
	c.672+62A>G (0.001/0.999)	1,049x	Benign
	c.751A>C (0.96/0.04)	2,000x	Pathogenic/Likely pathogenic^d

^a NGS analyses were performed in only 4/6 positive LUAD cases due to limitations in sample availability for the remaining two patients, such as low DNA concentration and/or poor purity of tumor DNA.

^b WT, wild-type allele.

^c The common single nucleotide polymorphism *TP53* c.215C>G (p.Pro72Arg) (rs1042522, MAF=0.6) has been associated with response to antineoplastic agents (efficacy and toxicity) for certain tumor types, such as gastric, ovarian and breast cancers (reference: PMID 26696550).

^d The pathogenic/likely pathogenic variant *TP53* c.751A>C (p.Ile251Leu) was previously identified in one family with Li-Fraumeni syndrome (LFS, reference: PMID 21305319) and in a neoplasm of ovary (somatic origin, ClinVar database). This alteration is located in the DBD of p53 protein and is reported to have loss of transactivation capacity (reference: PMID 12826609).

^e The pathogenic/likely pathogenic variant *TP53* c.524G>T (p.Arg175Leu) has been observed in LFS patients (reference: PMID 16707427, ClinVar database). This alteration is in the DBD of p53 and showed a partial loss of transactivation activity and temperature sensitivity in functional assays (references: PMID 12826609, 14559903, 16861262). Another alteration at this same residue was associated with classic phenotype of LFS (reference: PMID 22233476, 21761402).

^f The variant of uncertain significance *TP53* c.536A>T (p.His179Leu) was previously detected in individuals with different tumor types (somatic origin in all cases; ClinVar database). This alteration has not been reported in the literature in individuals with *TP53*-related disease. It impairs p53 transactivation capacity, reduces apoptosis activity, confers cisplatin-sensitivity and increased cell mobility, and exhibits a dominant-negative effect (references: PMID 12826609, 16861262, 22114072, 23713777). Cells carrying this variant transplanted in mice induce tumor formation more rapidly than WT *TP53* cells (PMID: 9049183).

Table S4. Frequency of the *TP53* rs78378222[C] variant allele reported in previous studies and population databases.

Source/Population database or previous study	<i>TP53</i> rs78378222 (A>C)		
	N ^a	Homoz. ^b	MAF ^c
gnomAD (Overall population)	15,690	4	0.012
gnomAD (Latino population)	424	0	0.0035
gnomAD (European population) ^e	7,707	4	0.017
gnomAD (African population)	4,356	0	0.0024
1000 Genomes	2,504	0	0.0026
ExAC (Overall and specific populations)	NR ^d	NR ^d	NR
Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed)	62,784	NR ^d	0.007
Fabulous Ladies Over Seventy (FLOSSIES)	9,884	0	0.0083
ABraOM (Online Archive of Brazilian Mutations)	1,171	0	0.0059
Cancer-unaffected Brazilian women (Macedo <i>et al.</i> , 2016) ^f	299	0	0.005
Brazilian LFS patients without an identifiable <i>TP53</i> germline pathogenic variant (Macedo <i>et al.</i> , 2016)	129	0	0.027
European and USA prostate cancer cases (Stacey <i>et al.</i> , 2011)	7,790	NR ^g	0.007-0.026
Lung cancer cases in the USA (histological subtype not specified) (Guan <i>et al.</i> , 2013)	1013	0	0.01
European uterine leiomyoma cases (Rafnar <i>et al.</i> , 2018)	16,595	NR ^d	0.018

^a N, sample number evaluated in the specific database and/or study.

^b Homoz., number of variant allele homozygotes.

^c MAF, minor allele frequency (frequency of variant allele); MAF in Brazilian and/or Latino populations is highlighted in bold letters.

^d NR, not reported.

^e Frequency data excluding Finnish population.

^f Control group in our previous study (PMID: 26823150) was composed of cancer-unaffected women from the general population in southern Brazil, presenting no clinical evidence and/or suspicion of breast cancer, and their family histories were not consistent with hereditary cancer syndromes.

^g This study identified rs78378222[CC] homozygotes, but not specified its exact number.

Table S5. Case-control association analyses between *TP53* rs78378222 (A>C) and several tumor types, and previous functional studies.

Reference	Tumor types	Studied population	OR (95% CI)	Functional evidence
Stacey <i>et al.</i> 2011 (PMID: 21946351)	Cutaneous basal cell carcinoma	Iceland, Denmark, Spain, Bulgaria, Hungary, Slovakia and Romania	2.16 (1.83-2.54)	Minor allele (C) impairs proper termination and polyadenylation of the <i>TP53</i> transcript. In normal tissue types (blood and adipose), rs78378222[A/C] heterozygotes expressed somewhat less <i>TP53</i> transcript than WT homozygotes, and it was observed that correctly terminated polyA(+) mRNAs were predominantly derived from the WT allele
	Prostate Cancer ^a	Iceland, Spain, USA, Netherlands, UK and Romania	1.44 (1.24-1.68)	
	Colorectal Adenoma	Iceland	1.39 (1.17-1.65)	
	Glioma	Iceland and USA	2.35 (1.61-3.44)	
Egan <i>et al.</i> 2012 (PMID: 22706378)	Glioma	USA	3.54 (1.87-6.71)	NP
Zhou <i>et al.</i> 2012 (PMID: 22800615)	Esophageal squamous cell carcinoma	China (Han descent)	3.22 (1.71-6.33)	NP
Enciso-Mora <i>et al.</i> 2013 (PMID: 23571737)	Glioma	USA, France, UK and Germany	3.74 (2.89-4.83)	NP
Guan <i>et al.</i> 2013 (PMID: 23742673)	Lung cancer (not specified histological classification) ^a	USA cohorts from non-Hispanic Caucasians	0.84 (0.51-1.37)	NP
	Melanoma		1.14 (0.77-1.71)	
	Squamous cell carcinoma of head and neck		0.44 (0.24-0.80)	
Li <i>et al.</i> 2013 (PMID: 23515929)	Diffuse large B-cell lymphoma ^b	Different populations ^b	NA ^b	p53-null cells transfected with exogenous p53 constructs containing the rare allele (C) exhibited downregulation of both <i>TP53</i> mRNA and p53 protein levels, and reduction of cellular apoptosis under the influence of genotoxic factors
Diskin <i>et al.</i> 2014 (PMID: 24634504)	Neuroblastoma	European, African and Italian ancestry cohorts	2.3 (1.8-2.9)	Preference for the WT allele in properly terminated and polyadenylated <i>TP53</i> transcripts, whereas improperly terminated "run-on" transcripts were detected almost exclusively from the risk allele (C) in two rs78378222[A/C] heterozygotes primary neuroblastomas
Rao <i>et al.</i> 2014 (PMID: 25422255)	Oral, Cervical and Breast Cancers	India	NA ^g	NP
Wang <i>et al.</i> 2015 (PMID: 25907361)	Glioma	USA, China, Australia, Israel and European populations	3.14 (2.23-4.43)	Aberrant transcripts containing the minor allele (C) are on ~3 kb longer than the gene transcripts containing allele A. Copy loss of the WT allele may not be observed in all tumors (loss of heterozygosity); it occurs in the tumor tissue from glioma cases, but not in lung adenocarcinomas
	Glioma (glioblastoma multiforme) and lung adenocarcinoma ^{a,c}	Datasets from The Cancer Genome Atlas (TCGA) ^c	NA ^c	

Macedo <i>et al.</i> 2016 (PMID: 26823150)	Breast cancer and Li-Fraumeni syndrome patients with multiple early-onset cancers ^d	Brazil (southern and southeastern regions)	NP ^d	Lower p53 protein levels in tumor specimens and fibroblasts from carriers of minor allele (C). It could interfere with a putative/predicted target site of miR-545-3p in the <i>TP53</i> 3'UTR
Wang <i>et al.</i> 2016 (PMID: 27147571)	Overall cancer ^e	Different populations ^e	1.51 (1.28-1.77)	NP
Zhao <i>et al.</i> 2016 (PMID: 27431420)	Noncancerous condition (age-associated cataracts) ^f	China	NA ^f	Minor allele (C) creates a novel potential miR-125b binding site in the <i>TP53</i> 3'UTR, affecting p53 expression and inducing apoptosis in cultured lens epithelial cells
Melin <i>et al.</i> 2017 (PMID: 28346443)	Glioma	USA and European populations	2.53 (2.19-2.91)	NP
Rafnar <i>et al.</i> 2018 (PMID: 30194396)	Uterine leiomyoma^a	Iceland and UK	1.74 (1.6-1.89)	NP
Deng <i>et al.</i> 2019 (PMID: 31699989)	Breast cancer	China (Han descent)	0.573 (0.37-0.87)	Mouse line harboring the variant exhibits accelerated glioma development but delayed mammary tumorigenesis. Minor allele (C) creates a miR-382-5p binding site and compromises a miR-325-3p site; their differential expression results in p53 downregulation in the brain, but p53 upregulation in the mammary gland of carriers compared to non-carriers' mice
	Soft-tissue sarcoma		4.55 (2.07-9.99)	
	Osteosarcoma		NA ^g	
Di Giovannantonio <i>et al.</i> 2020 (PMID: 32591342)	Non-melanomatous skin cancer	UK	1.36 (1.31-1.41)	NP
	Brain cancer (predominantly glioma)		3.12 (2.22-4.37)	
Voropaeva <i>et al.</i> 2020 (PMID: 33240649)	Diffuse large B-cell lymphoma ^h	Russia	NP ^h	Copy loss of the protective allele A in the tumor tissue from 5 of 11 rs78378222[A/C] positive-DLBCL cases
Zhang <i>et al.</i> 2021 (PMID: 33558336)	Estrogen receptor positive breast cancer	European populations ⁱ	1.12 (NP) ^j	Minor allele (C) is more frequent in WT <i>TP53</i> tumors. C-allele is associated with lower expression levels of both WT and mutant mRNA <i>TP53</i> in cancer cells and tumors from the TCGA cohort. Significant enrichments of uncleaved <i>TP53</i> mRNA in cells carrying the C-allele. Reduction of WT <i>TP53</i> levels in tumors from patients with the C-allele can lead to worse clinical outcomes and treatment response (radiation response)
	Low-grade serous ovarian cancer		1.59 (NP) ^j	
	Estrogen receptor negative breast cancer		0.8 (NP) ^j	
	High-grade serous ovarian cancer		0.75 (NP) ^j	

OR, odds ratio; CI, confidence interval; WT, wild-type; NA, not applicable; NP, not provided; DLBCL, Diffuse large B-cell lymphoma.

^a Tumor types evaluated in the present study are highlighted in bold letters.

^b International consortium exploring the occurrence of *TP53* 3'UTR sequence alterations in a cohort of tumor specimens from DLBCL patients treated with specific chemotherapy regimens ("CHOP" plus rituximab). Control group was not included.

^c Bioinformatic analyses based on TCGA data (SNP, RNA-seq and Exome sequencing) for glioblastoma multiforme and lung adenocarcinoma.

^d The variant was not identified among the breast cancer patients. High frequency of rs78378222[C] variant allele (0.027) was observed in a cohort from Li-Fraumeni syndrome patients without germline *TP53* pathogenic variants in the coding regions. The variant frequency was significantly different in this group of probands compared to that observed in the control group included in this study ($P = 0.015$), but OR and 95% CI were not calculated.

^e Meta-analysis encompassing results of case-control association studies between rs78378222 and several tumor types in different populations (published until 2014).

- ^f Functional study investigating the effect of rs78378222[C] on the miR-125b-induced apoptosis of lens epithelial cells, which may be a mechanism of age-associated cataract development.
- ^g The risk allele (C) was not found in these case series.
- ^h Although this study has included a cohort of DLBCL patients and comparable in age and sex controls, statistical data of OR and 95% CI were not reported. However, the authors indicated that there were no significant differences in distributions of rs78378222 alleles and genotypes between controls and DLBCL cases.
- ⁱ Genotyping analyses of this study two approaches: (1) genotype imputation based on genotype data from the TCGA clustered tightly with Europeans; and (2) selection of GWAS significant lead SNPs that were identified in European ancestry cohorts.
- ^j 95% CI data along with the OR were not found in this study.

Table S6. Pairwise linkage disequilibrium data by population regarding rs78378222 (focus variant) and other variants of interest in the *TP53* gene.

Description of population ^a	<i>TP53</i> variant ^b	Chromosomal location	Gene region	r ² ^g	D' ^h
Finnish (Finland)	rs1042522 ^c	17:7676154	Exon 4	0.071875	1.00
Finnish (Finland)	rs1642785 ^d	17:7676483	Intron 2	0.065430	1.00
Iberian populations (Spain)				0.158805	1.00
Toscani (Italy)				0.196244	1.00
British (England and Scotland)	rs17884306 ^e	17:7668783	3'UTR	0.217876	1.00
Utah residents (USA) with Northern and Eastern European ancestry				0.106598	1.00
Finnish (Finland)				0.294406	1.00
Iberian populations (Spain)				0.115553	1.00
Toscani (Italy)				0.497652	1.00
British (England and Scotland)	rs35850753 ^f	17:7675353	5'UTR	1.000000	1.00
Utah residents (USA) with Northern and Eastern European ancestry				0.246193	1.00
Finnish (Finland)				0.484375	1.00

^a This table gathers information from the 1000 Genomes Phase 3-based linkage disequilibrium (LD) plots and tables obtained from Ensembl database.

^b For other variants of interest in *TP53* not mentioned above, such as rs121912664 (Brazilian founder pathogenic variant c.1010G>A p.Arg337His, widely referred as R337H) and rs17878362 (16-bp duplication polymorphism in intron 3, or PIN3), there was no pairwise LD data in a given population for the following reasons: minor allele frequency close or equal to 0; they do not have enough genotypes to calculate LD values; and estimated r² values are below 0.05 and have been filtered out.

^c *TP53* c.215C>G (p.Pro72Arg) is a very common functional missense variant (minor allele frequency, MAF=0.6), also known as Pro72Arg.

^d *TP53* c.74+38C>G is a common intronic variant (MAF=0.4), also known as PIN2 polymorphism (intron 2).

^e *TP53* c.*826G>A is a low frequency noncoding variant (MAF=0.06) recently identified in the population of the southeastern region of Brazil (ABraOM database, MAF=0.03).

^f *TP53* c.376-117G>A is a rare noncoding variant (MAF= 0.005) that maps to 5'UTR of the Δ133 isoform of *TP53*. It has been previously reported as a germline variant in linkage disequilibrium with rs78378222, and both variants were robustly associated with risk of neuroblastoma in different populations (Diskin et al., 2014; PMID: 24634504).

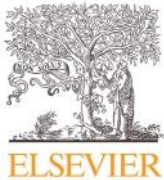
^g The correlation between a pair of loci. It varies from 0 (loci are in complete linkage equilibrium) to 1 (loci are in complete linkage disequilibrium and coinherited).

^h The difference between the observed and the expected frequency of a given haplotype. If two loci are independent (i.e. in linkage equilibrium and therefore not coinherited at all), the D' value will be 0.

Capítulo VI – Artigo 3

***MIR605* rs2043556 is associated with the occurrence of multiple primary tumors in *TP53* p.(Arg337His) mutation carriers**

Manuscrito publicado na revista *Cancer Genetics*. 2020 Jan;240:54-58.



Short Communication

MIR605 rs2043556 is associated with the occurrence of multiple primary tumors in TP53 p.(Arg337His) mutation carriers



Isabel Cristina Bandeira^{a,b,1}, Igor Araujo Vieira^{a,b,1,*}, Tiago Finger Andreis^{a,b}, Larissa Brussa Reis^{a,b}, Gabriel S. Macedo^{b,c}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{a,b}, Patricia Santos-Silva^b, Edenir Inez Palmero^{d,e}, Henrique de Campos Reis Galvão^f, Cintia Regina Niederauer Ramos^d, Karina Miranda Santiago^g, Maria Isabel Achatz^g, Alexandre André Balieiro Anastácio da Costa^g, Patricia Ashton-Prolla^{a,b,h,i}

^aPost-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^bGenomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^cExperimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

^dMolecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^eBarretos School of Health Sciences, Barretos, São Paulo, Brazil

^fOncogenetics Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil

^gOncogenetics Department, International Research Center, AC Camargo Cancer Center, National Institute of Oncogenomics, São Paulo city, São Paulo, Brazil

^hMedical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ⁱDepartment of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 9 August 2019

Revised 13 October 2019

Accepted 18 November 2019

Keywords:

Li-Fraumeni Syndrome

MIR605 gene

rs2043556

Multiple primary tumors

ABSTRACT

Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like (LFS/LFL) Syndrome are cancer predisposition syndromes caused by germline pathogenic variants in *TP53* and are associated with an increased risk of multiple early-onset cancers. In Southern and Southeastern Brazil, a germline founder variant with partial penetrance located in the oligomerization domain of *TP53*, c.1010G>A p.(Arg337His, commonly known as R337H), has been detected in 0.3% of the general population. Recently, the functional *MIR605* variant rs2043556 (A>G) has been identified as a novel LFS phenotype modifier in families with germline *TP53* DNA binding variants. In this study, our goal was to verify *MIR605* rs2043556 allele frequencies and further explore its possible effects on the phenotype of 238 Brazilian individuals carrying *TP53* p.(Arg337His). The *MIR605* rs2043556 G allele was detected in 136 (57.1%) individuals, including 25 homozygotes (10.5%), and although it had been previously associated with an earlier mean age of tumor onset, this effect was not observed in this study ($p = 0.8$). However, in p.(Arg337His) mutation carriers, the GG genotype was significantly associated with the occurrence of multiple primary tumors ($p = 0.005$). We provide further evidence of *MIR605* rs2043556 G allele's effect as a phenotype modulator in carriers of germline *TP53* pathogenic variants.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Li-Fraumeni Syndrome (LFS) (OMIM # 151623) and its variant, Li-Fraumeni-like Syndrome (LFL), are autosomal dominant cancer predisposition syndromes characterized by a high risk for development of multiple tumors at a young age [1,2]. Germline pathogenic variants in the *TP53* gene are identified in approximately 70% and 40% of families that meet clinical criteria for LFS and LFL, re-

spectively [3,4]. The protein product of *TP53*, p53, is a transcription factor whose ability to mediate tumor suppression has been extensively studied. p53 exerts its multiple antiproliferative functions through the transcriptional control of several target genes and through protein-protein interactions [5].

In southern and southeastern Brazil, the *TP53* founder variant c.1010G>A or p.(Arg337His, commonly known as R337H), located in the oligomerization domain (OD) of the gene, is detected in 0.3% of the general population. Although penetrance is reduced in relation to DNA binding domain (DBD) variants, its frequency is higher than what is observed for any other germline variant possibly present in the gene [6]. Currently, c.1010G>A is associated with a broad spectrum of tumors, similar to the one observed in

* Corresponding author.

E-mail address: igvieira@hcpa.edu.br (I.A. Vieira).

¹ Isabel C. Bandeira and Igor A. Vieira have contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

families with LFS/LFL caused by DBD variants [7–9]. Recent studies have prioritized epidemiological aspects of this mutation, while the mechanism of cancer predisposition associated with this founder variant and its penetrance is still not completely understood [8,9]. Despite existing evidence linking the LFS/LFL phenotype with differences in mutant p53 activity in terms of cellular localization and functional effect, these genotype–phenotype correlations do not fully explain the global and intra-familial heterogeneity observed in carriers of this Brazilian founder mutation [10,11].

In this context, several recent studies have explored the role of coexisting or secondary genetic factors that might modify p53 function. Among these are microRNAs (miRNAs), a class of 18- to 25-nucleotide-long single-stranded non-coding RNAs involved in the post-transcriptional regulation of gene expression [12,13]. These small molecules play a role in several biological processes, including cell proliferation, differentiation, apoptosis, and development, acting as oncogenes or tumor suppressors [14–16]. In addition, it has been shown that several miRNAs contribute to a refined p53 expression control by interacting directly with target sites on the 3'UTR of the *TP53* mRNA and, thus, they could be considered clinically relevant oncogenes. A few examples of indirect p53 regulation through a miRNA network have been described, including the effect of miR-605, which directly modulates *MDM2* expression, the main p53 activity negative regulator [17,18]. MiR-605 also appears to be inducible by p53 in response to cell stress mechanisms [19]. Furthermore, the presence of a *MIR605* gene variant, rs2043556 (A>G), has been associated with an increased risk for developing different cancers [16]. More recently, this same single nucleotide polymorphism (SNP) was identified as a functional variant and a novel genetic modifier of the LFS phenotype, specifically associated with an earlier mean age of tumor onset in Canadian families with *TP53* pathogenic DBD variants [20]. Hence, the objective of this study was to determine the allelic and genotypic frequencies as well as the phenotypic effect of *MIR605* SNP rs2043556 (A>G) in Brazilian LFS/LFL individuals carrying the germline founder variant p.(Arg337His).

Materials and methods

Study subjects and ethical aspects

Patients selected for the study were recruited from three tertiary care hospitals in southern and southeastern Brazil. They all fulfilled the Chompret criteria for LFS/LFL and were carriers of a germline *TP53* pathogenic variant, either p.(Arg337His) (main study group) or a DBD variant (comparison group). A total of 238 p.(Arg337His) carriers were recruited, 65 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, in the city of Porto Alegre, southern Brazil), 66 from A.C. Camargo Cancer Center (city of São Paulo, southeastern Brazil), and 107 from Hospital de Câncer de Barretos (city of Barretos, southeastern Brazil). Six LFS patients carrying germline DBD variants from HCPA were recruited and included in a comparison group. Genetic analyses were previously approved by research ethics committees of the involved collaborating centers (registered under the Certificate of Presentation for Ethical Appreciation – CAAE n° 52641616.0.0000.5327).

MIR605 SNP genotyping

TaqMan® allelic discrimination analyses of variant rs2043556 were performed according to Applied Biosystems® standard protocols (Applied Biosystems, Carlsbad, USA), using fluorescent allele-specific probes (reference number C_11737438_10). *TP53* p.(Arg337His) genotyping was performed following previously published protocols using custom TaqMan® assays [21]. Sanger sequencing confirmed all samples with a variant identified by Taq-

Man®. Sequencing of *TP53* exon 10 encompassing p.(Arg337His) was performed according to IARC standard protocols (primer sequences and PCR conditions available at http://p53.iarc.fr/download/tp53_directsequencing_iarc.pdf), while *MIR605* was analyzed according to the primers described by Id Said & Malkin [20].

Statistical analysis

Genotype and allele frequencies were estimated by simple counting. Differences between groups were compared using the Kruskal-Wallis' (median age at tumor onset), Pearson's chi-squared (multiple primary tumors and cancer personal history) or Fisher's exact tests (tumor type). All tests were two-tailed, significance was set at *p* less than 0.05 and statistical analyses were done using SPSS® version 18 (SPSS Inc., Chicago, USA).

Results

Clinical data on LFS/LFL patients included in the main study group are summarized in Supplementary Table 1. Among the 238 p.(Arg337His) carriers, the variant G-allele for *MIR605* rs2043556 was detected in 136 individuals (57.1%), including 25 homozygotes (GG genotype, 10.5%) (Table 1). Moreover, the G-allele had a high frequency in this series (0.34), similar to the frequency observed in population databases, especially those related to Latin cohorts (Supplementary Table 2). Presence of the *MIR605* rs204356 G allele was not associated with age of tumor onset (*p* = 0.8, Fig. 1, Supplementary Table 3) or tumor type (*p* = 0.3) (Table 2) or personal history of cancer (*p* = 0.1, Supplementary Table 4). Genotypic frequency distribution was also not related with the median age of breast and adrenocortical cancers (two common tumor types found in LFS/LFL families, Supplementary Table 5). However, the GG genotype was significantly associated with the occurrence of multiple primary tumors (*p* = 0.005) (Table 2). For instance, among these *TP53* p.(Arg337His) and rs204356[GG]-positive patients with tumor diagnosis in multiple primary sites, one female patient developed very early-onset breast and thyroid cancers (at 23 and 25 years, respectively; data not shown). Of note, 26 of 122 cancer-affected patients (10.3%) developed more than one primary tumor (Table 2). Among these 26 patients, 4 (15.4%) had synchronous tumors; for the remaining metachronous tumors, the average time between diagnoses was approximately 6 years (Supplementary Table 6).

In addition, *MIR605* rs2043556 was genotyped in a small group of LFS patients with DBD mutations (comparison group, *N* = 6). Clinical data from these patients is summarized in Supplementary Table 7. The variant G-allele was detected at a frequency of 0.33, very similar to the one observed in the p.(Arg337His) group. Interestingly, one patient in the comparison group heterozygous for the *TP53* p.(Arg273His) variant (identifier LFS-4) was GG homozygous for the *MIR605* SNP and was diagnosed with multiple tumors

Table 1
Genotypic and allelic frequencies of *MIR605* rs2043556 (A>G) in *TP53* p.(Arg337His) mutation carriers with the LFS/LFL phenotype.

Genotype frequencies	N (%)
	<i>n</i> = 238
AA	102 (42.9%)
AG	111 (46.6%)
GG	25 (10.5%)
AG+GG	136 (57.1%)
Allele frequency	
G*	0.34

* Risk/variant allele.

Genotype SNP rs2043556	Median age in years (IR) ^a	<i>p</i>
AA	35.5 (31.75)	0.808 ^b
AG	31.5 (41.75)	
GG	40 (36)	

^a IR, interquartile range.
^b Kruskal-Wallis test.

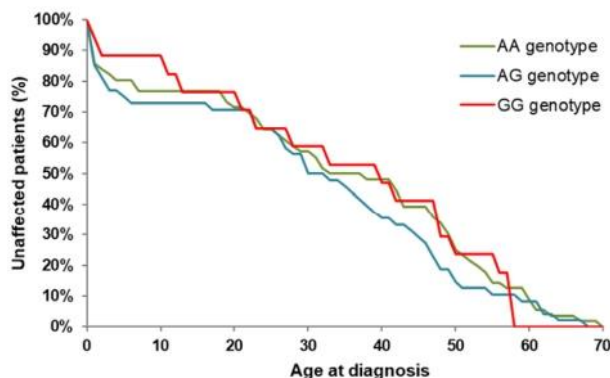


Fig. 1. Distribution of the median age of first cancer diagnosis according to *MIR605* rs2043556 genotype in *TP53* p.Arg337His carriers. The plot on the right shows the percentage of cancer-unaffected individuals harboring the founder variant for each *MIR605* genotype as a function of age of cancer onset.

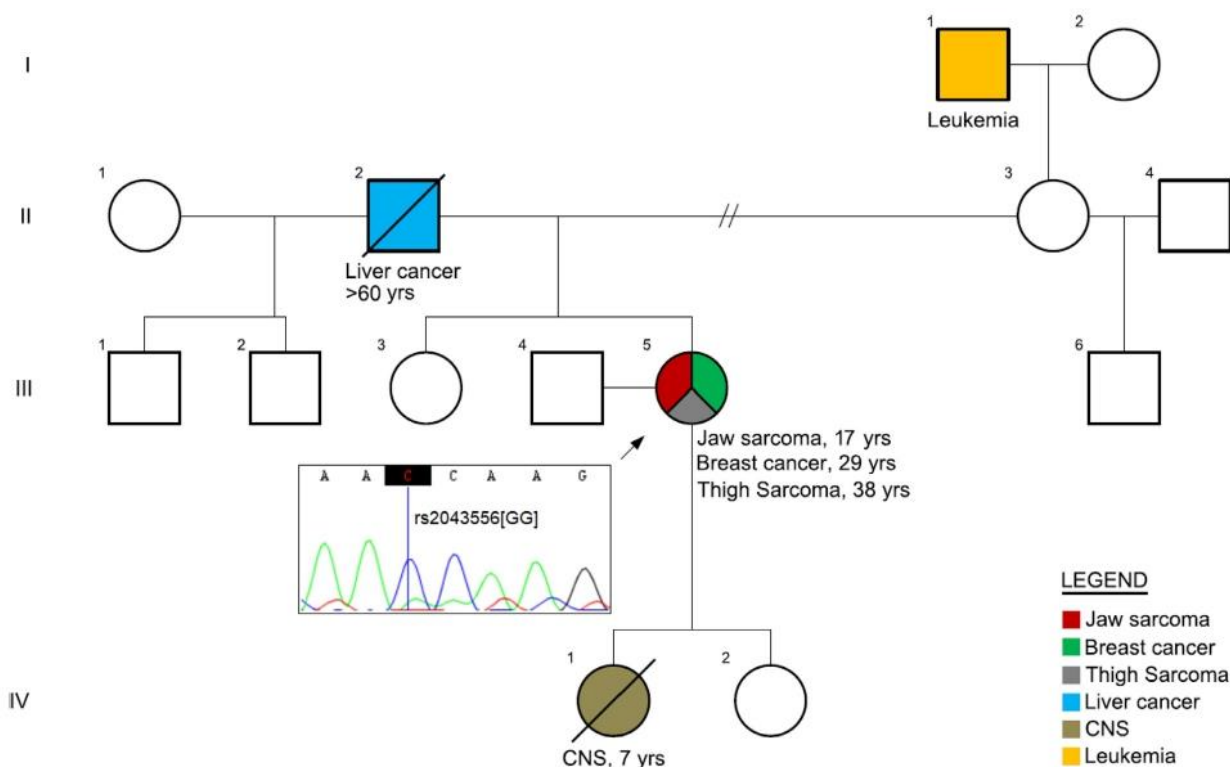


Fig. 2. Pedigree of an LFS proband (indicated by the black arrow; identifier LFS-4 in Supplementary Table 7) fulfilling classical clinical criteria and harboring the *TP53* DNA-binding domain germline variant p.(Arg273His), along with the *MIR605* variant G-allele in homozygosity (confirmed by Sanger sequencing as shown by the lower-left panel). Yrs, years; CNS, central nervous system tumor.

(sarcoma at age 17, breast cancer at age 29 and a new sarcoma at age 38 years). Fig. 2 shows the pedigree of this proband. To our knowledge, this is the first description of a patient with a DBD p53 pathogenic variant carrying the *MIR605* rs2043556 G-allele in homozygosity. Sanger sequencing confirmed the GG genotype in all cases identified by TaqMan® analyses (Supplementary Fig. 1).

Discussion

In a previous report, *MIR605* rs2043556 (A>G) was proposed to be a genetic modifier of the age of cancer onset in a Canadian cohort of LFS patients (classical LFS criteria) composed predominantly of *TP53* DBD mutation carriers [20]. Presence of the G-allele in heterozygosity was associated with a 10-year acceleration in the mean age of tumor onset ($p = 0.04$) in this LFS case series. Importantly,

none of the participants in this previously mentioned study were carriers of the Brazilian founder mutation p.(Arg337His). We did not observe the same effect in our cohort, and although this could be due to the different genetic background between Canadian and Brazilian populations, the most important difference between both studies is the localization of the germline *TP53* mutations of their participants (DBD vs. OD). The modifying effect of *MIR605* rs2043556 G allele in heterozygosity on the age of cancer diagnosis previously observed in carriers of highly penetrant DBD mutations might be insufficient to cause a detectable phenotypic change in carriers of “milder”, less penetrant *TP53* variants such as p.(Arg337His). In addition, it is worth emphasizing that a significant proportion of cancer diagnoses reported in p.(Arg337His) carriers occurs in adults, except for adrenocortical carcinomas and brain tumors, which occur more frequently in pediatric patients.

Table 2
Genotypic frequencies of *MIR605* rs2043556 in *TP53* p.Arg337His carriers according to tumor type and number of cancer diagnoses.

Genotype SNP rs2043556	Breast cancers, N (%)	Adrenocortical carcinomas, N (%)	CNS tumors ^a , N (%)	Sarcomas and osteosarcomas ^b , N (%)	Other tumor types ^c , N (%)	<i>p</i>	Single tumor diagnosis, N (%)	Multiple primary tumors diagnosis, N (%)	<i>p</i>
AA	18 (40)	10 (38.5)	6 (66.7)	5 (33.3)	18 (64.3)		44 (45.8)	12 (46.1)	
AG	19 (42.2)	12 (46.1)	3 (33.3)	9 (60)	7 (25)	0.308 ^d	44 (45.8)	6 (23.1)	
GG	8 (17.8)	4 (15.4)	0 (0)	1 (6.7)	3 (10.7)		8 (8.3)	8 (30.8)	0.005^e

^a CNS, central nervous system.

^b Soft tissue sarcomas and osteosarcomas.

^c Twenty-eight patients developed other tumor types, including prostate, thyroid, lung, kidney, uterine cancers, colorectal, gastric cancers, pheochromocytoma, melanoma, lymphoma, and multiple myeloma.

^d Fisher exact test.

^e Pearson's chi-squared test.

A remarkable finding in the present study is a significant association between the homozygous GG genotype and the development of more than one primary tumor, suggesting that the G-allele might have a dose dependent effect associated with increased cancer predisposition, or might exert an influence on predisposition to a second primary tumor. This association between *MIR605* rs2043556 and multiple cancer diagnoses seems to be limited to *TP53* p.(Arg337His) carriers, since in the previous study ($N = 55$) [20] and in our small cohort ($N = 6$), among LFS patients with *TP53* DBD mutations, the frequency of multiple primary tumors did not differ between individuals harboring the variant G-allele and those with the AA genotype.

Furthermore, Id Said and Malkin (2015) [20] showed in their functional experiments that, in *MIR605* rs2043556 AG heterozygotes, the miR-605 processing efficiency from its precursor to its mature form was compromised, leading to reduced mature miR-605 levels. Therefore, it is reasonable to hypothesize that GG homozygotes could have dramatically impaired miRNA processing, triggering severe deregulation effects on MDM2 and/or p53 function. This effect would be profoundly deleterious in the presence of a germline *TP53* DBD mutation, but less so in the presence of a "milder" *TP53* OD mutation. In addition to MDM2 and p53, other validated individual target regulated by miR-605 includes Sec24D (miRTarBase database, <http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php#mirna>), a cellular trafficking protein lacking a well-established role in carcinogenesis [22], as well as MAPK signaling pathway was shown to be induced by miR-605 overexpression, leading to tumor suppressive effects in *TP53* mutant cell lines according to the preliminary evidence reported by Malkin's group [23]. In agreement with this hypothesis, our study identified, for the first time, a considerable amount of *MIR605* rs2043556[GG] homozygotes meeting LFS/LFL clinical criteria and harboring the *TP53* OD mutation p.(Arg337His), differing from the results of the study by Id Said and Malkin (2015) in which no GG homozygotes were identified [20]. When considering the G allele frequencies described in population databases worldwide, the fact that none of the individuals in the Canadian study had the G-variant allele in homozygosis is striking. This difference in GG genotype frequency (0/55 vs. 25/258) between Canadian and Brazilian LFS/LFL cohorts exhibited a statistically significant difference, reinforcing that these findings are not random events ($P = 0.006$).

In conclusion, our results support previous studies in showing that the *MIR605* rs2043556 G allele is a potential phenotype modifier not only in LFS/LFL patients with DBD mutations but also in those with OD mutations, as demonstrated here in carriers of the exon 10 founder *TP53* variant p.(Arg337His). In these patients, we identified an association between the presence of the *MIR605* rs2043556 GG genotype and occurrence of multiple primary tumors. Larger studies including patients with different *TP53* germline mutations preferentially accompanied by functional analysis of the *MIR605* rs2043556 risk allele are required to confirm this hypothesis. Taken together, these findings emphasize the importance of analyzing miRNA genes that directly or indirectly regulate p53 expression as potential phenotype modifiers and as promising therapeutic targets in LFS/LFL.

Internet resources

IARC *TP53* Database. April 5, 2019. <http://p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf>. miRTarBase Database. September 20, 2019. <<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/php/search.php#mirna>>.

Declaration of Conflict Interest

H. C. R. G. has a disclosure with AstraZeneca Brazil (financial support for lectures) and Hermes Pardini Institute (Consultancy). Other authors do not have any conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We would like to thank Gustavo Stumpf and Kendi Nishino Miyamoto for their valuable contributions and technical support. This study was funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Grant # 478430/2012-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS - Grant # 16/2551-0000486-2), and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA #16-0078) to Patricia Ashton-Prolla. This study was partially supported by FINEP-CT-INFRA (02/2010). EIP receives a National Council of Technological and Scientific Development (CNPq) scholarship.

Supplementary materials

Supplementary material associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.cancergen.2019.11.005.

References

- [1] Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. a familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71:747–52. doi:10.7326/0003-4819-71-4-747.
- [2] 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;250:1233–8. doi:10.1126/science.1978757.
- [3] Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome—a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997;76:1–14. doi:10.1038/bjc.1997.328.
- [4] Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes Cancer* 2011;2:475–84. doi:10.1177/1947601911413466.
- [5] Olivier M, Petitjean A, Marcel V, Pétré A, Mounawar M, Plymoth A, de Fromental CC, Hainaut P. Recent advances in p53 research: an interdisciplinary perspective. *Cancer Gene Ther* 2009;16:1–12. doi:10.1038/cgt.2008.69.
- [6] Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol* 2013;31(20):2619–26. doi:10.1200/JCO.2012.46.3711.
- [7] Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(16):9330–5. doi:10.1073/pnas.161479898.
- [8] Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. 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. doi:10.1016/j.canlet.2005.12.039.
- [9] Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, Alemar B, Santos-Silva P, Pereira FS, Netto CB, Cossio SL, Roth DE, Brunetto AL, Zaganel-Oliveira M, Martel-Planche G, Goldim JR, Hainaut P, Camesa SA, Ashton-Prolla P. Li-Fraumeni and li-fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in southern Brazil. *Cancer* 2013;119(24):4341–9. doi:10.1002/cncr.28346.
- [10] Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003;63:6643–50 PMID: 14583457.
- [11] Bougeard G, Sesboué R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, Brugières L, Chompret A, de Paillerets BB, Stoppa-Lyonnet D, Bonaïti-Pellié C, Frébourg T French LFS working group. Molecular basis of the li-fraumeni syndrome: an update from the french lfs families. *J Med Genet* 2008;45:535–8. doi:10.1136/jmg.2008.057570.
- [12] Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431:350–5. doi:10.1038/nature02871.
- [13] Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116:281–97. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5.
- [14] Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell* 2003;113:673–6. doi:10.1016/s0092-8674(03)00428-8.
- [15] Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005;435(7043):834–8. doi:10.1038/nature03702.
- [16] Hu Y, Yu CY, Wang JL, Guan J, Chen HY, Fang JY. MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Sci Rep* 2014;4:3648. doi:10.1038/srep03648.
- [17] Hermeking H. MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2012;12:613–26. doi:10.1038/nrc3318.
- [18] Li Y, Gordon MW, Xu-Monette ZY, Visco C, Tzankov A, Zou D, et al. Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: a report from the international dlblcl rituximab-chop consortium program. *Blood* 2013;121:4529–40. doi:10.1182/blood-2012-12-471722.
- [19] Xiao J, Lin H, Luo X, et al. miR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress. *EMBO J* 2011;30:524–32. doi:10.1038/emboj.2010.347.
- [20] Id Said B, Malkin D. A functional variant in miR-605 modifies the age of onset in li-fraumeni syndrome. *Cancer Genet* 2015;208(1-2):47–51. doi:10.1016/j.cancergen.2014.12.003.
- [21] Fitarelli-Kiehl M, Macedo GS, Schlatter RP, et al. Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53. *Genet Mol Biol* 2016;39(2):203–9. doi:10.1590/1678-4685-GMB-2014-0351.
- [22] Lee I, Ajay SS, Yook JI, et al. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res* 2009;19(7):1175–83. doi:10.1101/gr.089367.108.
- [23] Id Said B. The role of miR-605 and its variant in li-fraumeni syndrome. https://tspace.library.utoronto.ca/bitstream/1807/44027/1/Idsaid_Badr_201404_MSc_thesis.pdf. Thesis submitted for MSc. Degree; 2014 [accessed 20 September 2019].

Capítulo VII – Artigo 4

**Functional *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* 3'UTR rs61764370 SNPs:
novel phenotype modifiers in Li-Fraumeni syndrome?**

Manuscrito a ser submetido como Artigo Original à revista *Genetics and Molecular Biology*.

Functional *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* 3'UTR rs61764370 SNPs: novel phenotype modifiers in Li-Fraumeni syndrome?

Igor Araujo Vieira^{a,b,c,*}, Eduarda Heidrich Pezzi^b, Isabel Cristina Bandeira^c, Larissa Brussa Reis^{a,b}, Yasminne Marinho de Araújo Rocha^b, Bruna Vieira Fernandes^b, Marina Siebert^d, Kendi Nishino Miyamoto^c, Maria Isabel Achatz^e, Henrique de Campos Reis Galvão^f, Felipe Antonio O. Garcia^{f,g}, Natalia Campacci^{f,g}, Dirce Maria Carraro^h, Maria Nirvana Formiga^h, Fernanda Sales Luiz Vianna^{a,b,i}, Edener Inez Palmero^{f,j,l}, Gabriel S. Macedo^{b,c,d}, Patricia Ashton-Prolla^{a,b,i,m}

^a Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^b Genomic Medicine Laboratory, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^c Hospital Moinhos de Vento (HMV), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^d Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^e Oncogenetics Department, Sírio Libanês Hospital, São Paulo, Brazil;

^f Oncogenetics Department, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil;

^g Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil;

^h A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil;

ⁱ Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil;

^j Pele Little Prince Research Institute, Curitiba, Paraná, Brazil;

^l Faculdades Pequeno Príncipe, Curitiba, Paraná, Brazil;

^m Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

Running title: miR-34b/c and Li-Fraumeni syndrome.

* Corresponding author

E-mail: igoraraujovieira@gmail.com (IAV)

Abstract

Li-Fraumeni Syndrome (LFS) is a rare cancer predisposing condition caused by germline pathogenic *TP53* variants, in which core tumors comprise sarcomas, breast, brain and adrenocortical neoplasms. Clinical manifestations are highly variable in carriers of the Brazilian germline founder variant *TP53* R337H, possibly due to the influence of modifier genes such as miRNA genes involved in the p53 pathway regulation. Herein, we investigated the potential phenotypic effects of two miRNA-related functional SNPs, *pri-miR-34b/c* rs4938723 and 3'UTR *KRAS* rs61764370, in a cohort of 273 LFS patients from southern and southeastern Brazil. Although the *KRAS* SNP showed no effect as a phenotype modulator, the rs4938723[C/C] genotype was significantly associated with development of LFS non-core tumors (first tumor diagnosis) in R337H carriers ($p=0.039$). Non-core tumors were also more frequently diagnosed in carriers of germline *TP53* DNA binding domain variants harboring the rs4938723[C] variant allele. Previous studies described *pri-miR-34b/c* rs4938723[C] as a risk allele for sporadic occurrence of thyroid and prostate cancers (non-core tumors of the LFS spectrum). With this study, we present additional evidence about the importance of analyzing miRNA genes that indirectly regulate p53 expression, and thus may modulate the LFS phenotype, such as those of the miR-34 family.

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, phenotype modifiers, *pri-miR-34b/c* rs4938723, core tumors, *KRAS* rs61764370.

Introduction

The p53 protein is a widely referred transcription factor encoded by the *TP53* gene (chr.17p13.1). *TP53* is the most commonly mutated gene in human tumors, acting as a key player in both sporadic and inherited cancers (Petitjean *et al.*, 2007). In response to stress, the p53 protein targets a plethora of genes involved in its tumor suppressor functions, such as cell cycle arrest, DNA repair, apoptosis, metabolism, senescence and inhibition of angiogenesis (Levine, 1997). Pathogenic tumor-associated *TP53* variants often cause a loss of their tumor-suppressive function and acquisition of dominant-negative activities, but also gain of new oncogenic properties that are independent of wild-type (WT) p53 (Zhang *et al.*, 2016; Brosh and Rotter, 2009).

Germline pathogenic *TP53* variants are the only known genetic alterations underlying Li-Fraumeni Syndrome (LFS) (OMIM #151623). LFS is a cancer predisposition syndrome characterized by an autosomal dominant inheritance pattern, a wide spectrum of early onset cancers and development of multiple primary tumors (Li and Fraumeni, 1969; Malkin, 2011). The most frequent tumors of LFS, named "core tumors", are breast cancer, bone and soft-tissue sarcomas, central nervous system tumors and adrenocortical carcinoma (Malkin *et al.*, 1990). However, other tumor types (non-core tumors) have also been reported in LFS families, including hematological malignancies (leukemias and lymphomas), gastrointestinal tumors (colorectal and gastric), melanoma, lung, thyroid and prostate cancers (IARC *TP53* database; Caron *et al.*, 2017; Formiga *et al.*, 2017; Swaminathan *et al.*, 2019). Individuals harboring pathogenic *TP53* germline variants have variable cancer risks, exhibiting clinical manifestations that range from a fully penetrant phenotype to cancer-free over a lifetime (Bougeard *et al.*, 2008; Guha *et al.*, 2017; IARC

TP53 database). Most of *TP53* germline pathogenic variants are missense and located in exons 5–8, corresponding to the p53 DNA-binding domain (DBD), and they usually confer high penetrance to cancer (Varley, 2003; Bougeard *et al.*, 2015; IARC TP53 database). In contrast, there are germline pathogenic variants in the p53 oligomerization domain, such as the founder variant c.1010G>A or p.(Arg337His, commonly known as R337H) (Latronico *et al.*, 2001; Ribeiro *et al.*, 2001; Achatz *et al.*, 2007) often showing reduced penetrance. *TP53* R337H is highly prevalent in southern and southeastern Brazil due to a founder effect (Pinto *et al.*, 2004; Palmero *et al.*, 2008; Custodio *et al.*, 2013) and carriers show a wide range of neoplasms, including core and non-core tumors, but the penetrance is reduced when compared to carriers of DBD variants (Giacomazzi *et al.*, 2013, Achatz and Zambetti, 2016; Mastellaro *et al.*, 2017; Pinto and Zambetti, 2020).

In addition to the previously reported *TP53* intragenic alterations and variants in p53 pathway genes (Marcel *et al.*, 2009; Bougeard *et al.*, 2006; Renaux-Petel *et al.*, 2014), other genetic modifiers of LFS, such as single nucleotide polymorphisms (SNPs) in genes encoding microRNAs (miRNAs), termed as miRSNPs, have been explored. miRNAs are short non-coding single-stranded RNAs that play a pivotal role in post-transcriptional regulation of gene expression (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Importantly, miRNAs can function as oncogenes or tumor suppressors according to their targets, and several miRNAs have emerged as direct and indirect regulators of multiple genes in the p53 network (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Shenouda and Alahari, 2009; Hermeking, 2012). To date, the most studied miRSNP in the LFS context is *MIR605* rs2043556 (A>G), a functional variant within a miRNA gene encoding an indirect regulator of p53 (miR-605). It has been recently described as a phenotype modifier of LFS in Canadian families

harboring DBD variants and in carriers of the Brazilian founder variant *TP53* R337H (Id Said and Malkin, 2015; Bandeira *et al.*, 2020). Other regulator genes involved in the p53 network are those of the miR-34 family, widely known for positively regulating p53 expression and activity and whose transcription is directly induced by p53 in response to genotoxic stress (Bommer *et al.*, 2007; Okada *et al.*, 2014; Navarro and Lieberman, 2015). A functional miRSNP in the promoter region of miR-34b/c (chr.11q23.1), a member of this miRNA family, namely *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C), has been associated with an increased risk of osteosarcoma and with early onset of hereditary retinoblastoma (Xu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Carvalho *et al.*, 2017).

In parallel, germline variants located at miRNA binding sites in the 3' untranslated region (UTR) of target mRNAs can influence on individual risk of developing cancer (Lopes de Silanes *et al.*, 2007). In this context, *KRAS* (chr.12p12.1) is one of the most commonly mutated proto-oncogenes in the development of malignancy (Prior *et al.*, 2012). The let-7 miRNA family plays an important role in many tumors by modulating the expression of multiple genes, including *KRAS* (Akao *et al.*, 2006). In the last decade, it has been reported a 3'UTR *KRAS* SNP, rs61764370 (T>G), disrupting a let-7 binding site in this UTR. Its presence has been shown to result in *KRAS* overexpression and seems to be associated with increased risk and/or reduced survival for several tumor types, including breast, ovarian, oral, colorectal and lung cancers (Chin *et al.*, 2008; Ratner *et al.*, 2010; Hollestelle *et al.*, 2011; Paranjape *et al.*, 2011; Pilarski *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2016). The prevalence of this functional SNP and its possible phenotype-modifying effect have not yet been evaluated in LFS patients.

Given the remarkable global and intrafamilial heterogeneity in clinical manifestations of LFS, in the present study we aimed to determine the genotypic and allelic frequencies and potential phenotype modulating effects of the *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* 3'UTR rs61764370 miRNA-related functional SNPs in carriers of germline *TP53* pathogenic variants, predominantly individuals harboring the R337H founder variant.

Material and Methods

Study subjects and ethical aspects

A total of 273 patients fulfilling Chompret criteria for LFS (Bougeard *et al.*, 2015) and previously identified as carriers of germline pathogenic/functional *TP53* variants were included in the present study. All of them were recruited from tertiary care hospitals in southern and southeastern Brazil, including 136 from Hospital do Amor (in the city of Barretos, southeastern Brazil), 71 from Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA, in the city of Porto Alegre, southern Brazil) and 66 from A.C. Camargo Cancer Center (in the city of São Paulo, southeastern Brazil). Among these LFS patients, 267 were R337H carriers, and six individuals (from HCPA only) were carriers of highly penetrant p53 DBD variants (classical phenotype). Written informed consent was obtained from the participants or from a parent and/or legal guardian (subjects under 18) in all cases. Molecular analyses performed in the current study were approved by the Research Ethics Committees of the collaborating centers (registered under the Certificate of Presentation for Ethical Appreciation – CAAE n° 96211017.7.1001.5327).

SNP genotyping

Genomic DNA was isolated from patients' peripheral blood leukocytes using the commercial kits Illustra Blood genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare Life Sciences, Brazil) or FlexiGene DNA kit (QIAGEN, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions. Genotyping of the miRNA-related SNPs *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 was performed by TaqMan® allelic discrimination according to Applied Biosystems® standard protocols (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using fluorescent allele-specific probes (reference numbers C_3081610_10 and ANU7AJN, respectively). The rs4938723 variant was genotyped using a predesigned and validated TaqMan® SNP Genotyping Assay, while genotyping of rs61764370 was carried out with custom-made TaqMan® probes (Applied Biosystems by Thermo Fisher Scientific). *TP53* R337H or rs121912664 genotyping was performed following a previously published protocol based on a custom TaqMan® assay (Fitarelli-Kiehl *et al.*, 2016).

Sequencing analysis

Direct Sanger sequencing was carried out to confirm the *TP53* rs121912664 and *KRAS* rs61764370 genotypes. Sequencing of *TP53* exon 10 encompassing rs121912664 was performed in all variant-positive subject samples previously identified by TaqMan® analyses according to original IARC standard protocols (primer sequences and PCR conditions available at https://p53.iarc.fr/Download/TP53_SangerSequencing_IARC.pdf). Moreover, custom TaqMan® genotyping results for *KRAS* rs61764370 were confirmed by Sanger sequencing in all SNP-positive LFS patients. Specific primers for *KRAS* 3'UTR

were designed for this study using Primer-BLAST and employed to amplify a 664-bp DNA fragment surrounding the SNP by PCR: forward primer 5'-GCTGCCCAATCCATTAGCGAC-3' and reverse primer 5'-GCGCATCGTGTTATCTCTGGGT-3'. The reference sequences used were LRG_344 and NC_000012.12. Sanger sequencing was performed on an ABI 3500 genetic analyzer (Thermo Fisher Scientific). Sequences were aligned to reference using CodonCode Aligner software. Importantly, carriers of p53 DBD variants included in our comparison group (n= 6) were derived from a previous Sanger-based screening cohort in which pathogenic alterations in all *TP53* coding regions (exons 2-11) were assessed as established by the IARC protocols (Giacomazzi *et al.*, 2013).

Queries in population and sequence databases

Frequency data of the miRNA-related variants in different populations were retrieved from Online Archive of Brazilian Mutations (ABraOM, SABE-WGS-1171 dataset) (Naslavsky *et al.*, 2017; Naslavsky *et al.*, 2020), gnomAD v2.1.1 dataset (GRCh37/hg19) (Karczewski *et al.*, 2020), 1000 Genomes (1000 Genomes Project Consortium *et al.*, 2015), and Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMed) (Taliun *et al.*, 2021). In order to analyze evolutionary conservation of genome sequences encompassing the SNPs *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 positions across 27 primate species, the phylogenetic context tool was accessed in the Ensembl database (<https://www.ensembl.org/index.html>).

Statistical analyses

Descriptive statistics was used to determine genotype and allele frequencies, as well as to evaluate clinical features of LFS patients. Hardy–Weinberg equilibrium was assessed by Chi-square analysis. Differences between groups according to polymorphism status were compared using Kruskal-Wallis' (median age at tumor diagnosis), Pearson's chi-squared (age group distribution of cancer onset, cancer personal history, number of cancer diagnoses, and frequency of LFS core and non-core tumors as the first tumor type diagnosed) or Fisher exact tests (specific tumor type at first diagnosis). All tests were two-tailed and a p value less than 0.05 was considered statistically significant. All statistical analyses were performed in SPSS v.18 software (IBM, Armonk, New York, NY, USA)

Results

Clinical characterization of the main study group including LFS patients carrying the *TP53* R337H founder allele is summarized in **Table S1**. When analyzing their clinical features, 141 carriers (52,8%) had already developed cancer, of which 38 (26,9%) exhibited multiple primary tumors. Genotype and allele frequencies for both SNPs *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C) and *KRAS* rs61764370 (T>G) in this group of LFS patients are shown in **Table 1** and were in Hardy-Weinberg equilibrium ($p=0.05$ and $p=0.22$, respectively). Minor allele frequencies (MAF) for *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs in our cohort of R337H carriers (0.35 and 0.07, respectively) were consistent with the frequency reported in previous studies and population databases (**Table S2**). No individual with the *KRAS* SNP homozygous G genotype was identified in the overall sample. Since the genotyping for

this SNP was based on custom TaqMan[®] probes, we performed Sanger sequencing and confirmed the rs61764370[T/G] heterozygous genotype in all SNP-positive LFS patients (**Figure S1**). Sequence comparisons of genomic regions encompassing *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs across 27 primate species revealed that none of these species showed the rs4938723[C] and rs61764370[G] variant alleles, respectively, indicating a high evolutionary conservation of these sequences (**Figure S2**).

Potential phenotype-modifying effects of the various SNP genotypes in relation to the number and/or type of tumors were assessed and *pri-miR-34b/c* rs4938723[C] was associated with the first tumor type diagnosed ($p=0.045$) but not with an increased number of primary tumors in the main study group (*TP53* R337H carriers) (**Table 2**). When refining this analysis (**Table 3**), we observed that neoplasms more frequently associated with the rs4938723[C] variant allele were non-core tumors of the LFS spectrum. Although the *KRAS* SNP showed no effect as a phenotype modulator, we identified that the homozygous CC genotype for *pri-miR-34b/c* rs4938723 was also significantly associated with development of LFS non-core tumors (first tumor diagnosis) in R337H carriers ($p=0.039$) such as thyroid, prostate and gastrointestinal cancers. Nonetheless, there was no significant difference in the median age at first tumor diagnosis when comparing distribution of the *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs genotypes among R337H carriers (**Figure 1, Table S3**). Finally, no association between *pri-miR-34b/c* rs4938723[C] and *KRAS* rs61764370[G] presence and personal history of cancer or median age at core cancers' diagnoses was found in R337H carriers (**Tables S4 and S5**).

Clinical and molecular features of our small case series of LFS patients harboring p53 DBD pathogenic alterations (classical phenotype) are summarized in **Table S6**.

Interestingly, non-core tumors were also more frequently diagnosed in patients of this group with the *pri-miR-34b/c* rs4938723[T/C] heterozygous genotype. This genotype was identified in 4/6 carriers of germline DBD alterations, of which the majority (3/4) developed, over the years, at least one of these LFS atypical tumor types (gastrointestinal and thyroid cancers). Two of them were female LFS probands whose pedigrees and genotype data are depicted in **Figure 2**.

Discussion

Notably, LFS patients exhibit a striking phenotypic variability both within and between their families that cannot be explained only by distinct functional impact of each specific *TP53* pathogenic variant, suggesting the presence of coexistent genetic factors that modify germline p53 mutant activity (Olivier *et al.*, 2003; Bougeard *et al.*, 2008; Bougeard *et al.*, 2015). Of particular interest, clinical manifestations are highly variable in carriers of the *TP53* R337H Brazilian founder hypomorphic allele associated with incomplete penetrance, reinforcing the role of modifier genes (Achatz and Zambetti, 2016; Pinto and Zambetti, 2020; Jeffers *et al.*, 2021). In the past twenty years, germline intragenic *TP53* variants (common variant p.Pro72Arg and 16-bp duplication polymorphism in the intron 3, named as PIN3) and SNPs in p53 pathway genes, especially in the main negative regulator of p53 (*MDM2* SNP309), have been described as LFS phenotype modifiers associated with earlier age of tumor onset (Bougeard *et al.*, 2006; Marcel *et al.*, 2009; Renaux-Petel *et al.*, 2014; Macedo *et al.*, 2018). In parallel, several miRNAs have emerged as major players in the p53 network, acting as direct and indirect post-

transcriptional regulators of p53 expression and activity (Hermeking, 2012; Liu *et al.*, 2017). miRSNPs occurring in regulatory regions of miRNA genes may affect their efficiency of transcription and potentially modify pri-miRNA or pre-miRNA processing levels (Ryan, 2017).

In the present study, we explored the potential phenotypic effects of a functional miRSNP within a pri-miRNA gene (chr.11q23.1), namely *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C), in an expressive cohort of LFS patients (n=273) from southern and southeastern Brazil, predominantly *TP53* R337H carriers. The main findings from our study were that LFS non-core tumor types were significantly increased at first tumor diagnosis in R337H carriers with the rs4938723[C/C] homozygous genotype ($p=0.039$), and the rs4938723[T/C] heterozygous genotype was identified in 3/6 carriers of germline p53 DBD variants (classical phenotype) exhibiting LFS non-core cancers over the years. Our findings are in agreement with previous descriptions of rs4938723[C] as a risk allele for thyroid and prostate tumors, which are also observed in our R337H-positive patients, in cohorts apparently unselected for cancer family history (Wang *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2015; Hashemi *et al.*, 2017; He *et al.*, 2018; Heidari *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2019). Since, regardless of the LFS context, rs4938723[C] confers susceptibility to thyroid and prostate neoplasms, we hypothesized that the previously observed high frequency of thyroid, prostate cancer and other non-core tumors in R337H carriers (Achatz and Zambetti, 2016; Formiga *et al.*, 2017; Mastellaro *et al.*, 2017) could be due to coinheritance with rs4938723[C].

Functionally, the variant C-allele is located within the CpG island of the promoter region of miR-34b/c, altering the binding efficiency of transcription factor GATA-X.

Therefore, the alteration affects not only the expression of mature miR-34b/c but also exerts, very likely, an influence on risk for several cancer types (as shown in **Figures 3A and 3B**) (Xu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014; Tong *et al.*, 2016; Hashemi *et al.*, 2019). GATA-X only binds to the promoter sequence in the presence of rs4938723[C] variant allele. *In vitro* luciferase assays showed that the transcription activity of *pri-miR-34b/c* was increased when T allele transitioned to C allele (Tong *et al.*, 2016), and tumor samples from individuals with the rs4938723[C/C] genotype exhibited significantly higher expression levels of miR-34b compared with TT and TC genotypes (Yu, 2017). Furthermore, a positive feedback loop between p53 and miR-34 family members, including miR-34a and miR-34b/c, has been shown to mediate tumor suppression (**Figure 3C**) (Okada *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2019). Members of the miR-34 family are direct transcriptional targets of p53 and their expression is induced by p53 in response to DNA damage or activation of oncogenes (Bommer *et al.*, 2007; He *et al.*, 2007). In contrast, this miRNA family acts indirectly as an important positive regulator of p53 expression and function by negatively regulating some of the key post-translational inhibitors of p53, such as MDM4, SIRT1 and HDAC1 (Navarro and Lieberman, 2015; Liu *et al.*, 2017). Interestingly, miR-34 promoter inactivation by aberrant CpG island methylation is a common event in tumor formation (Lodygin *et al.*, 2008; Vogt *et al.*, 2011), and miR-34a promoter hypermethylation has been previously identified in different types of primary tumors from LFS patients and associated with poor clinical outcomes (Samuel *et al.*, 2016).

In comparison with our findings, recent studies have demonstrated that another common miRSNP located in a pre-miRNA gene, *MIR605* rs2043556 (A>G), may partly explain the clinical heterogeneity in LFS. The rs2043556 variant G-allele causes a reduction in the

processing levels of its host miRNA, leading to decreased mature miR-605 levels which are associated with several clinical observations: a 10-year acceleration in the mean age of LFS tumor onset in Canadian families with *TP53* pathogenic DBD variants (Id Said and Malkin, 2015), and association of the rs2043556[G/G] genotype with occurrence of multiple primary tumors among Brazilian R337H carriers (Bandeira *et al.*, 2020). More recently, a germline nonsense variant in the tumor-suppressor gene *XAF1* (E134*/Glu134Ter/rs146752602) has been described as a remarkable LFS phenotype modifier associated with cancer risk and tumor type patterns in R337H carriers (Pinto *et al.*, 2020). The extended haplotype cosegregating both *XAF1* E134* and *TP53* R337H variants was predominant in Brazilian R337H carriers with a more aggressive cancer phenotype, increasing risk for sarcoma and subsequent neoplasms over lifetime.

Regarding the *KRAS*-upregulation 3'UTR SNP (rs61764370, chr.12p12.1), we hypothesized that it could be a strong phenotype modifier in carriers of *TP53* hypomorphic variants, such as R337H. Nonetheless, this SNP was not associated with any of the clinical manifestations analyzed in our cohort. Indeed, there are conflicting results of its association with sporadic and hereditary breast cancer (Hollestelle *et al.*, 2011; Paranjape *et al.*, 2011; Pilarski *et al.*, 2012; Ovarian Cancer Association Consortium *et al.*, 2016), which is the most common tumor type found in LFS families (IARC *TP53* database; Mai *et al.*, 2016).

Importantly, our study presents limitations that must be considered in the interpretation of its results. First, despite this being one of the largest R337H cohorts used in the context of LFS genetic modifiers, our global sample size could be considered relatively small (n=273) to identify causal genetic associations as phenotype modifiers. Second, due to a

limitation in accessing additional clinical samples we were unable to perform miR-34b/c expression analyses. Third, for the same reason, we were unable to carry out tumor loss of heterozygosity (LOH) analyses for *TP53* and *pri-miR-34b/c*. Finally, the mechanistic basis of a potential interaction between R337H mutant p53 and miR-34b/c C-allele on *TP53* expression and activity as well as its contribution to predisposition to different tumor types remains unknown, requiring further functional studies.

In conclusion, our study suggested that *pri-miR-34b/c* rs4938723 may act as a LFS phenotype modifier for the tumor type manifestation, specifically associated with development of atypical or non-core tumors (first tumor diagnosis) in Brazilian *TP53* R337H carriers. The exact mechanism to explain this tumor-specific predisposition remains to be determined. This study also provides additional evidence about the importance of analyzing miRNA genes that indirectly regulate p53 expression, such as those of the miR-34 family. Further studies including larger case series with different germline pathogenic *TP53* variants from ethnically diverse populations as well as additional functional analyses of the *pri-miR-34b/c* risk allele are warranted to validate our findings.

Acknowledgments

The authors wish to thank Patricia Silva, Cristina Brinckmann Netto and Gustavo Stumpf for their valuable contributions and technical support. This study was funded by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Grant #478430/2012-4), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul

(FAPERGS, Grant #16/2551-0000486-2), and Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA #17-0343) to Patricia Ashton-Prolla. Barretos Cancer Hospital was partially supported by FINEP-CT-INFRA (02/2010). Igor Araujo Vieira and Larissa Brussa Reis were postgraduate fellowships recipients from CNPq. Eduarda Pezzi received a CNPq undergraduate level scholarship. Patricia Ashton-Prolla, Edenir Inez Palmero and Fernanda Sales Luiz Vianna are CNPq associated researchers and receive scholarships.

Conflict of interest

H. C. R. G. has a disclosure with AstraZeneca Brazil (financial support for lectures) and Hermes Pardini Institute (Consultancy). Other authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicial to the impartiality of the reported research.

Authors Contributions:

IAV, ICB, GSM and PA-P conceived the study; IAV, EHP, YMAR and BVF conducted the experiments; IAV, LBR, YMAR, MS, KNM, HCRG, FAOG, NC, DMC, MNF, FSLV and EIP analyzed the data; IAV, EHP, ICB, LBR, GSM and PA-P participated on manuscript design; IAV, EHP, ICB and KNM wrote the manuscript; MS, KNM, HCRG, FAOG, NC, DMC, MNF, FSLV, EIP, GSM and PA-P participated on revising for intellectual content. All authors read and approved the final version.

References

1000 Genomes Project Consortium; Auton A, Brooks LD, Durbin RM, Garrison EP, Kang HM, Korbel JO, Marchini JL, McCarthy S, McVean GA and Abecasis GR (2015) A global reference for human genetic variation. *Nature* 526(7571):68-74.

Achatz MI and Zambetti GP (2016) The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harb Perspect Med* 6(12):a026195.

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. (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.

Akao Y, Nakagawa Y and Naoe T (2006) let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull* 29(5):903-906.

Ambros V (2004) The functions of animal microRNAs. *Nature* 431:350–355.

Bandeira IC, Vieira IA, Andreis TF, Brussa Reis L, Macedo GS, Vianna FSL, Santos-Silva P, Palmero EI, Galvão HCR, Ramos CRN et al. (2020) MIR605 rs2043556 is associated with the occurrence of multiple primary tumors in TP53 p.(Arg337His) mutation carriers. *Cancer Genet* 240:54-58.

Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116:281–297.

Bommer GT, Gerin I, Feng Y, Kaczorowski AJ, Kuick R, Love RE, Zhai Y, Giordano TJ, Qin ZS, Moore BB et al. (2007) p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr Biol* 17(15):1298-1307.

Bougéard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L, Chompret A, Bressac-de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D, Bonaiti-Pellie C et al. (2006) Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* 43(6):531-533.

Bougéard G, Renaux-Petel M, Flaman J-M, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, Gauthier-Villars M, Stoppa-Lyonnet D, Consolino E, Brugières L et al. (2015) Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol* 33(21):2345-2352.

Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, Brugières L, Chompret A, Bressac de Paillerets B, Stoppa-Lyonnet D et al. (2008) Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet* 45(8):535-538.

Caron O, Frebourg T, Benusiglio PR, Foulon S and Brugières L (2017) Lung Adenocarcinoma as Part of the Li-Fraumeni Syndrome Spectrum: Preliminary Data of the LIFSCREEN Randomized Clinical Trial. *JAMA Oncol* 3(12):1736-1737.

Carvalho INSR, Reis AHO, Santos ACE and Vargas FR (2017) A polymorphism in mir-34b/c as a potential biomarker for early onset of hereditary retinoblastoma. *Cancer Biomark* 18(3):313-317.

Chen P, Sun R, Pu Y, Bai P, Yuan F, Liang Y, Zhou B, Wang Y, Sun Y, Zhu J, Zhang L and Gao L (2015) Pri-Mir-34b/C and Tp-53 Polymorphisms are Associated With The Susceptibility of Papillary Thyroid Carcinoma: A Case-Control Study. *Medicine (Baltimore)* 94(38):e1536.

Chin LJ, Ratner E, Leng S, Zhai R, Nallur S, Babar I, Muller R-U, Straka E, Su L, Burki EA et al. (2008) A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res* 68:8535–8540.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, Grisa L, Parise IZS, Pianovski MAD, Fiori CMCM et al. (2013) Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol* 31(20):2619–2626.

David Malkin (2011) Li-fraumeni syndrome *Genes Cancer* 2(4):475-484.

Esquela-Kerscher A and Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6(4):259-269.

Fitarelli-Kiehl M, Macedo GS, Schlatter RP, Koehler-Santos P, Matte US, Ashton-Prolla P and Juliana Giacomazzi (2016) Comparison of multiple genotyping methods for the identification of the cancer predisposing founder mutation p.R337H in TP53. *Genet Mol Biol* 39(2):203-209.

Formiga MNC, Andrade KC, Kowalski LP and Achatz MI (2017) Frequency of Thyroid Carcinoma in Brazilian TP53 p.R337H Carriers With Li Fraumeni Syndrome. *JAMA Oncol* 3(10):1400-1402.

Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, Alemar B, Santos-Silva P, Pereira FS, Netto CB, Cossio SL, Roth DE, Brunetto AL et al. (2013) Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer* 119(24):4341–4349.

Guha T and Malkin D (2017) Inherited TP53 Mutations and the Li-Fraumeni Syndrome. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(4):a026187.

Hashemi M, Danesh H, Bizhani F, Narouie B, Sotoudeh M, Nouralizadeh A, Sharifiaghdas F, Bahari G and Taheri M (2017) Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism increased the risk of prostate cancer. *Cancer Biomark* 18(2):155-159.

Hashemi M, Moazeni-Roodi A, Bahari G, Taheri M, Ghavami S (2019) Association between miR-34b/c rs4938723 polymorphism and risk of cancer: An updated meta-analysis of 27 case-control studies. *J Cell Biochem* 120(3):3306-3314.

He J, Zou Y, Liu X, Zhu J, Zhang J, Zhang R, Yang T and Xia H (2018) Association of Common Genetic Variants in Pre-microRNAs and Neuroblastoma Susceptibility: A Two-Center Study in Chinese Children. *Mol Ther Nucleic Acids* 11:1-8.

He L, He X, Lim LP, Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, Xue W, Zender L, Magnus J, Ridzon D et al. (2007) A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* 447(7148):1130-1134.

Heidari Z, Mohammadpour-Gharehbagh A, Eskandari M, Harati-Sadegh M and Salimi S (2018) Genetic polymorphisms of miRNA let7a-2 and pri-mir-34b/c are associated with an increased risk of papillary thyroid carcinoma and clinical/pathological features. *J Cell Biochem* 1-8.

Hermeking H (2012) MicroRNAs in the p53 network: micromanagement of tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 12(9):613-626.

Hollestelle A, Pelletier C, Hooning M, Crepin E, SchutteM, Look M, Collee JM, Nieuwlaat A, Dorssers LCJ, Seynaeve C et al. (2011) Prevalence of the variant allele rs61764370 T>G in the 3'UTR of KRAS among Dutch BRCA1, BRCA2 and non-BRCA1/BRCA2 breast cancer families. *Breast Cancer Res Treat* 128:79–84.

Id Said B and Malkin D (2015) A functional variant in miR-605 modifies the age of onset in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet* 208(1-2):47-51.

Jeffers JR, Pinto EM, Rehg JE, Clay MR, Wang JW, Neale G, Heath RJ, Lozano G, Lalli E, Figueiredo BC et al. (2021) The Common Germline TP53-R337H Mutation Is Hypomorphic and Confers Incomplete Penetrance and Late Tumor Onset in a Mouse Model. *Cancer Res* 81(9):2442-2456.

Karczewski KJ, Francioli LC, Tiao G, Cummings BB, Alföldi J, Wang Q, Collins RL, Laricchia KM, Ganna A, Birnbaum DP et al. (2020) The mutational constraint spectrum quantified from variation in 141,456 humans. *Nature* 581(7809):434-443.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM and Mendonca BB (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):4970-4973.

Levine AJ (1997) p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88(3):323-331.

Li FP and Fraumeni JF (1969) Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med*: 71:747-752.

Li L, Zhu J, Lu T, Liu W, Tang J, Zhang J, Wang Y, Li Y, Li S, Zhou H, Xia H, He J and Cheng J (2019) Association of miR-34b/c rs4938723 and TP53 Arg72Pro Polymorphisms with Neuroblastoma Susceptibility: Evidence from Seven Centers. *Transl Oncol* 12(10):1282-1288.

Liu J, Zhang C, Zhao Y and Feng Z (2017) MicroRNA Control of p53. *J Cell Biochem* 118(1):7-14.

Lodygin D, Tarasov V, Epanchintsev A, Berking C, Knyazeva T, Körner H, Knyazev P, Diebold J, Hermeking H (2008) Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7(16):2591-2600.

López de Silanes I, Quesada MP and Esteller M (2007) Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. *Cell Oncol* 29:1-17.

Macedo GS, Vieira IA, Brandalize AP, Giacomazzi J, Palmero EI, Volc S, Paixão-Côrtes VR, Caleffi M, Alves MS, Achatz MI, et al. (2016) Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3' UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet* 209(3):97-106.

Macedo GS, Vieira IA, Vianna FSL, Alemar B, Giacomazzi J, Brandalize APC, Caleffi M, Volc SM, Galvão HCR, Palmero EI et al. (2018) p53 signaling pathway polymorphisms, cancer risk and tumor phenotype in TP53 R337H mutation carriers. *Fam Cancer* 17(2):269-274.

Mai PL, Best AF, Peters JA, DeCastro RM, Khincha PP, Loud JT, Bremer RC, Rosenberg PS, Savage SA (2016) Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* 122(23):3673-3681.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ and Tainsky MA (1990) Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250:1233-1238.

Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, Martel-Planche G, Ashton-Prolla P, Olivier M, Brentani RR, Hainaut PP, Achatz MI (2009) TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* 46(11):766-772.

Mastellaro MJ, Seidinger AL, Kang G, Abrahão R, Miranda ECM, Pounds SB, Cardinalli IA, Aguiar SS, Figueiredo BC, Rodriguez-Galindo C et al. (2017) Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer* 123(16):3150-3158.

Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, Nunes K, Ceroni JRM, Carvalho DL, Simões CES et al. (2020) Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). *bioRxiv preprint* doi: <https://doi.org/10.1101/2020.09.15.298026>.

Naslavsky MS, Yamamoto GL, Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, Bozoklian D, Sandberg TOM, Brito LA, Lazar M et al. (2017) Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat* 38(7):751-763.

Navarro F and Lieberman J (2015) miR-34 and p53: New Insights into a Complex Functional Relationship. *PLoS One* 10(7):e0132767.

Okada N, Lin C-P, Ribeiro MC, Biton A, Lai G, He X, Bu P, Vogel H, Jablons DM, Keller AC et al. (2014) A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev* 28(5):438-450.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P and Eeles RA (2003) Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63(20):6643-6650.

Ovarian Cancer Association Consortium, Breast Cancer Association Consortium, Consortium of Modifiers of BRCA1 and BRCA2, Hollestelle A, Baan FHVD, Berchuck A, Johnatty SE, Aben KK, Agnarsson BA, Aittomäki K et al. (2016) No clinical utility of KRAS variant rs61764370 for ovarian or breast cancer. *Gynecol Oncol* 141:386-401.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MIW, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP et al. (2008) 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* 261(1):21–25.

Paranjape T, Heneghan H, Lindner R, Keane FK, Hoffman A, Hollestelle A, Dorairaj J, Geyda K, Pelletier C, Nallur S et al. (2011) A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncol* 12:377–386.

Petitjean A, Mathe E, Kato S et al. (2007) Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 28:622–629.

Pilarski R, Patel DA, Weitzel J, McVeigh T, Dorairaj JJ, Heneghan HM, Miller N, Weidhaas JB, Kerin MJ, McKenna M et al. (2012) The KRAS variant is associated with risk of developing double primary breast and ovarian cancer. *PLoS ONE* 7: e37891.

Pinto EM and Zambetti GP (2020) What 20 years of research has taught us about the TP53 p.R337H mutation. *Cancer* 126(21):4678-4686.

Pinto EM, Billerbeck AEC, Villares MCBF, Domenice S, Mendonça BB and Latronico AC (2004) Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors *Arq Bras Endocrinol Metabol* 48(5):647-650.

Pinto EM, Figueiredo BC, Chen W, Galvão HCR, Formiga MN, Fragoso MCBV, Ashton-Prolla P, Ribeiro EMSF, Felix G, Costa TEB et al. (2020) XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Sci Adv* 6(26):eaba3231.

Prior IA, Lewis PD and Mattos C (2012) A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res* 72(10):2457-2467.

Ran Brosh and Varda Rotter (2009) When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nature Reviews Cancer* 9: 701–713.

Ratner E, Lu L, Boeke M, Barnett R, Nallur S, Chin LJ, Pelletier C, Blitzblau R, Tassi R, Paranjape T et al. (2010) A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. *Cancer Res* 70:6509–6015.

Renaux-Petel M, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Fourneaux S, Bessenay E, Frébourg T and Bougeard G (2014) The MDM2 285G-309G haplotype is associated with an earlier age of tumour onset in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Fam Cancer* 13(1):127-130.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G et al. (2001) An inherited p53 mutation that contributes in a

tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(16):9330–9335.

Ryan BM (2017) microRNAs in Cancer Susceptibility. *Adv Cancer Res* 135:151-171.

Samuel N, Wilson G, Lemire M, Id Said B, Lou Y, Li W, Merino D, Novokmet A, Tran J, Nichols KE et al. (2016) Genome-Wide DNA Methylation Analysis Reveals Epigenetic Dysregulation of MicroRNA-34A in TP53-Associated Cancer Susceptibility. *J Clin Oncol*. 2016 Oct 20;34(30):3697-3704.

Shenouda SK and Alahari SK (2009) MicroRNA function in cancer: oncogene or a tumor suppressor? *Cancer Metastasis Rev* 28(3-4):369-378.

Swaminathan M, Bannon SA, Routbort M, Naqvi K, Kadia TM, Takahashi K, Alvarado Y, Ravandi-Kashani F, Patel KP, Champlin R et al. (2019) Hematologic malignancies and Li-Fraumeni syndrome. *Cold Spring Harb Mol Case Stud* 5(1):a003210.

Taliun D, Harris DN, Kessler MD, Carlson J, Szpiech ZA, Torres R, Taliun SAG, Corvelo A, Gogarten SM, Kang HM et al. (2021) Sequencing of 53,831 diverse genomes from the NHLBI TOPMed Program. *Nature* 590(7845):290-299.

Tong N, Chu H, Wang M, Xue Y, Du M, Lu L, Zhang H, Wang F, Fang Y, Li J et al. (2016) Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism contributes to acute lymphoblastic leukemia susceptibility in Chinese children. *Leuk Lymphoma* 57(6):1436-1441.

Varley JM (2003) Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21(3):313-320.

Vogt M, Munding J, Grüner M, Liffers S-T, Verdoodt B, Hauk J, Steinstraesser L, Tannapfel A, Hermeking H (2011) Frequent concomitant inactivation of miR-34a and miR-34b/c by CpG methylation in colorectal, pancreatic, mammary, ovarian, urothelial, and renal cell carcinomas and soft tissue sarcomas. *Virchows Arch* 458(3):313-322.

Wang X, Lu X, Fang Y, Chen H, Deng X, Peng C, Li H and Shen B (2014) Association between miR34b/c polymorphism rs4938723 and cancer risk: a meta-analysis of 11 studies including 6169 cases and 6337 controls. *Med Sci Monit* 20:1977-1982.

Xu Y, Liu L, Liu J, Zhang Y, Zhu J, Chen J, Liu S, Liu Z, Shi H, Shen H et al. (2011) A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 128(2):412-417.

Zhang Y, Coillie SV, Fang J-Y and Xu J (2016) Gain of function of mutant p53: R282W on the peak? *Oncogenesis* 5:196.

Yu K (2017) The Rs4938723 Polymorphism Reduces Expression of MicroRNA-34b and Increases the Risk of Recurrence after Endoscopic Dissection in Early Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem* 43(3):1235-1246.

Zhang L, Liao Y and Tang L (2019) MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 38(1):53.

Zhang S, Hou C, Li G, Zhong Y, Zhang J, Guo X, Li B, Bi Z and Shao M (2016) A single nucleotide polymorphism in the 3'-untranslated region of the KRAS gene disrupts the interaction with let-7a and enhances the metastatic potential of osteosarcoma cells. *Int J Mol Med* 38(3):919-926.

Internet Resources

IARC standard protocols, https://p53.iarc.fr/Download/TP53_SangerSequencing_IARC.pdf (Accessed 18 May 2021).

IARC (International Agency for Research on Cancer) TP53 database, <http://p53.iarc.fr> (Accessed 17 June 2021).

Ensembl database, <https://www.ensembl.org/index.html> (Accessed 12 June 2021).

Figure legends

Figure 1. (A) Distribution of the median age of first cancer diagnosis according to genotypes for *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs in *TP53* p.(Arg337His) carriers. **(B)** and **(C)** shows the percentage of cancer-unaffected individuals harboring the founder *TP53* variant for each *pri-miR-34b/c* and *KRAS* genotype, respectively, as a function of age of cancer onset.

Figure 2. Pedigrees of female LFS probands with classical phenotype (indicated by the black arrows; identifiers LFS-1 and LFS-5 in Table S6) and harboring different *TP53* DNA-binding domain (DBD) germline variants, along with the *pri-miR-34b/c* variant C-allele in heterozygosis. Note that both were diagnosed with multiple primary tumors, one of them was a non-core tumor of LFS (pancreatic and thyroid cancers). Genotypes for *TP53* and *pri-miR-34b/c* are shown next to the arrow indicating the proband. Yrs, years; mth, months; d, age of death; CNS, central nervous system tumor.

Figure 3. Influence of rs4938723[C] variant allele on tumor development from organism to p53 network levels. **(A)** rs4938723[C] variant allele acting as a risk allele (left red side) or a protective allele (right green side) depending on the tumor type. **(B)** Overview of the CpG island within the *pri-miR-34b/c* promoter region. The base change (T>C) enables the binding of GATA-family transcription factors in this site, which will later contribute to increase transcriptional levels of miR-34b/c as opposed to the wild-type T allele. **(C)** A positive feedback loop between p53 and miR-34 family members mediates tumor

suppressor activities. miR-34 family regulates *TP53* expression by directly targeting *TP53* mRNA and also indirectly by negatively regulating p53 critical inhibitors (MDM4, SIRT1 and HDAC1), as well as p53 induces the transcription of all members of this miRNA family in response to genotoxic stress. ¹Papillary thyroid carcinoma; ²Hepatocellular carcinoma; ³Renal cell cancer; ⁴Pediatric acute lymphoblastic leukemia. S, sense sequence; AS, antisense sequence; isl, island; 4mer, tetramer; p53RE, p53 response element.

Supplementary material

The following online material is available for this article:

Table S1 – Clinical features of LFS patients harboring the germline founder pathogenic variant *TP53* R337H included in the present study.

Table S2 – Minor allele frequency for the variants of interest *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 reported in previous studies and population databases.

Table S3 – Age group distribution of cancer onset and genotypes for the *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs among *TP53* R337H carriers.

Table S4 – Personal history of cancer diagnosis and genotypes for the selected SNPs in overall sample of *TP53* R337H carriers.

Table S5 – *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 genotypic frequencies in *TP53* R337H carriers according to the median age at diagnosis of breast and adrenocortical tumors.

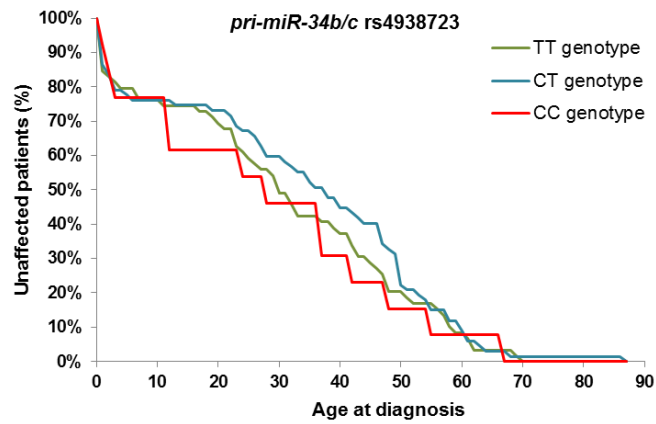
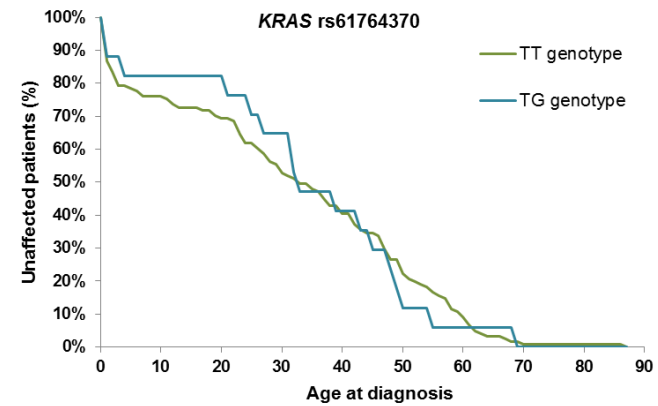
Table S6 – Clinical and molecular features of LFS patients with classical germline *TP53* pathogenic variants (DNA-binding domain mutations) included in the present study and their genotyping results for the SNPs *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370.

Figure S1 – Direct Sanger sequencing analysis confirmed the genotypes of all SNP-positive samples for *KRAS* rs61764370 (T>G) previously identified through a custom TaqMan® assay.

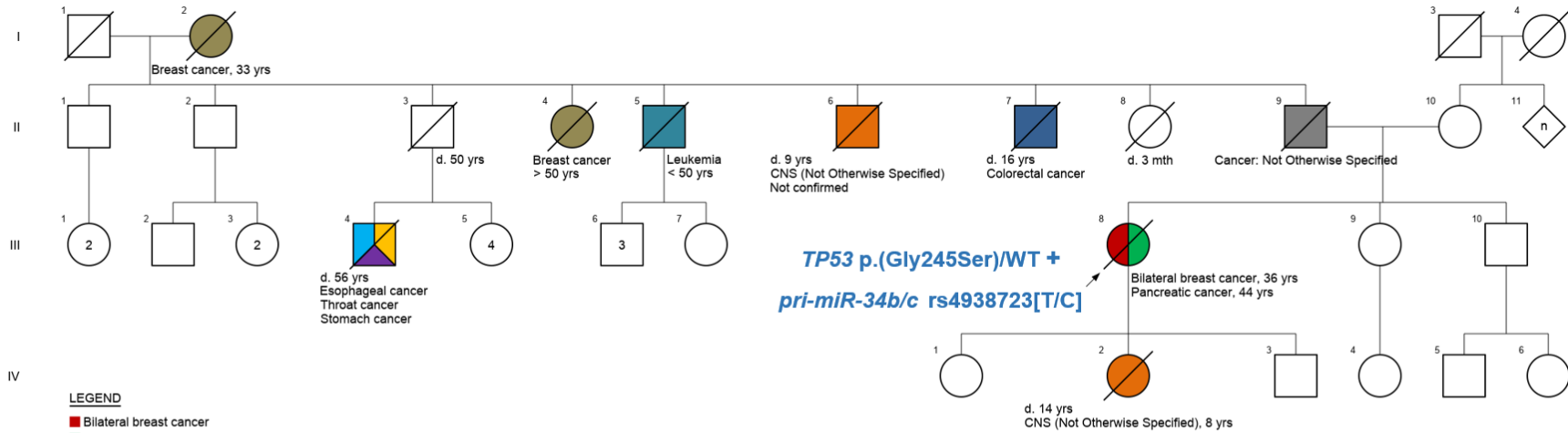
Figure S2 – Comparison of genomic sequences encompassing regions of the germline SNPs (A) *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C) and (B) *KRAS* rs61764370 (T>G) across 27 primate species.

A

Genotypes	Median age in years (IR) ^a	<i>p</i>
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723		
TT	30 (37)	
TC	38 (37)	0.563 ^b
CC	28 (38)	
TC + CC	36.5 (38)	0.482 ^b
<i>KRAS</i> rs61764370		
TT	33 (39)	
TG	32 (32)	0.873 ^b

^a IR, interquartile range.^b Kruskal-Wallis test.**B****C****Figure 1**

LFS-1



LFS-5

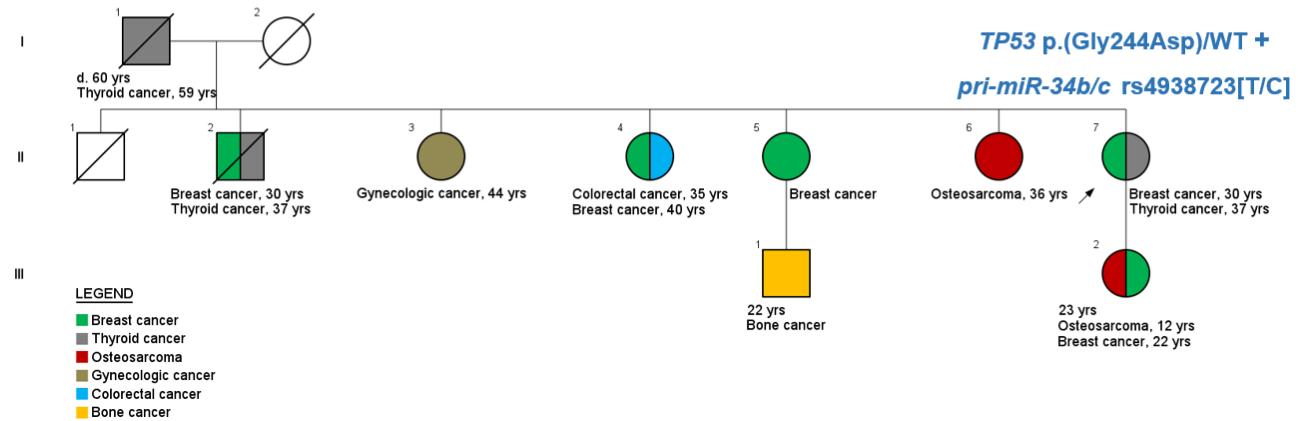


Figure 2

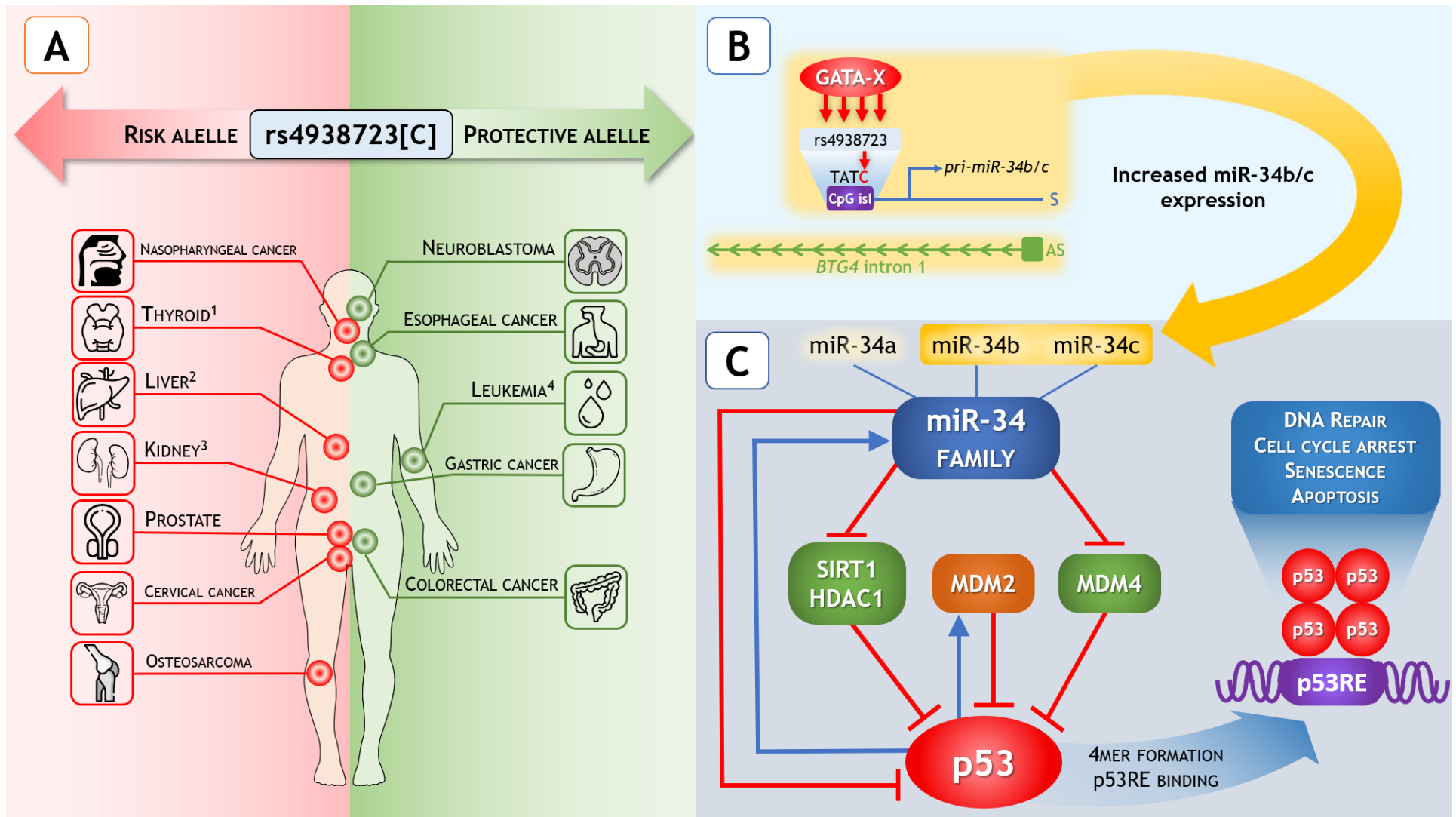


Figure 3

Table 1. Genotypic and allelic frequencies of *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C) and *KRAS* rs61764370 (T>G) SNPs among *TP53* R337H carriers fulfilling LFS criteria.

Genotypic frequencies	N (%) n= 267
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723	
TT	104 (39)
TC	137 (51.3)
CC	26 (9.7)
TC+CC	163 (61)
C allele frequency*	0.35
<i>KRAS</i> rs61764370	
TT	230 (86.1)
TG	37 (13.9)
GG	0 (0)
G allele frequency*	0.07

* Variant allele.

Table 2. Genotypic frequencies of *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 in *TP53* R337H carriers according to tumor type (first tumor diagnosis) and number of cancer diagnoses.

Genotypes	Breast cancers, N (%)	Adrenocortical carcinomas, N (%)	Sarcomas ^a , N (%)	CNS tumors ^b , N (%)	Other tumor types ^c , N (%)	<i>p</i>	Single tumor diagnosis, N (%)	Multiple primary tumors diagnosis, N (%)	<i>p</i>
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723									
TT	21 (42.8)	12 (37.5)	9 (40.9)	8 (88.9)	9 (31)		45 (43.7)	14 (36.8)	
TC	26 (53.1)	17 (53.1)	12 (54.6)	0 (0)	14 (48.3)	0.02^d	50 (48.5)	19 (50)	0.57 ^e
CC	2 (4.1)	3 (9.4)	1 (4.5)	1 (11.1)	6 (20.7)		8 (7.8)	5 (13.2)	
TC+CC	28 (57.1)	20 (62.5)	13 (59.1)	1 (11.1)	20 (69)	0.045^d	58 (56.3)	24 (63.2)	0.46 ^e
<i>KRAS</i> rs61764370									
TT	41 (83.7)	29 (90.6)	20 (90.9)	7 (77.8)	26 (89.7)		90 (87.4)	33 (86.8)	
TG	8 (16.3)	3 (9.4)	2 (9.1)	2 (22.2)	3 (10.3)	0.72 ^d	13 (12.6)	5 (13.2)	>0.9 ^e

^a Soft-tissue sarcomas and osteosarcomas.

^b CNS, central nervous system.

^c Twenty-nine patients developed other tumor types, including thyroid (n=6), prostate (n=4), hematological malignancies (n=4), lung (n=3), kidney (n=2), uterine cancers (n=2), pancreas (n=2), rectum (n=2), gastric (n=1), pheochromocytoma (n=1), melanoma (n=1), and peripheral nerve sheath (n=1).

^d Fisher exact test.

^e Pearson's chi-squared test.

Table 3. Frequency distribution of LFS core and non-core tumors as the first tumor type diagnosed according to genotypes for *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs in *TP53* R337H carriers.

Genotypes	LFS core tumors^a, N (%)	Non-core tumors^b, N (%)	<i>p</i>
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723			
TT	50 (44.6)	9 (31)	
TC	55 (49.1)	14 (48.3)	0.039^c
CC	7 (6.3)	6 (20.7)	
TC+CC	62 (55.3)	20 (69)	0.18 ^c
<i>KRAS</i> rs61764370			
TT	97 (86.6)	26 (89.6)	
TG	15 (13.4)	3 (10.3)	0.661 ^c

^a Core spectrum of tumors associated with Li-Fraumeni syndrome (LFS) include breast cancer, adrenocortical carcinomas, sarcomas (soft and bone tissues), and central nervous system tumors.

^b LFS non-core tumors at first diagnosis include other twelve tumor types found in the overall sample (detailed information in Supplementary Table 1).

^c Pearson's chi-squared test.

Table S1. Clinical features of LFS patients harboring the germline founder pathogenic variant *TP53* R337H included in the present study.

Characteristics	n	%
Number of patients	267	-
<u>Gender</u>		
Female	172	64.4
<u>LFS criteria</u>		
Classic	4	1.5
Chompret (original and modified)	263	98.5
<u>Personal history of cancer</u>		
Cancer-affected	141	52.8
<u>Age of tumor onset</u>		
Median (IR ^a)	33 (38)	-
<u>Number of primary tumors diagnosed</u>		
Single	103	73.1
Multiple	38	26.9
<u>First tumor type diagnosed</u>		
Breast cancer	49	34.7
Adrenocortical carcinoma	32	22.7
Bone or soft tissue sarcoma	22	15.6
CNS tumor ^b	9	6.4
Other ^c	29	20.6

^a IR, interquartile range.

^b CNS, central nervous system.

^c Twenty-nine patients developed other tumor types at first diagnosis, including thyroid (n=6), prostate (n=4), hematological malignancies (n=4), lung (n=3), kidney (n=2), uterine cancers (n=2), pancreas (n=2), rectum (n=2), gastric (n=1), pheochromocytoma (n=1), melanoma (n=1), and peripheral nerve sheath (n=1).

Table S2. Minor allele frequency for the variants of interest *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 reported in previous studies and population databases.

Source/Population database or previous study	<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723 (T>C)			<i>KRAS</i> rs61764370 (T>G)		
	N	Homoz.	MAF	N	Homoz.	MAF
ABraOM ^a	1,171	154	0.35	1,171	13	0.083
gnomAD (Overall population)	15,668	1,697	0.33	15,690	63	0.053
gnomAD (Latino/Admixed American population)	424	18	0.23	423	1	0.050
gnomAD (European population) ^b	7,695	1,024	0.37	7,712	60	0.081
gnomAD (African/African-American population)	4,347	325	0.28	4,353	1	0.019
1000 genomes	2,504	NR	0.29	2,504	NR	0.035
Trans-Omics for Precision Medicine (TOPMED)	62,784	NR	0.33	62,784	NR	0.063
Brazilian retinoblastoma cases ^c	130	14	0.35	NA	NA	NA
Brazilian healthy subjects (controls) ^c	105	16	0.36	NA	NA	NA
Brazilian men diagnosed with SCCHN ^d	NA	NA	NA	165	1	0.094
Brazilian healthy men (controls) ^d	NA	NA	NA	230	3	0.098

N, sample number evaluated in the specific database and/or previous study; Homoz, number of variant allele homozygotes; MAF, minor allele frequency (frequency of variant allele); NR, not reported; NA, not applicable; SCCHN, squamous cell carcinoma of the head and neck. MAF in Brazilian and Latino populations is highlighted in bold letters.

^a Frequency searched in the SABE-WGS-1171(hg38) dataset. This is a Brazilian repository of whole-genome sequencing data from unrelated and healthy elderly individuals from general population of São Paulo, Brazil's largest city located in southeastern Brazil.

^b Frequency data excluding Finnish population.

^c Frequency data reported by Carvalho and colleagues (2017) in patients with hereditary and non-hereditary retinoblastoma as well as unrelated control individuals from the same Brazilian geographical region (southeastern Brazil, PMID: 28106538).

^d Case-control study performed by Santiago *et al.* (2014) including a cohort of males diagnosed with squamous cell carcinoma of the head and neck (SCCHN) from southeastern Brazil, and a control group of healthy male subjects without cancer or a family history of cancer from the same Brazilian region (PMID: 24932237).

Table S3. Age group distribution of cancer onset and genotypes for the *pri-miR-34b/c* and *KRAS* SNPs among *TP53* R337H carriers.

Genotypes	Number of patients per age groups, (%) ^a			<i>p</i> ^c
	Pediatric (0-21 yr ^b)	Early onset (22-45 yr)	Late onset (46-90 yr)	
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723				
TT	19 (45.2)	23 (45.1)	17 (37)	
TC	18 (42.9)	23 (45.1)	26 (56.5)	0.7
CC	5 (11.9)	5 (9.8)	3 (6.5)	
TC + CC	23 (54.8)	28 (54.9)	29 (63)	0.65
<i>KRAS</i> rs61764370				
TT	37 (88.1)	42 (82.4)	42 (91.3)	
TG	5 (11.9)	9 (17.6)	4 (8.7)	0.41

^a Distribution of age groups as previously reported by Hardin *et al.*, 2017 (PMID: 28827380).

^b Years.

^c Pearson's chi-squared test.

Table S4. Personal history of cancer diagnosis and genotypes for the selected SNPs in overall sample of *TP53* R337H carriers.

Genotypes	Cancer-affected, n (%)	Cancer unaffected, n (%)	<i>p</i>^a
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723			
TT	59 (41.8)	45 (35.7)	0.591
TC	69 (49)	68 (54)	
CC	13 (9.2)	13 (10.3)	
TC + CC	82 (58.2)	81 (64.3)	0.305
<i>KRAS</i> rs61764370			
TT	123 (87.2)	107 (84.9)	0.599
TG	18 (12.8)	19 (15.1)	

^a Pearson's chi-squared test.

Table S5. *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370 genotypic frequencies in *TP53* R337H carriers according to the median age at diagnosis of breast and adrenocortical tumors.

Genotypes	Median age at diagnosis		Median age at diagnosis	
	of breast cancer, years (IR ^a)	<i>p</i> ^c	of adrenocortical carcinoma, years (IR)	<i>p</i> ^c
<i>pri-miR-34b/c</i> rs4938723				
TT	39 (17)		1.5 (9)	
TC	40 (19)	0.797	1.5 (2)	0.899
CC	42.5 (NA ^b)		2 (NA)	
<i>KRAS</i> rs61764370				
TT	39 (18)		2 (4)	
TG	41 (15)	>0.9	1 (NA)	>0.9

^a IR, interquartile range.

^b NA, not applicable due to the low number of individuals diagnosed with that tumor type and exhibiting this genotype.

^c Kruskal-Wallis test.

Table S6. Clinical and molecular features of LFS patients with classical germline *TP53* pathogenic variants (DNA-binding domain mutations) included in the present study and their genotyping results for the SNPs *pri-miR-34b/c* rs4938723 and *KRAS* rs61764370.

Identifier	First tumor	Age of diagnosis (years)	Other tumors (age in years)	<i>TP53</i> Mutant Status, HGVS p.	<i>pri-miR-34b/c</i> genotype	<i>KRAS</i> Genotype
LFS-1	Bilateral breast cancer	36	Pancreas (44)	p.(Gly245Ser)	TC	TT
LFS-2	Medulloblastoma	11	No	p.(Gly245Ser)	TT	TT
LFS-3	Adrenocortical Carcinoma	44	No	p.(Glu258His)	TT	TG
LFS-4	Mandibular Sarcoma	17	Breast (29) and Sarcoma (38)	p.(Arg273His)	TC	TT
LFS-5	Breast cancer	30	Thyroid (37)	p.(Gly244Asp)	TC	TT
LFS-6	Colorectal cancer	35	Breast (40)	p.(Gly244Asp)	TC	TT

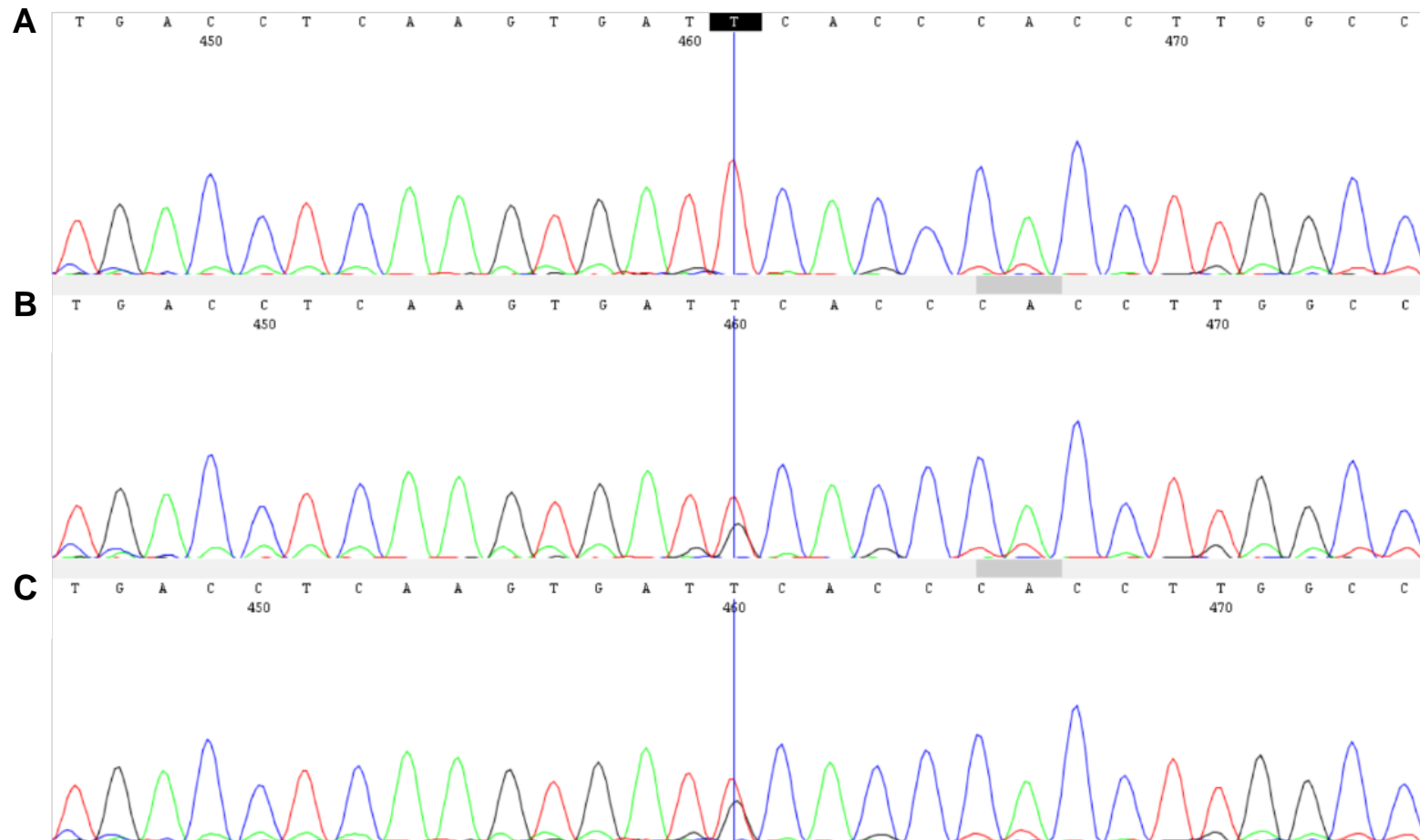


Figure S1. Direct Sanger sequencing analysis confirmed the genotypes of all SNP-positive samples for *KRAS* rs61764370 (T>G) previously identified through a custom TaqMan[®] assay. *KRAS* RefSeq DNA sequence (sense strand) corresponding to NC_000012.12 was used in this alignment as a wild-type (WT) reference. **(A)** LFS patient exhibiting WT T-allele homozygous; **(B)** and **(C)** LFS probands with heterozygous genotype rs61764370[T/G] confirmed by Sanger sequencing.

A

Human TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Bonobo TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Chimpanzee TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Gorilla TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Orangutan TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Gibbon TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Sooty mangabey TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Drill TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Olive baboon TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Gelada TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Crab-eating macaque TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Macaque TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Pig-tailed macaque TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Vervet-AGM TTTGATCTAT----TACAGCTCTCA
 Angola colobus TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Ugandan red Colobus TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Black snub-nosed monkey TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Golden snub-nosed monkey TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Ma's night monkey TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Marmoset TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Capuchin TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Bolivian squirrel monkey TTTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Tarsier TCTGACCGAC----TACAGCTCTCA
 Mouse Lemur TCTGACCTATTTTATACAGCTCTCA
 Greater bamboo lemur TCTGACCTAT----TACAGCTCTCA
 Coquerel's sifaka TCTGACCTAT----TATGGCTCTCA
 Bushbaby CTGGGCCTAT----TATAGCTCTCA

B

Human TTCCACCCACTTAGTGAACTC
 Bonobo TTCCGTCCACTTGGTGAACTC
 Chimpanzee TTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Gorilla TTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Gibbon TTCTGCCACCTTAGTGAACTC
 Sooty mangabey CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Drill CTCCGTCCACTTAGTGAACTC
 Olive baboon CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Crab-eating macaque CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Macaque CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Pig-tailed macaque CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Vervet-AGM CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Angola colobus TTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Ugandan red Colobus TTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Black snub-nosed monkey CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Golden snub-nosed monkey CTCCGCCACCTTAGTGAACTC
 Ma's night monkey CTCCGCCCGTTTAGTGAACTC
 Capuchin CTCCGCCCGTTTAGTGAACTC
 Bolivian squirrel monkey CTCCGCCCGTTTAGTGAACTC
 Tarsier -----AA

Figure S2. Comparison of genomic sequences encompassing regions of the germline SNPs **(A)** *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C) and **(B)** *KRAS* rs61764370 (T>G) across 27 primate species. Although there were some sequence variations (indels), none of the included species exhibited the rs4938723[C] and rs61764370[G] variant alleles, suggesting that these regions are evolutionarily conserved. Figure extracted from the phylogenetic context tool from Ensembl database.

Capítulo VIII – Resultados adicionais

Updated analysis of the p53 pathway regulation by miRNAs

Manuscrito em preparação

Igor Araujo Vieira, Mariana Recamonde-Mendoza, Eduarda Heidrich Pezzi,
Gabriel de Souza Macedo, Patricia Ashton-Prolla

8.1. Introdução

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, é um fator de transcrição amplamente conhecido, atuando na ativação ou repressão transcricional direta ou indireta de genes-alvo (Levine, 1989, 2020). Em resposta às diferentes formas de estresse celular, p53 regula uma gama de genes envolvidos em suas funções supressoras de tumor, bem como sua expressão e atividade são moduladas por reguladores críticos que fazem parte da via de p53, tais como MDM2, MDM4 e USP7 (HAUSP) (Beckerman e Prives, 2010; Brooks et al., 2007; Perry, 2010). Além destes, os microRNAs (miRNAs), pequenos RNAs não codificantes de fita simples (~23 nucleotídeos de tamanho) que atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica, exercem um papel importante na regulação fina da atividade de p53 (Bartel, 2004; Hermeking, 2012).

A primeira rede de regulação de p53 por miRNAs, contendo dados de interação entre um conjunto limitado de miRNAs e a região 3'UTR dos transcritos *TP53* (mecanismo de regulação direta) e daqueles derivados de outros genes inibidores da sua atividade (*MDM2*, *MDM4*, entre outros; mecanismo de regulação indireta), foi descrita por Hermeking em 2012. Essa rede apresentava 10 genes da via de p53 (incluindo *TP53*), 16 famílias de miRNAs e 18 interações miRNA-alvo comprovadas por diferentes ensaios funcionais (Hermeking, 2012). Em 2017, dois estudos independentes forneceram uma atualização do conhecimento sobre o controle da expressão da via de p53 por um número maior de miRNAs, focando em interações validadas experimentalmente e reportadas na literatura (Goeman et al., 2017; Liu et al., 2017). Desde então, nenhum estudo com contribuição significativa acerca dessa rede de regulação tem sido publicado. Por outro lado, o número de miRNAs descritos em humanos tem crescido significativamente nos últimos anos. Em 2013, a principal base de dados de miRNAs (*miRBase*, <http://www.mirbase.org/>) contabilizava 2578 diferentes miRNAs maduros em humanos (versão 20.0), sendo que esse número aumentou para 2654 na sua última atualização em 2018 (versão 22.1). De modo similar, também tem sido observado um aumento na quantidade de interações miRNA-alvo preditas computacionalmente e validadas experimentalmente em humanos (Kozomara e Griffiths-Jones, 2014; Kozomara et al., 2019). Nesse

contexto, o objetivo do presente estudo foi atualizar a rede de miRNAs envolvida na regulação da via de p53.

8.2. Metodologia

A rede atualizada foi gerada através da combinação de ferramentas de bioinformática, bancos de dados públicos e descrições anteriores na literatura acerca dos tipos de interação gene-gene que compõem a via de p53 (regulação positiva ou negativa). As interações miRNA-alvo validadas experimentalmente foram coletadas dos bancos de dados mirTarBase *release 6.1* (Chou et al., 2016) e Tarbase *v8.0* (Sethupathy et al., 2006), aplicando-se os seguintes filtros para obtenção de evidências experimentais de alta qualidade: (a) para dados do mirTarBase, apenas interações classificadas como funcionais (“MTI”) foram mantidas; e (b) para dados do Tarbase, as interações foram filtradas baseando-se no resultado do experimento (apenas interações “positivas”), tipo de associação (apenas interações “diretas”) e tipo de regulação (apenas “modulação negativa/*downregulation*” do gene alvo pelo miRNA). Além disso, as interações do TarBase comprovadas somente por experimentos considerados como “evidências limitadas” (i.e., HITS-CLIP e PAR-CLIP) foram mantidas apenas se o número total de experimentos comprovando a interação fosse ≥ 4 .

Também foram coletadas interações a partir dos algoritmos de predição TargetScan *v7.1* (Agarwal et al., 2015) e miRanda-mirSVR (*August 2010 Release*) (Betel et al., 2010). A lista completa de interações miRNA-alvo preditas por cada algoritmo foi filtrada usando *scripts in-house* na plataforma R para extrair apenas interações entre miRNAs e genes-alvo da via de p53. Em seguida, para controlar a taxa de falso-positivos, ambas listas (i.e., predições do TargetScan e mirSVR) foram filtradas para manter apenas interações com *score* dentro do percentil 25% (mais fidedignas), e a intersecção entre as predições resultantes foi adotada como o conjunto final de interações miRNA-alvo preditas.

Embora alguns miRNAs não tenham uma classificação em família, quando possível, os miRNAs foram agrupados em famílias de acordo com as anotações do *miRBase* (versão 22.1) (Kozomara et al., 2019). Para a construção e visualização da rede foi utilizado o software *Cytoscape version 3.7.2* (Shannon et al., 2003).

8.3. Resultados parciais e discussão preliminar

Um total de 238 interações miRNA-alvo com validação experimental e 473 interações derivadas de predição computacional foram extraídas a partir dos diferentes bancos de dados e ferramentas utilizados (**Figura 1**). Conforme mostrado na **Figura 2**, uma rede atualizada de regulação mediada por miRNAs, centrada em p53 e seus interatores conhecidos, foi obtida contendo 26 genes codificadores de proteínas envolvidas na via de p53, incluindo o próprio gene *TP53*, e todas as interações miRNA-alvo validadas experimentalmente que foram filtradas a partir das nossas análises (n= 238 interações).

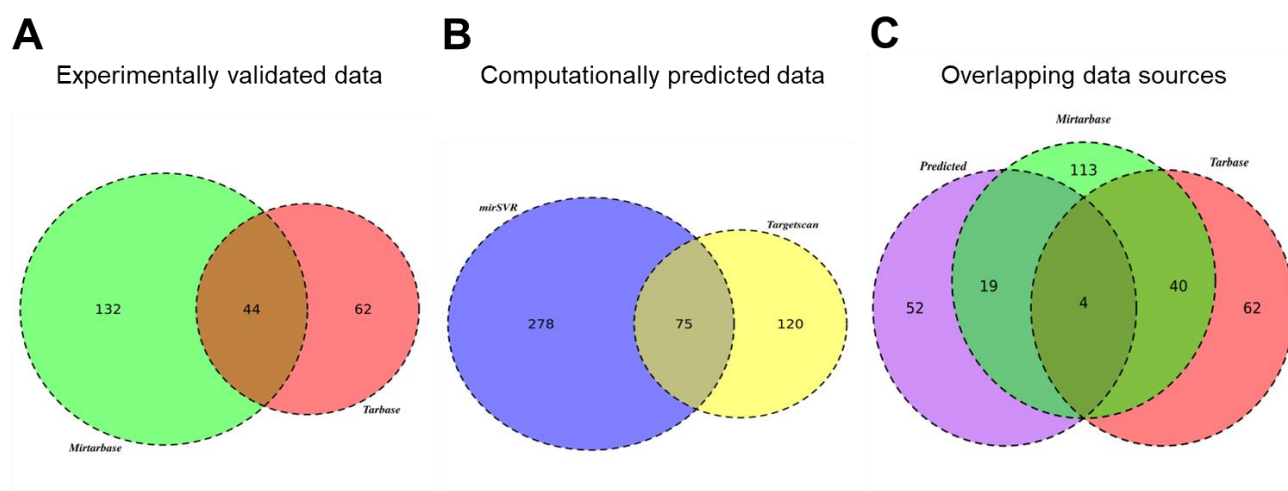


Figura 1. Diagramas de Venn das interações miRNAs-alvo extraídas a partir dos bancos de dados com validação experimental (A) e predição computacional (B), bem como a sobreposição dos dados das diferentes fontes (C). **Figura da versão do manuscrito em inglês.**

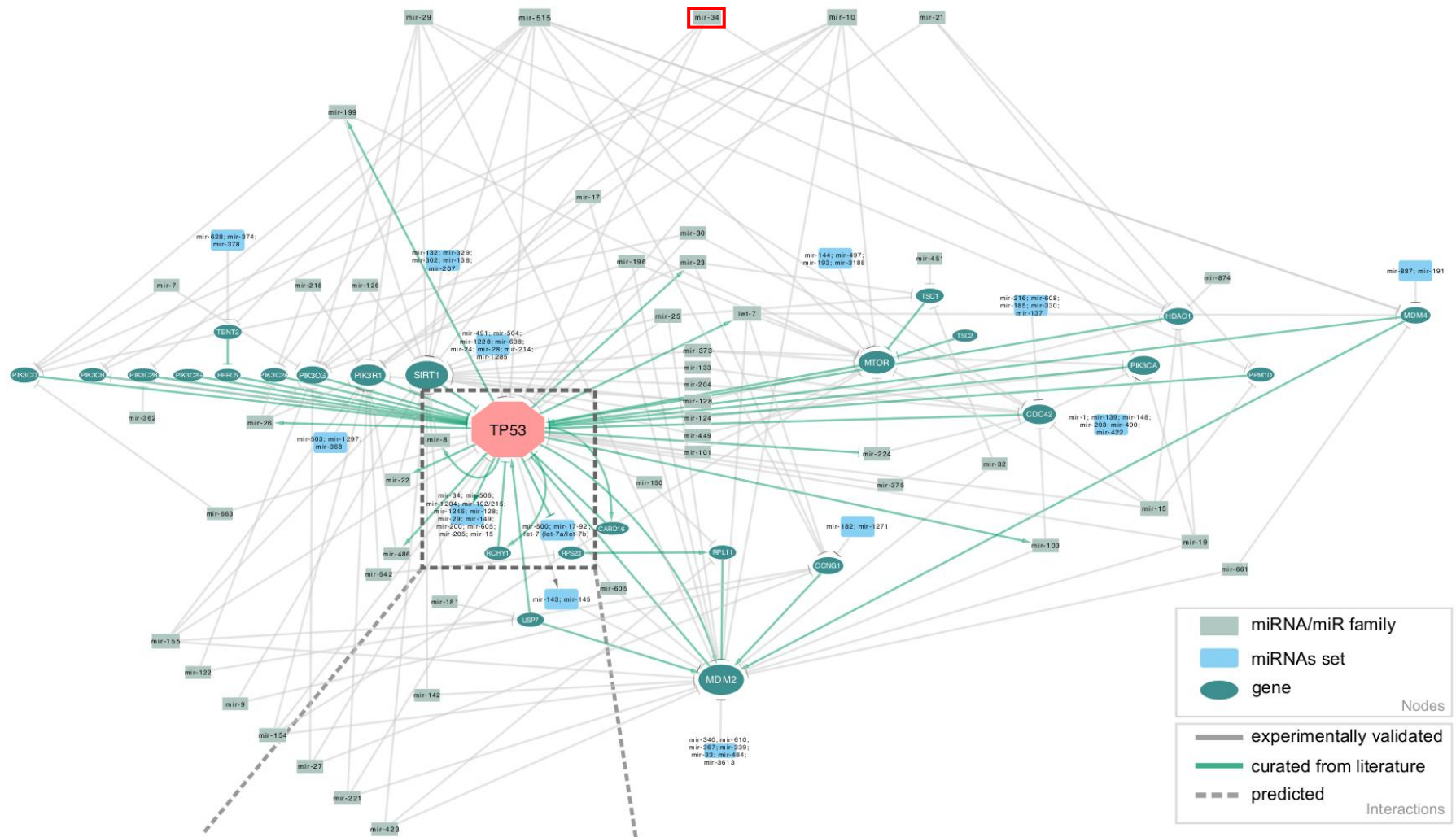


Figura 2. Rede atualizada da regulação dos genes da via de p53 por miRNAs, considerando apenas as interações miRNAs-alvo validadas experimentalmente. A família miR-34 aparece destacada em vermelho. **Figura da versão do manuscrito em inglês.**

A partir de dados coletados na literatura (Goeman et al., 2017; Liu et al., 2017), também foi gerada uma representação atualizada do conjunto de miRNAs cuja expressão é regulada por p53 em humanos (**Figura 3a**, página seguinte). Ainda, foi construída uma rede simplificada (**Figura 3B**) contendo somente as interações miRNAs-alvo preditas computacionalmente pelos dois algoritmos aqui empregados (TargetScan e mirSVR) e que não apresentavam sobreposição com os dados validados mostrados na **Figura 2** (n= 52).

miR-34 consiste em uma família de miRNAs que se destacou pelo seu papel central na rede atualizada de regulação da via de p53 por miRNAs gerada neste estudo (**Figura 2**), bem como pela existência de estudos funcionais e clínicos prévios demonstrando suas funções supressoras de tumor e sua relevância como potencial alvo terapêutico em câncer (Hong et al., 2020; Zhang et al., 2019). Esta família atua como um importante regulador positivo dos níveis de expressão e função de p53 (Okada et al., 2014). A expressão de todos os membros da família miR-34 (miR-34a, -34b e -34c) pode ser induzida por p53 em resposta a estresse genotóxico, assim como alguns membros, especialmente miR-34a, regulam negativamente a expressão de inibidores críticos da atividade de p53, tais como MDM4, SIRT1 e HDAC1 (Bommer et al., 2007; He et al., 2007; Hermeking, 2012; Navarro e Lieberman, 2015). Adicionalmente, estudos caso-controle em diferentes populações têm mostrado que SNPs funcionais localizados no gene codificador de miR-34a (rs35301225 e rs72631823) e na unidade transcricional *pri-miR-34b/c* (rs4938723) estão associados com suscetibilidade a vários tipos de tumores, incluindo osteossarcoma, carcinoma hepatocelular, cânceres de tireoide, cólon, próstata e mama triplo-negativo (Hashemi et al., 2017, 2019; Heidari et al., 2019; Jiang et al., 2017; Kalapanida et al., 2018; Lv et al., 2014; Wang et al., 2014; Xu et al., 2011).

As próximas etapas a serem realizadas para conclusão deste estudo serão: (1) avaliar com uma maior profundidade todos os genes-alvo da família miR-34 validados experimentalmente e as vias biológicas relacionadas, independentemente de pertencerem à via de p53 ou não, através de uma abordagem de biologia de sistemas e de análises de enriquecimento funcional (*KEGG Pathway Database*); (2) investigar a conservação evolutiva da sequência dos genes da família miR-34 em diferentes espécies de mamíferos; e (3) mapear

as variantes funcionais nesses genes (miRSNPs) que potencialmente afetam o mecanismo de regulação indireta da expressão de p53.

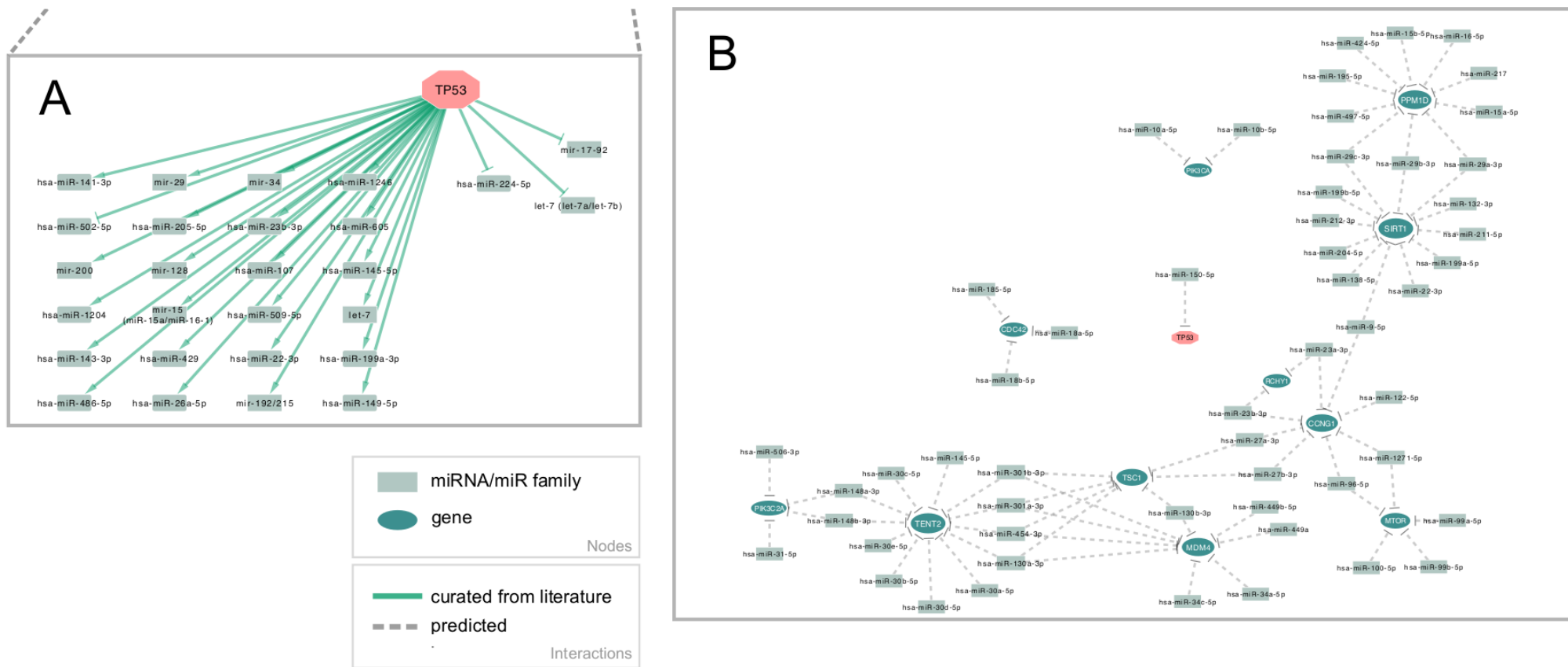


Figura 3. Representação atualizada dos **(A)** miRNAs cuja expressão é induzida ou reprimida por p53, e **(B)** rede atualizada da regulação da via de p53 por miRNAs contendo somente as interações miRNA-alvo previstas computacionalmente. **Figura da versão do manuscrito em inglês.**

A discussão específica e completa referente aos resultados obtidos nos diferentes estudos que compõem essa tese encontra-se em cada um dos manuscritos e na seção de Resultados adicionais (**Capítulos IV-VIII**). Neste capítulo, dividido em duas partes conforme os objetivos gerais da tese, serão mencionados aspectos mais gerais referentes ao tema e comparações com achados de estudos anteriores. Ainda, serão abordadas perguntas e hipóteses de pesquisa suscitadas pelos resultados encontrados, porém não discutidas anteriormente.

9.1. Prevalência das variantes funcionais em TP53 rs121912664 (R337H, éxon 10) e rs7837822 (3'UTR) em coortes de pacientes com diferentes tipos de tumores

No **Capítulo IV**, a prevalência da variante fundadora patogênica TP53 p.(Arg337His) ou R337H foi determinada em amostras de adenocarcinoma de pulmão (DNA do tecido tumoral) obtidas de pacientes da região Sul do Brasil, sendo observada uma prevalência de portadores da variante consideravelmente menor (1,2%) em comparação com aquela reportada em estudos realizados nas regiões Sudeste e Central do Brasil (2,4 e 8,9%, respectivamente) (Barbosa et al., 2020; Couto et al., 2017). Essa prevalência de R337H também é muito menor quando comparada à maioria dos dados previamente descritos em coortes de pacientes brasileiros diagnosticados com diferentes tipos de tumores e não selecionados por história familiar de câncer. É importante ressaltar que, embora em nosso estudo limitações na disponibilidade e condições das amostras de DNA impediram a análise por sequenciamento de nova geração para determinação das frequências do alelo variante R337H em alguns tumores positivos para a variante inicialmente identificados pelos ensaios *TaqMan*[®] (n= 7, análise somática), provavelmente todos estes casos positivos são na verdade germinativos, uma vez que existem evidências consistentes de que a ocorrência somática desta variante é muito rara, sendo reportada como ausente ou próxima de zero em diferentes bancos de dados públicos (COSMIC, 2020; IARC TP53 database, 2019).

As prevalências mais altas de R337H têm sido descritas em coortes de carcinoma adrenocortical nas regiões Sul e Sudeste (90-97%), sendo que este é um tumor característico (“*core tumor*”) da SLF e muitos portadores da variante encontrados nestes estudos foram posteriormente identificados com outros casos de câncer na família (Mastellaro et al., 2018; Ribeiro et al., 2001). Enquanto que prevalências menores dessa variante foram reportadas em dois estudos recentes: (a) um estudo envolvendo casos de câncer de mama caracterizados como esporádicos da região Sul (2,36%, restrito ao estado do Paraná), sendo este o tipo de tumor mais frequente em famílias SLF (Mathias et al., 2020); e (b) o nosso estudo incluindo casos de adenocarcinoma de pulmão da região Sul (1,2%, abrangendo todos os estados da região). Em conjunto, esses achados corroboram o fato de que esta é uma variante fundadora que contribui para uma parcela significativa dos casos de câncer no Brasil, principalmente nas regiões Sul e Sudeste. Além disso, eles sugerem que a frequência de portadores pode ser menor em coortes de pacientes não selecionados diagnosticados com tumores não-centrais do espectro da SLF (conforme observado em nosso estudo de adenocarcinoma de pulmão) ou com tumores sabidamente esporádicos (casos selecionados pela ausência de história familiar de câncer), ainda que sejam tipos de tumores comumente encontrados em famílias SLF (exemplo do estudo com câncer de mama esporádico no Paraná) (Mathias et al., 2020).

Por outro lado, tem sido reportado que portadores de R337H tendem a apresentar um padrão de ocorrência de câncer ao longo da vida marcado pela presença de dois picos de idade ao diagnóstico, um na infância e outro na fase adulta avançada, sendo este segundo pico caracterizado pelo desenvolvimento de vários tipos tumorais, incluindo tumores não-centrais da SLF, tais como tumores gastrointestinais, de próstata e pulmão (Mastellaro et al., 2017). Sendo assim, mostra-se relevante que investigações futuras avaliem a prevalência desta variante em coortes de pacientes brasileiros com tumores gastrointestinais (estômago, intestino e colorretal) e de próstata não selecionados pela idade ao diagnóstico e história familiar de câncer, ou sabidamente esporádicos.

No **Capítulo V**, uma prevalência germinativa ou somática baixa ($\leq 1\%$) de portadores da variante do sinal de poliadenilação (PAS) de *TP53* (rs78378222 A>C) foi encontrada em coortes de pacientes com adenocarcinomas de pulmão

e próstata e leiomioma uterino, provenientes da região Sul do Brasil. Esse achado é similar à frequência de portadores da variante identificada no grupo controle de um estudo anterior do nosso grupo (1%), composto por mulheres da mesma região do país sem história pessoal e familiar de câncer, previamente submetidas a um programa de rastreamento mamográfico e que não apresentavam nenhuma evidência e/ou suspeita clínica de câncer de mama (Macedo et al., 2016). Nesse sentido, a estimativa de frequência dessa variante funcional em controles da região ainda necessita de uma amostragem mais robusta e com distribuição proporcional entre ambos os sexos. Curiosamente, até o momento, na população brasileira, a maior frequência de portadores da variante rs78378222 (5,4%) foi detectada nesse mesmo estudo em um grupo de pacientes com fenótipo clínico da SLF sem variantes germinativas patogênicas identificadas nas regiões codificantes de *TP53*. Todos os pacientes SLF portadores da variante em questão apresentavam diagnóstico prévio de tumores centrais da síndrome (Macedo et al., 2016). Em populações europeias, rs78378222[C] apresenta uma frequência elevada (~2-4%) em coortes de pacientes com vários tipos de tumores sólidos, incluindo sarcomas, glioma e neuroblastoma (tumores cerebrais), sendo descrita como um alelo de risco para estes tumores (Deng et al., 2019; Diskin et al., 2014; Di Giovannantonio et al., 2021; Stacey et al., 2011). No entanto, existe uma escassez de dados sobre a frequência e o impacto da variante em tumores hematológicos, havendo apenas uma descrição em um subtipo específico de linfoma, no qual a frequência de portadores foi de 1,5% (Li et al., 2013). Nesse contexto, torna-se interessante avaliar a prevalência dessa variante do PAS de *TP53* em um maior número de indivíduos controles e em coortes de pacientes brasileiros com sarcomas, carcinoma adrenocortical e tumores cerebrais (tumores característicos da SLF), não selecionados pela história familiar de câncer, bem como em pacientes de diferentes populações diagnosticados com neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas e mieloma múltiplo).

Além disso, é importante salientar que a variante funcional *TP53* rs78378222 está localizada na 3'UTR, uma região não-codificante do gene frequentemente negligenciada na rotina de diagnóstico molecular (Diederichs et al., 2016; IARC, 2014; Li et al., 2013). Poucos estudos incluem a análise completa dessa região nos protocolos de sequenciamento. Um exemplo que se

destaca é o estudo citado anteriormente de Li e colaboradores (2013), no qual demonstrou-se que as variações de sequência na 3'UTR de *TP53* podem apresentar valor prognóstico em pacientes com neoplasias hematológicas, especificamente em casos de linfoma. Atualmente, o diagnóstico molecular de pacientes que preenchem critérios clínicos para SLF concentra-se principalmente no rastreamento de VGP nos éxons 2-11 e nas junções éxon-íntron de *TP53* (Leroy et al., 2017). Considerando os achados anteriores do nosso grupo acerca do papel dessa variante na SLF (Macedo et al., 2016), torna-se relevante mapear as variantes na 3'UTR de *TP53* em uma série de casos preenchendo critérios clínicos para SLF com e sem VGP identificadas nas regiões classicamente analisadas do gene, visando identificar variações de sequência com impacto funcional em sítios para ligação de miRNAs e/ou elementos regulatórios de poliadenilação.

9.2. Estudos de modificadores de fenótipo da SLF e da regulação da via de p53 por miRNAs

A penetrância de VGP em *TP53* é variável, dependendo tanto da localização e tipo da variante (variantes com efeito dominante negativo sendo associadas com um alto risco de câncer) quanto de fatores que modificam a função de p53mut (genéticos, epigenéticos e/ou ambientais), o que justifica a grande diversidade inter- e intrafamiliar das manifestações clínicas na SLF (Amadou et al., 2018; Bougeard et al., 2008; Frebourg et al., 2020). Em especial, indivíduos brasileiros portadores da variante germinativa fundadora *TP53* R337H, que apresenta penetrância reduzida, apresentam uma heterogeneidade clínica marcante, sugerindo que alterações genéticas e/ou epigenéticas em genes modificadores possam desempenhar um papel importante na modulação do fenótipo destes indivíduos (Achatz e Zambetti, 2016; Achatz et al., 2007; Pinto e Zambetti, 2020).

Em 2015, análises de sequenciamento de exoma e genoma completo em tumores adrenocorticais pediátricos positivos para a variante fundadora R337H mostraram que todos estes casos compartilhavam uma sequência idêntica do gene *TP53* (localização cromossômica: 17p13.1), contendo o alelo não-duplicado para o polimorfismo PIN3 (alelo A1, rs17878362) e o alelo que codifica

o aminoácido arginina no códon 72 (SNP p.Pro72Arg, rs1042522) (Pinto et al., 2015). Mais recentemente, o mesmo grupo de pesquisa que conduziu essas análises também identificou haplótipos estendidos (incluindo uma região mais abrangente no braço curto do cromossomo 17) e divergentes entre portadores de R337H. Foi verificado que a maioria dos indivíduos brasileiros apresentando esse alelo fundador (~70-80%) também eram portadores de uma variante germinativa sem sentido (*nonsense*) no gene supressor de tumor *XAF1* (E134*/Glu134Ter/rs146752602), a qual possui uma frequência alélica na população geral brasileira estimada em 0,4%. Este estudo incluiu a maior coorte de indivíduos positivos para R337H estudada até o momento, e o seu principal achado consistiu em observar que a cosegregação dos alelos mutantes *XAF1* E134* e *TP53* R337H contribui para um fenótipo de câncer mais agressivo do que a presença do alelo R337H sozinho, conferindo um risco significativamente aumentado para desenvolvimento de sarcoma e de outros tumores subsequentes ao longo da vida. Sendo assim, a variante *XAF1* E134* se destacou pela atuação como um modificador de fenótipo com o maior tamanho de efeito já descrito em portadores da variante *TP53* R337H, especificamente associado com o risco de câncer, os padrões de tipos tumorais exibidos e o número de tumores primários diagnosticados nestes pacientes (Pinto et al., 2020).

Nesse contexto, outros fatores genéticos que podem modificar a função de p53mut têm sido explorados em estudos recentes, tais como SNPs em genes codificadores de miRNAs (miRSNPs) que atuam como reguladores diretos e indiretos da expressão de p53 (Hermeking, 2012; Id Said e Malkin, 2015; Liu et al., 2017). Sabe-se que a presença de miRSNPs funcionais localizados em regiões regulatórias dos genes de miRNAs pode alterar a expressão dos miRNAs maduros correspondentes e, subsequentemente, afetar a expressão de centenas de genes-alvo envolvidos em uma variedade de funções biológicas (Ryan, 2017; Ryan et al., 2010).

Em relação aos dois estudos de modificadores de fenótipo da SLF que fazem parte desta tese, focamos na análise de miRSNPs relacionados a duas famílias de miRNAs que atuam como reguladores indiretos da atividade de p53: (a) miR-605 (**Capítulo VI**), baseando-se em um estudo anterior que avaliou um miRSNP funcional na sequência desse miRNA em famílias SLF canadenses (Id

Said e Malkin, 2015); e (b) miR-34 (**Capítulo VII**), selecionada a partir de evidências funcionais na literatura e da identificação do seu papel central como reguladora positiva de p53 na rede atualizada (regulação de p53 por miRNAs) obtida no **Capítulo VIII**. Ademais, é importante enfatizar que um dos principais aspectos positivos dos nossos estudos de modificadores de fenótipo consiste na homogeneidade do *background* genético dos casos analisados, uma vez que a maioria dos pacientes SLF eram portadores da mesma alteração fundadora patogênica em *TP53* (R337H). Ambos os estudos foram os primeiros a explorar o papel de miRSNPs como potenciais modificadores de fenótipo em pacientes com essa variante fundadora brasileira.

No **Capítulo VI**, investigamos o papel do único miRSNP anteriormente estudado como potencial modificador de fenótipo da SLF: *MIR605* rs2043556 (A>G) (Id Said e Malkin, 2015). Trata-se de uma variante comum (MAF= 0,25) que diminui em cerca de 3 vezes a eficiência de processamento de miR-605, um miRNA que, em resposta a diferentes tipos de estresse celular, tais como dano ao DNA e ativação de oncogenes, forma uma alça de *feedback* positivo juntamente com p53 e MDM2 (Id Said e Malkin, 2015; Xiao et al., 2011). Previamente descrito como um alelo de risco para diferentes tipos de câncer (Hu et al., 2014; Mw et al., 2012), em um estudo realizado na população canadense, o alelo variante rs2043556[G] foi associado com uma aceleração de 10 anos na média de idade de manifestação do primeiro tumor em famílias SLF portadoras de VGP no DBD de p53 (Id Said e Malkin, 2015). Em nosso estudo envolvendo indivíduos brasileiros portadores da variante fundadora *TP53* R337H, esse miRSNP apresentou um efeito modificador em outro tipo de manifestação clínica: o genótipo rs2043556[G/G] foi associado com o desenvolvimento de múltiplos tumores primários nestes indivíduos.

No **Capítulo VII**, além do SNP funcional de superexpressão de *KRAS* (rs61764370) que não apresentou associação com nenhuma variável clínica analisada (Chin et al., 2008), avaliamos o miRSNP funcional *pri-miR-34b/c* rs4938723 (T>C) como um potencial modificador de fenótipo da SLF. O alelo variante rs4938723[C] está localizado na região promotora de um gene pertencente à família miR-34 (discutida em maiores detalhes no parágrafo a seguir), sendo que a sua presença aumenta a atividade transcricional desse promotor ao criar um sítio de ligação para o fator de transcrição GATA-X, levando

a maiores níveis de expressão de miR-34b/c maduro (Tong et al., 2016; Xu et al., 2011; Yu, 2017). Dentre os principais achados do nosso estudo, verificou-se que o genótipo rs4938723[C/C] foi associado com o desenvolvimento de tumores não-centrais da SLF (primeiro tipo de tumor diagnosticado) em portadores da variante R337H, tais como neoplasias de tireoide e próstata. Estudos prévios descreveram rs4938723[C] como um alelo de risco para estes mesmos tipos tumorais, porém em uma ocorrência esporádica (Chen et al., 2015; Hashemi et al., 2017, 2019; Heidari et al., 2019). Ao nosso conhecimento, esse é o primeiro estudo a reportar uma associação significativa entre uma variante funcional comum (MAF= 0,33) situada em uma sequência gênica de pri-miRNA e os tipos de tumores diagnosticados em portadores de R337H.

No **Capítulo VIII**, as estratégias de bioinformática empregadas, aliadas à busca de dados funcionais e clínicos na literatura, demonstraram ser adequadas para a construção e interpretação de uma rede atualizada envolvendo genes da via de p53 e a regulação por miRNAs. Nessa rede, miR-34 destacou-se como uma família de miRNAs supressora de tumor, cuja transcrição é diretamente induzida por p53 em resposta a estresse genotóxico, atuando para promover a parada de ciclo celular ou apoptose (Navarro e Lieberman, 2015). Essa família compreende três miRNAs processados que são codificados por dois miRNAs primários diferentes: miR-34a é codificado pelo seu próprio transcrito derivado do gene *MIR34A*, enquanto miR-34b e miR-34c compartilham um transcrito primário comum (*pri-miR-34b/c*). As regiões promotoras de ambos os transcritos contêm sítios de ligação para p53 (Bommer et al., 2007; He et al., 2007). miR-34a apresenta um efeito positivo na estabilidade e atividade de p53 ao modular negativamente a expressão de genes reguladores negativos dessa proteína (Okada et al., 2014). Curiosamente, estudos pré-clínicos e ensaios clínicos de fase I recentes tem testado uma nova estratégia para tratamento de pacientes com tumores sólidos em estágio avançado baseada na reposição de miR-34, utilizando a droga lipossômica MRX34. Essa droga é constituída por moléculas que mimetizam a estrutura e função de miR-34, demonstrando sua importância como potencial alvo terapêutico (Beg et al., 2017; Hong et al., 2020; Zhang et al., 2019).

Por outro lado, uma análise integrativa de dados epigenéticos indicou que a família miR-34 é comumente silenciada por metilação de DNA em muitos tipos

tumorais (Strmsek e Kunej, 2014). Em concordância com este achado, recentemente, análises globais de metilação no genoma de pacientes SLF oriundos de diferentes populações e portadores de diferentes VGP em *TP53*, utilizando amostras de DNA extraído tanto de sangue periférico quanto de tecido tumoral, identificaram uma desregulação epigenética no gene que codifica miR-34a (*MIR34A*). Na linhagem germinativa foi detectada uma hipometilação no promotor de *MIR34A* em pacientes LFS positivos para VGP em *TP53*, quando comparados aos controles sem mutação, enquanto o mesmo promotor foi inativado por hipermetilação em tumores primários de casos SLF. Essa hipermetilação de *MIR34A* em tecido tumoral foi associada com uma diminuição na sobrevida global em uma coorte de pacientes com carcinoma de plexo coróide, tumor característico da síndrome (Samuel et al., 2016). Sendo assim, torna-se pertinente aplicar as mesmas metodologias para análise germinativa e somática dos níveis de metilação no promotor de *MIR34A* em pacientes SLF com VGP identificadas em *TP53* provenientes da região Sul do Brasil, bem como avaliar o impacto dessas alterações epigenéticas nos desfechos clínicos destes pacientes.

Embora os estudos de modificadores de fenótipo da SLF que compõem essa tese tenham focado nas famílias miR-605 e miR-34, é importante destacar que a rede atualizada apresentada no **Capítulo VIII** nos permitiu a identificação de outros genes candidatos de miRNAs com variantes funcionais previamente descritas em associação com câncer, como, por exemplo, *pri-miR-124-1* rs531564 (G>C). O miRNA miR-124-1 (ou miR-124-3p) foi apontado como um dos reguladores indiretos de p53, apresentando interações experimentalmente validadas com os transcritos associados à SIRT1 e PI3K, duas proteínas inibidoras da atividade de p53. Ensaio funcionais mostraram que o alelo variante *pri-miR-124-1* rs531564[C], localizado na região do gene codificador de miR-124-1 contendo a sequência do transcrito primário (pri-miRNA), quando em heterozigose, altera a estrutura secundária do pri-miRNA e leva a maiores níveis de expressão do miRNA maduro (Li et al., 2017; Qi et al., 2012). Esse miRSNP já foi descrito como um fator de risco ou proteção para alguns tipos de neoplasias, incluindo tumores gástricos, de esôfago e cérvix uterina (Chuanyin et al., 2017; Mirnoori et al., 2018; Zhang et al., 2014).

Além disso, o panorama atual de entendimento dos modificadores de fenótipo da SLF ainda carece de uma visão mais ampla acerca do papel dos miRNAs. Nesse sentido, seria interessante estudar SNPs em genes envolvidos na maquinaria de biogênese e processamento de miRNAs, uma vez que esses genes regulam os níveis globais de expressão dos miRNAs na célula (Lin e Gregory, 2015; Ryan et al., 2010). Algumas variantes funcionais encontradas nesses genes têm sido associadas com risco a tumores característicos da SLF e/ou câncer em geral, tais como *DICER1* rs1057035, *DROSHA* rs78393591 e *DGCR8* rs417309 (He et al., 2016; Qian et al., 2016; Wen et al., 2018). Essa análise torna-se ainda mais relevante pelo fato de que p53wt e p53mut são capazes de regular a transcrição de genes associados a essa maquinaria proteica, tais como p68 (DDX5) e AGO2 (Lin e Gregory, 2015; Liu et al., 2017).

Por fim, a influência de diferentes combinações de polimorfismos modificadores de fenótipo, em especial aqueles previamente associados com manifestações clínicas na SLF (*TP53* rs1042522 [p.Pro72Arg] e rs17878362 [PIN3], *MDM2* rs2279744 [SNP309], *MIR605* rs2043556, e *XAF1* rs146752602), provavelmente contribui de maneira significativa para o amplo espectro de diferentes suscetibilidades que caracterizam a doença (Bougeard et al., 2015; Malkin, 2011). Com a finalidade de estimar o “tamanho do efeito” de cada uma dessas combinações, será necessário, em um primeiro momento, explorarmos o efeito de interações SNP-SNP no padrão das manifestações clínicas observadas em pacientes SLF. Em um passo seguinte, seria muito interessante a possibilidade de elaboração e validação de um *score* poligênico para efeito modificador de fenótipo na síndrome, especialmente no caso dos portadores da variante fundadora *TP53* R337H que apresentam grande variabilidade fenotípica. Portanto, a identificação de biomarcadores úteis para o monitoramento clínico futuro de pacientes SLF exigirá uma compreensão mais profunda e completa de todos os eventos modificadores da função de p53.

Capítulo X – Conclusões e Perspectivas

Considerando os objetivos do presente estudo e os respectivos resultados encontrados, é possível concluir que:

- a) A prevalência de portadores da variante patogênica *TP53* p.(Arg337His), também conhecida como R337H, em amostras de adenocarcinoma de pulmão (análise somática) de pacientes diagnosticados na região Sul do Brasil é maior do que aquela reportada na população geral (1,2 vs. ~0,3%), porém é consideravelmente menor que as prevalências descritas anteriormente em séries de casos das regiões Sudeste (SP) e Central (MG) do Brasil, sugerindo que podem existir variações regionais na frequência desta variante fundadora;
- b) Considerando a variabilidade observada até o momento, bem como a ausência de grandes estudos para determinação da prevalência em diferentes regiões do Brasil e de análises detalhadas de custo-efetividade, atualmente, não seria justificável uma recomendação geral de testagem da VGP *TP53* R337H em todos os pacientes brasileiros com adenocarcinoma de pulmão;
- c) A prevalência de portadores da variante germinativa do PAS de *TP53* (rs78378222) é baixa em coortes de pacientes diagnosticados com adenocarcinoma de pulmão (análise somática), adenocarcinoma de próstata e hiperplasia prostática benigna (análise germinativa) provenientes da região Sul do Brasil, variando de 0,6 a 1,02%; além disso, o alelo variante rs78378222[C] não foi identificado em nenhuma das pacientes da pequena série de casos de leiomioma uterino analisada (n=41);
- d) Os achados de prevalência da variante rs78378222 obtidos em nosso estudo sugerem que essa alteração de sequência funcional em *TP53* não parece desempenhar um papel determinante na ocorrência dos tipos tumorais aqui analisados na população do Sul do Brasil;
- e) A utilização de ferramentas de bioinformática e bancos de dados públicos, juntamente com a busca por evidências funcionais e clínicas na literatura, demonstrou ser uma estratégia adequada para a elaboração de uma rede atualizada de regulação da via de p53 por miRNAs, sendo gerada em nosso

estudo uma rede contendo 26 genes da via, incluindo o próprio gene *TP53*, e 238 interações miRNA-alvo validadas experimentalmente;

- f) Nessa rede atualizada envolvendo a regulação dos genes da via de p53 por miRNAs, a família miR-34 apresentou um papel central como reguladora positiva da atividade de p53, através da modulação negativa da expressão de várias proteínas inibidoras de p53, tais como MDM4, SIRT1 e HDAC1, o que corroborou descrições prévias em ensaios funcionais e clínicos de que esta família de miRNAs é uma importante mediadora de atividades supressoras de tumor;
- g) Os alelos variantes dos dois miRSNPs selecionados para os estudos de modificadores de fenótipo na SLF, *MIR605* rs2043556[G] e *pri-miR-34b/c* rs4938723[C], apresentaram frequências similarmente elevadas em nosso grupo de portadores da variante fundadora *TP53* R337H das regiões Sul e Sudeste do Brasil (MAF= 0,36 e 0,35, respectivamente), enquanto o alelo variante para o SNP funcional *KRAS* rs61764370 (T>G) apresentou uma frequência menor no mesmo grupo de pacientes (MAF rs61764370[G]= 0,07);
- h) O genótipo rs2043556[G/G] para o miRSNP localizado no gene *MIR605* está significativamente associado com o diagnóstico de múltiplos tumores primários em indivíduos brasileiros portadores da variante fundadora *TP53* R337H oriundos das mesmas regiões do país;
- i) O genótipo *pri-miR-34b/c* rs4938723[C/C] consiste em um potencial modificador de fenótipo relacionado ao tipo de tumor diagnosticado em pacientes SLF positivos para a variante fundadora *TP53* R337H, especificamente associado com o desenvolvimento de tumores não-centrais ou atípicos da síndrome (tumores de tireoide, próstata e gastrointestinais) nesse grupo de pacientes;
- j) O alelo variante *KRAS* rs61764370[G] não está associado com nenhuma das manifestações clínicas analisadas em portadores da variante fundadora brasileira *TP53* R337H, sugerindo que o mesmo não apresente um efeito modificador de fenótipo na SLF;

- k) Nossos achados acerca do papel dos miRSNPs relacionados às famílias miR-605 e miR-34 no contexto da SLF mostram a importância da análise de genes de miRNAs que regulam indiretamente os níveis de expressão e função de p53 como potenciais modificadores de fenótipo da doença.

Como perspectivas e sugestões de análises adicionais destacamos as seguintes:

- a) Determinar a prevalência da variante fundadora patogênica *TP53* R337H em coortes de pacientes diagnosticados com tumores gastrointestinais e adenocarcinoma de próstata, aparentemente não selecionados pela idade ao diagnóstico do tumor e presença de história familiar de câncer, provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil;
- b) Investigar a prevalência da variante germinativa rara do PAS de *TP53* (3'UTR rs78378222) em pacientes com diferentes tipos de neoplasias hematológicas (leucemias, linfomas e mieloma múltiplo) provenientes do Sul e Sudeste do Brasil;
- c) Determinar a prevalência da variante funcional *TP53* rs78378222 em coortes de pacientes com tumores centrais do espectro da SLF (sarcomas, carcinoma adrenocortical e tumores cerebrais), não selecionados pela idade ao diagnóstico e história familiar de câncer e provenientes das mesmas regiões do Brasil;
- d) Ampliar o número amostral de probandos SLF incluídos em nossos estudos de modificadores de fenótipo, através de colaborações com grupos de pesquisa de outras regiões do Brasil e do exterior, em especial o grupo de portadores de variantes no DBD de p53 (n= 5 a 6 pacientes nos estudos que compõem esta tese - **Capítulos VI e VII**);
- e) Realizar análises de enriquecimento funcional utilizando o banco de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG Pathway Database)* para investigar a totalidade das vias biológicas reguladas pelas famílias de miRNAs que compõem a rede atualizada da via de p53 e miRNAs (**Capítulo VIII**);

- f) Investigar o papel de outros miRSNPs em genes de miRNAs reguladores da atividade de p53, como potenciais modificadores de fenótipo da SLF, tais como as variantes funcionais *pri-miR-124-1* rs531564, *MIR34A* rs35301225 e *pre-miR-34a* rs72631823, localizadas em genes de miRNAs que atuam como reguladores indiretos de p53, identificados a partir da nossa rede atualizada de regulação de p53 por miRNAs (**Capítulo VIII**);
- g) Avaliar o papel de SNPs funcionais em genes da maquinaria de biogênese e processamento de miRNAs, previamente associados com risco de tumores característicos da SLF e/ou câncer em geral (*DICER1* rs1057035, *DROSHA* rs78393591 e *DGCR8* rs417309, por exemplo), como potenciais modificadores de fenótipo da SLF;
- h) Explorar o efeito de interações SNP-SNP em diferentes variáveis clínicas na mesma coorte de portadores da variante fundadora R337H analisada nos artigos 3 e 4 (**Capítulos VI e VII**), selecionando para esta análise de interação apenas pacientes genotipados para todos os SNPs recentemente avaliados pelo nosso grupo (*MIR605* rs2043556, *pri-miR34b-c* rs4938723 e *KRAS* rs61764370);
- i) Desenvolver um score poligênico para efeito modificador de fenótipo na SLF, constituído somente por variantes funcionais previamente associadas com manifestações clínicas da SLF, tais como *TP53* rs1042522 (p.Pro72Arg), *TP53* rs17878362 (PIN3), *MDM2* rs2279744 (SNP309), *MIR605* rs2043556, *XAF1* rs146752602 e *pri-miR34b-c* rs4938723, e especialmente destinado aos portadores da variante fundadora *TP53* R337H;
- j) Avaliar os níveis de metilação no promotor do gene *MIR34A*, tanto na linhagem germinativa quanto em tecido tumoral (tumor primário), em pacientes SLF com diferentes VGP em *TP53* provenientes da região Sul do Brasil, a fim de investigar se alterações epigenéticas nesse gene podem atuar como modificadores de fenótipo adicionais da síndrome;

- k) Analisar os dados de expressão e de metilação dos genes da família miR-34 em amostras de tecido tumoral incluídas no banco de dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas*), focando nos tipos de tumores centrais da SLF;
- l) Caracterizar as variações de sequência germinativas na região 3'UTR de *TP53* em pacientes com fenótipo clínico da SLF com e sem VGP identificada nas regiões codificantes e junções éxon-íntron do gene, visando a identificação de variantes patogênicas, funcionais e/ou com potencial efeito modificador de fenótipo que alterem elementos de sequência regulatórios (sítios para ligação de miRNAs e sequências regulatórias de poliadenilação);
- m) Desenvolver e validar um painel-piloto de sequenciamento de nova geração para análise das regiões 3'UTR de diferentes genes associados com síndromes de câncer hereditário (SCH) altamente prevalentes na nossa população (*NF1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *TP53*, genes do sistema de *Mismatch Repair*, entre outros), direcionado principalmente para pacientes e/ou famílias que preenchem critérios clínicos para determinada SCH, mas não apresentam alterações patogênicas detectadas nas regiões codificantes e junções éxon-íntron dos genes associados.

Capítulo XI – Referências Bibliográficas

Achatz, M.I., and Zambetti, G.P. (2016). The inherited p53 mutation in the Brazilian population. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6.

Achatz, M.I.W., Olivier, M., Calvez, F. Le, Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B.M., Ashton-Prolla, P., Giugliani, R., Palmero, E.I., Vargas, F.R., et al. (2007). The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 245, 96–102.

Achatz, M.I.W., Hainaut, P., and Ashton-Prolla, P. (2009). Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol.* 10, 920–925.

Agarwal, V., Bell, G.W., Nam, J.W., and Bartel, D.P. (2015). Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* 4.

Amadou, et al (2017). Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr. Opin. Oncol.*

Amadou, A., Waddington Achatz, M.I., and Hainaut, P. (2018). Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: Temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr. Opin. Oncol.* 30, 23–29.

Ambros, V. (2004). The functions of animal microRNAs. *Nature* 431, 350–355.

de Andrade, K.C., Mirabello, L., Stewart, D.R., Karlins, E., Koster, R., Wang, M., Gapstur, S.M., Gaudet, M.M., Freedman, N.D., Landi, M.T., et al. (2017). Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history. *Hum. Mutat.* 38, 1723–1730.

de Andrade, K.C., Frone, M.N., Wegman-Ostrosky, T., Khincha, P.P., Kim, J., Amadou, A., Santiago, K.M., Fortes, F.P., Lemonnier, N., Mirabello, L., et al. (2019). Variable population prevalence estimates of germline TP53 variants: A gnomAD-based analysis. *Hum. Mutat.* 40, 97–105.

Aubrey, B.J., Strasser, A., and Kelly, G.L. (2016). Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6.

Aury-Landas, J., Bougeard, G., Castel, H., Hernandez-Vargas, H., Drouet, A., Latouche, J.B., Schouff, M.T., Férec, C., Leroux, D., Lasset, C., et al. (2013). Germline copy number variation of genes involved in chromatin remodelling in families suggestive of Li-Fraumeni syndrome with brain tumours. *Eur. J. Hum. Genet.* 21, 1369–1376.

Barbosa, M.V.R., Cordeiro de Lima, V.C., Formiga, M.N., Andrade de Paula, C.A., Torrezan, G.T., and Carraro, D.M. (2020). High Prevalence of EGFR Mutations in Lung Adenocarcinomas From Brazilian Patients Harboring the TP53 p.R337H Variant. *Clin. Lung Cancer* 21, e37–e44.

Barnoud, T., Parris, J.L.D., and Murphy, M.E. (2019). Common genetic variants in the TP53 pathway and their impact on cancer. *J. Mol. Cell Biol.* 11, 578–585.

Bartek, J., Bartkova, J., Vojtesek, B., Staskova, Z., Lukas, J., Rejthar, A., Kovarik, J., Midgley, C.A., Gannon, J. V., and Lane, D.P. (1991). Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 6, 1699–1703.

Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116, 281–297.

Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* 136, 215–233.

- Basu, S., and Murphy, M.E. (2016). Genetic modifiers of the p53 pathway. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 6, a026302.
- Batalini, F., Peacock, E.G., Stobie, L., Robertson, A., Garber, J., Weitzel, J.N., and Tung, N.M. (2019). Li-Fraumeni syndrome: not a straightforward diagnosis anymore—the interpretation of pathogenic variants of low allele frequency and the differences between germline PVs, mosaicism, and clonal hematopoiesis. *Breast Cancer Res.* 21, 107.
- Bauer, N.C., Corbett, A.H., and Doetsch, P.W. (2015). The current state of eukaryotic DNA base damage and repair. *Nucleic Acids Res.* 43, 10083–10101.
- Beaudoing, E., Freier, S., Wyatt, J.R., Claverie, J.M., and Gautheret, D. (2000). Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res.* 10, 1001–1010.
- Beckerman, R., and Prives, C. (2010). Transcriptional regulation by p53. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Beg, M.S., Brenner, A.J., Sachdev, J., Borad, M., Kang, Y.K., Stoudemire, J., Smith, S., Bader, A.G., Kim, S., and Hong, D.S. (2017). Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* 35, 180–188.
- Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C., and Leslie, C. (2010). Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol.* 11, 1–14.
- Biesecker, B.B., and Garber, J.E. (1995). Testing and counseling adults for heritable cancer risk. *J Natl Cancer Inst Monogr.*
- Birch, J.M., Hartley, A.L., Tricker, K.J., Prosser, J., Condie, A., Kelsey, A.M., Harris, M., Morris Jones, P.H., Binchy, A., Crowther, D., et al. (1994). Prevalence and Diversity of Constitutional Mutations in the p53 Gene among 21 Li-Fraumeni Families. *Cancer Res.* 54.
- Birch, J.M., Blair, V., Kelsey, A.M., Evans, D.G., Harris, M., Tricker, K.J., and Varley, J.M. (1998). Cancer phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* 17, 1061–1068.
- Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., et al. (2007). p53-Mediated Activation of miRNA34 Candidate Tumor-Suppressor Genes. *Curr. Biol.* 17, 1298–1307.
- Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, L., Chompret, A., Bressac-De Paillerets, B., Stoppa-Lyonnet, D., Bonaiti-Pellie, C., et al. (2006). Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J. Med. Genet.* 43, 531–533.
- Bougeard, G., Sesboué, R., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Tinat, J., Brugières, L., Chompret, A., Bressac-de Paillerets, B., Stoppa-Lyonnet, D., et al. (2008). Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: An update from the French LFS families. *J. Med. Genet.* 45, 535–538.
- Bougeard, G., Renaux-Petel, M., Flaman, J.M., Charbonnier, C., Fermey, P., Belotti, M., Gauthier-Villars, M., Stoppa-Lyonnet, D., Consolino, E., Brugières, L., et al. (2015). Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *J. Clin. Oncol.* 33, 2345–2352.
- Bourdon, J.C., Fernandes, K., Murray-Zmijewski, F., Liu, G., Diot, A., Xirodimas, D.P., Saville, M.K., and Lane, D.P. (2005). p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes Dev.* 19, 2122–2137.

Brooks, C.L., Li, M., Hu, M., Shi, Y., and Gu, W. (2007). The p53-Mdm2-HAUSP complex is involved in p53 stabilization by HAUSP. *Oncogene* 26, 7262–7266.

Brosh, R., and Rotter, V. (2009). When mutants gain new powers: News from the mutant p53 field. *Nat. Rev. Cancer* 9, 701–713.

Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 2999–3004.

Chen, J.M., Férec, C., and Cooper, D.N. (2006). A systematic analysis of disease-associated variants in the 3' regulatory regions of human protein-coding genes II: The importance of mRNA secondary structure in assessing the functionality of 3' UTR variants. *Hum. Genet.* 120, 301–333.

Chen, P., Sun, R., Pu, Y., Bai, P., Yuan, F., Liang, Y., Zhou, B., Wang, Y., Sun, Y., Zhu, J., et al. (2015). Pri-Mir-34b/C and Tp-53 Polymorphisms are Associated With The Susceptibility of Papillary Thyroid Carcinoma: A Case–Control Study. *Medicine (Baltimore)*. 94.

Chin, L.J., Ratner, E., Leng, S., Zhai, R., Nallur, S., Babar, I., Muller, R.U., Straka, E., Su, L., Burki, E.A., et al. (2008). A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res.* 68, 8535–8540.

Chompret, A., Abel, A., Stoppa-Lyonnet, D., Brugières, L., Pagès, S., Feunteun, J., and Bonaïti-Pellié, C. (2001). Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening [1]. *J. Med. Genet.* 38, 43–47.

Chou, C.H., Chang, N.W., Shrestha, S., Hsu, S. Da, Lin, Y.L., Lee, W.H., Yang, C.D., Hong, H.C., Wei, T.Y., Tu, S.J., et al. (2016). miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 44, D239–D247.

Chuanyin, L., Xiaona, W., Zhiling, Y., Yu, Z., Shuyuan, L., Jie, Y., Chao, H., Li, S., Hongying, Y., and Yufeng, Y. (2017). The association between polymorphisms in microRNA genes and cervical cancer in a Chinese Han population. *Oncotarget* 8, 87914–87927.

Chung, C.H., Lee, J.W., Slebos, R.J., Howard, J.D., Perez, J., Kang, H., Fertig, E.J., Considine, M., Gilbert, J., Murphy, B.A., et al. (2014). A 30-UTR KRAS-variant is associated with cisplatin resistance in patients with recurrent and/or metastatic head and neck squamous cell carcinoma. *Ann. Oncol.* 25, 2230–2236.

Cole, A.J., Dwight, T., Gill, A.J., Dickson, K.A., Zhu, Y., Clarkson, A., Gard, G.B., Maidens, J., Valmadre, S., Clifton-Bligh, R., et al. (2016). Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci. Rep.* 6.

Committee, A. (2019). Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment: ACOG COMMITTEE OPINION, Number 793. *Obstet. Gynecol.* 134, E143–E149.

COSMIC, Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (2020). Graphical View of Mutations Across TP53 Gene. Disponível em: <<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/gene/analysis?ln=TP53>>. Acessado em 12 de julho de 2021.

Couto, P.P., Bastos-Rodrigues, L., Schayek, H., Melo, F.M., Lisboa, R.G.C., Miranda, D.M., Vilhena, A., Bale, A.E., Friedman, E., and De Marco, L. (2017). Spectrum of

germline mutations in smokers and non-smokers in Brazilian non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. *Carcinogenesis* 38, 1112–1118.

Croce, C.M. (2008). *Oncogenes and Cancer*. *N. Engl. J. Med.* 358, 502–511.

Custódio, G., Parise, G.A., Filho, N.K., Komechen, H., Sabbaga, C.C., Rosati, R., Grisa, L., Parise, I.Z.S., Pianovski, M.A.D., Fiori, C.M.C.M., et al. (2013). Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Oncol.* 31, 2619–2626.

Decorsière, A., Toulas, C., Fouque, F., Tilkin-Mariamé, A.F., Selves, J., Guimbaud, R., Chipoulet, E., Delmas, C., Rey, J.M., Pujol, P., et al. (2012). Decreased efficiency of MSH6 mRNA polyadenylation linked to a 20-base-pair duplication in Lynch syndrome families. *Cell Cycle* 11, 2578–2580.

Deng, Q., Hu, H., Yu, X., Liu, S., Wang, L., Chen, W., Zhang, C., Zeng, Z., Cao, Y., Xu-Monette, Z.Y., et al. (2019). Tissue-specific microRNA expression alters cancer susceptibility conferred by a TP53 noncoding variant. *Nat. Commun.* 10, 1–13.

Diederichs, S., Bartsch, L., Berkmann, J.C., Fröse, K., Heitmann, J., Hoppe, C., Iggena, D., Jazmati, D., Karschnia, P., Linsenmeier, M., et al. (2016). The dark matter of the cancer genome: aberrations in regulatory elements, untranslated regions, splice sites, non-coding RNA and synonymous mutations. *EMBO Mol. Med.* 8, 442–457.

DiGiammarino, E.L., Lee, A.S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R.C., Zambeti, G., and Kriwacki, R.W. (2002). A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat. Struct. Biol.* 9, 12–16.

Diskin, S.J., Capasso, M., Diamond, M., Oldridge, D.A., Conkrite, K., Bosse, K.R., Russell, M.R., Iolascon, A., Hakonarson, H., Devoto, M., et al. (2014). Rare variants in TP53 and susceptibility to neuroblastoma. *J. Natl. Cancer Inst.* 106, 47.

Doffe, F., Carbonnier, V., Tissier, M., Leroy, B., Martins, I., Mattsson, J.S.M., Micke, P., Pavlova, S., Pospisilova, S., Smardova, J., et al. (2021). Identification and functional characterization of new missense SNPs in the coding region of the TP53 gene. *Cell Death Differ.* 28, 1477–1492.

Dornan, D., Shimizu, H., Burch, L., Smith, A.J., and Hupp, T.R. (2003). The Proline Repeat Domain of p53 Binds Directly to the Transcriptional Coactivator p300 and Allosterically Controls DNA-Dependent Acetylation of p53. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8846–8861.

Dowell, S.P., Wilson, P.O.G., Derias, N.W., Lane, D.P., and Hall, P.A. (1994). Clinical Utility of the Immunocytochemical Detection of p53 Protein in Cytological Specimens. *Cancer Res.* 54.

Duldulao, M.P., Lee, W., Nelson, R.A., Ho, J., Le, M., Chen, Z., Li, W., Kim, J., and Garcia-Aguilar, J. (2013). Gene polymorphisms predict toxicity to neoadjuvant therapy in patients with rectal cancer. *Cancer* 119, 1106–1112.

Dumont, P., Leu, J.I.J., Della Pietra, A.C., George, D.L., and Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat. Genet.* 33, 357–365.

Dweep, H., Sticht, C., and Gretz, N. (2013). In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr. Genomics* 14, 127–136.

Eeles, R.A. (1995). Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 25, 101–124.

Elton, T.S., and Yalowich, J.C. (2015). Experimental procedures to identify and validate

specific mRNA targets of miRNAs. *EXCLI J.* 14, 758–790.

Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nat. Rev. Cancer* 6, 259–269.

Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 351–379.

Feng, Z., Wu, R., Lin, M., and Hu, W. (2011). Tumor suppressor p53: New functions of an old protein. *Front. Biol. China* 6, 58–68.

Ferreira, C.G., and Rocha, J.C.C. (2010). *Oncologia Molecular* (São Paulo: Atheneu).

Formiga, M.N. da C., De Andrade, K.C., Kowalski, L.P., and Achatz, M.I. (2017). Frequency of thyroid carcinoma in Brazilian TP53 p.R337H carriers with Li Fraumeni syndrome. *JAMA Oncol.* 3, 1400–1402.

Frebourg, T., Abel, A., Bonaiti-Pellie, C., Brugières, L., Berthet, P., Paillerets, B.B., Chevrier, A., Chompret, A., Cohen-Haguenaer, O., Delattre, O., et al. (2001). Le syndrome de Li-Fraumeni : mise au point, données nouvelles et recommandations pour la prise en charge. *Bull. Cancer* 88, 581–587.

Frebourg, T., Bajalica Lagercrantz, S., Oliveira, C., Magenheimer, R., Evans, D.G., Hoogerbrugge, N., Ligtenberg, M., Kets, M., Oostenbrink, R., Sijmons, R., et al. (2020). Guidelines for the Li–Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. *Eur. J. Hum. Genet.* 28, 1379–1386.

Friedman, R.C., Farh, K.K.H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105.

Garber, J.E., and Offit, K. (2005). Hereditary cancer predisposition syndromes. *J. Clin. Oncol.* 23, 276–292.

Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E.I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Calvez-Kelm, F. Le, Brugières, L., Vargas, F.R., Brentani, R.R., Ashton-Prolla, P., 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, 143–150.

Gemignani, F., Moreno, V., Landi, S., Moullan, N., Chabrier, A., Gutiérrez-Enríquez, S., Hall, J., Guino, E., Peinado, M.A., Capella, G., et al. (2004). A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene* 23, 1954–1956.

Giacomazzi, J., Selistre, S.G., Rossi, C., Alemar, B., Santos-Silva, P., Pereira, F.S., Netto, C.B., Cossio, S.L., Roth, D.E., Brunetto, A.L., et al. (2013a). Li-Fraumeni and Li-Fraumeni - Like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer* 119, 4341–4349.

Giacomazzi, J., Koehler-Santos, P., Palmero, E.I., Graudenz, M.S., Rivero, L.F., Lima, E., Pütten, A.C.K., Hainaut, P., Camey, S.A., Michelli, R.D., et al. (2013b). A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Arch.* 463, 17–22.

Giacomazzi, J., Graudenz, M.S., Osorio, C.A.B.T., Koehler-Santos, P., Palmero, E.I., Zagonel-Oliveira, M., Michelli, R.A.D., Neto, C.S., Fernandes, G.C., Achatz, M.I.W.S., et al. (2014). Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. *PLoS One* 9, 99893.

Di Giovannantonio, M., Harris, B.H.L., Zhang, P., Kitchen-Smith, I., Xiong, L., Sahgal, N., Stracquadanio, G., Wallace, M., Blagden, S., Lord, S., et al. (2021). Heritable genetic

variants in key cancer genes link cancer risk with anthropometric traits. *J. Med. Genet.* **58**, 392–399.

Goeman, F., Strano, S., and Blandino, G. (2017). MicroRNAs as Key Effectors in the p53 Network. In *International Review of Cell and Molecular Biology*, (Elsevier Inc.), pp. 51–90.

Gonzalez, K.D., Noltner, K.A., Buzin, C.H., Gu, D., Wen-Fong, C.Y., Nguyen, V.Q., Han, J.H., Lowstuter, K., Longmate, J., Sommer, S.S., et al. (2009). Beyond Li Fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J. Clin. Oncol.* **27**, 1250–1256.

Grimson, A., Farh, K.K.H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* **27**, 91–105.

Groden, J., Thliveris, A., Samowitz, W., Carlson, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., et al. (1991). Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* **66**, 589–600.

Hainaut, P. (2002). Tumor-specific mutations in p53: The acid test. *Nat. Med.* **8**, 21–23.

Hainaut, P., and Hollstein, M. (1999). p53 and Human Cancer: The First Ten Thousand Mutations. *Adv. Cancer Res.* **77**, 81–86.

Hainaut, P., and Pfeifer, G.P. (2016). Somatic TP53 mutations in the era of genome sequencing. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **6**, a026179.

Han, S.-A., and Kim, S.-W. (2021). *BRCA and Breast Cancer-Related High-Penetrance Genes*. (Springer, Singapore), pp. 473–490.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674.

Hartley, A.L., Birch, J.M., Kelsey, A.M., Marsden, H.B., Harris, M., and Teare, M.D. (1989). Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? *Cancer Genet. Cytogenet.* **42**, 221–226.

Hashemi, M., Danesh, H., Bizhani, F., Narouie, B., Sotoudeh, M., Nouralizadeh, A., Sharifiaghdas, F., Bahari, G., and Taheri, M. (2017). Pri-MIR-34b/c rs4938723 polymorphism increased the risk of prostate cancer. *Cancer Biomarkers* **18**, 155–159.

Hashemi, M., Moazeni-Roodi, A., Bahari, G., Taheri, M., and Ghavami, S. (2019). Association between miR-34b/c rs4938723 polymorphism and risk of cancer: An updated meta-analysis of 27 case-control studies. *J. Cell. Biochem.* **120**, 3306–3314.

He, J., Zhao, J., Zhu, W., Qi, D., Wang, L., Sun, J., Wang, B., Ma, X., Dai, Q., and Yu, X. (2016). MicroRNA biogenesis pathway genes polymorphisms and cancer risk: A systematic review and meta-analysis. *PeerJ* **2016**.

He, L., He, X., Lim, L.P., De Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* **447**, 1130–1134.

Van Heemst, D., Mooijaart, S.P., Beekman, M., Schreuder, J., De Craen, A.J.M., Brandt, B.W., Eline Slagboom, P., and Westendorp, R.G.J. (2005). Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp. Gerontol.* **40**, 11–15.

Heidari, Z., Mohammadpour-Gharehbagh, A., Eskandari, M., Harati-Sadegh, M., and Salimi, S. (2019). Genetic polymorphisms of miRNA let7a-2 and pri-mir-34b/c are associated with an increased risk of papillary thyroid carcinoma and clinical/pathological

features. *J. Cell. Biochem.* 120, 8640–8647.

Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 network: Micromanagement of tumour suppression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 613–626.

Hodgson, S. (2008). Mechanisms of inherited cancer susceptibility. *J. Zhejiang Univ. Sci. B* 9, 1–4.

Hollerer, I., Grund, K., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2014). mRNA 3'end processing: A tale of the tail reaches the clinic. *EMBO Mol. Med.* 6, 16–26.

Hollestelle, A., Pelletier, C., Hooning, M., Crepin, E., Schutte, M., Look, M., Collee, J.M., Nieuwlaat, A., Dorssers, L.C.J., Seynaeve, C., et al. (2011). Prevalence of the variant allele rs61764370 T>G in the 3'UTR of KRAS among Dutch BRCA1, BRCA2 and non-BRCA1/BRCA2 breast cancer families. *Breast Cancer Res. Treat.* 128, 79–84.

Hollestelle, A., Van Der Baan, F.H., Berchuck, A., Johnatty, S.E., Aben, K.K., Agnarsson, B.A., Aittomäki, K., Alducci, E., Andrulis, I.L., Anton-Culver, H., et al. (2016). No clinical utility of KRAS variant rs61764370 for ovarian or breast cancer. *Gynecol. Oncol.* 141, 386–401.

Hong, D.S., Kang, Y.K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H.Y., Brenner, A.J., Park, K., Lee, J.L., Kim, T.Y., et al. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *Br. J. Cancer* 122, 1630–1637.

Hu, W., Chan, C.S., Wu, R., Zhang, C., Sun, Y., Song, J.S., Tang, L.H., Levine, A.J., and Feng, Z. (2010). Negative Regulation of Tumor Suppressor p53 by MicroRNA miR-504. *Mol. Cell* 38, 689–699.

Hu, Y., Yu, C.Y., Wang, J.L., Guan, J., Chen, H.Y., and Fang, J.Y. (2014). MicroRNA sequence polymorphisms and the risk of different types of cancer. *Sci. Rep.* 4, 1–8.

Hulla, J.E., and Schneider, R.P. (1993). Structure of the rat P53 tumor suppressor gene. *Nucleic Acids Res.* 21, 713–717.

IARC, International Agency for Research on Cancer (2014). Detection of TP53 Mutations by Direct Sequencing. Disponível em: <https://p53.iarc.fr/Download/TP53_SangerSequencing_IARC.pdf>. Acessado em 28 de junho de 2021.

IARC TP53 database (2019). International Agency for Research on Cancer TP53 database, versão R20, julho de 2019. Disponível em: <<https://p53.iarc.fr/>>. Acessado em 16 de junho de 2021.

Id Said, B., and Malkin, D. (2015). A functional variant in miR-605 modifies the age of onset in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet.* 208, 47–51.

INCa (2009). Rede nacional de câncer familiar: manual operacional/Instituto Nacional de Câncer (Rio de Janeiro: INCa, Ministério da Saúde do Brasil).

Isobe, M., Emanuel, B.S., Givol, D., Oren, M., and Croce, C.M. (1986). Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. *Nature* 320, 84–85.

Jeffers, J.R., Pinto, E.M., Rehg, J.E., Clay, M.R., Wang, J., Neale, G., Heath, R.J., Lozano, G., Lalli, E., Figueiredo, B.C., et al. (2021). The common germline TP53-R337H mutation is hypomorphic and confers incomplete penetrance and late tumor onset in a mouse model A C. *Cancer Res.* 81, 2442–2456.

Jiang, H., Ge, F., Hu, B., Wu, L., Yang, H., and Wang, H. (2017). rs35301225 polymorphism in miR-34a promotes development of human colon cancer by deregulation of 3'UTR in E2F1 in Chinese population. *Cancer Cell Int.* 17, 39.

- Kalapanida, D., Zagouri, F., Gazouli, M., Zografos, E., Dimitrakakis, C., Marinopoulos, S., Giannos, A., Sergeantanis, T.N., Kastritis, E., Terpos, E., et al. (2018). Evaluation of pre-mir-34a rs72631823 single nucleotide polymorphism in triple negative breast cancer: A case-control study. *Oncotarget* 9, 36906–36913.
- Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998). Landscaping the cancer terrain. *Science* (80-.). 280, 1036–1037.
- Kleihues, P., Schäuble, B., Zur Hausen, A., Estève, J., and Ohgaki, H. (1997). Tumors associated with p53 germline mutations: A synopsis of 91 families. *Am. J. Pathol.* 150, 1–13.
- Knudson, A.G. (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68, 820–823.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: Annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* 42, D68–D73.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* 47, D155–D162.
- De la Chapelle, A., and Peltomäki, P. (1998). The genetics of hereditary common cancers. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 8, 298–303.
- Labuschagne, C.F., Zani, F., and Vousden, K.H. (2018). Control of metabolism by p53 – Cancer and beyond. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* 1870, 32–42.
- Laloo, F., Varley, J., Moran, A., Ellis, D., O'Dair, L., Pharoah, P., Antoniou, A., Hartley, R., Shenton, A., Seal, S., et al. (2006). BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. *Eur. J. Cancer* 42, 1143–1150.
- Lane, D., and Levine, A. (2010). p53 Research: the past thirty years and the next thirty years. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2.
- Latronico, A.C., Pinto, E.M., Domenice, S., Fragoso, M.C.B.V., Martin, R.M., Zerbini, M.C., Lucon, A.M., and Mendonca, B.B. (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, 4970–4973.
- Leach, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N., Liu, B., Jen, J., Parsons, R., Peltomäki, P., Sistonen, P., Aaltonen, L.A., Nyström-Lahti, M., et al. (1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215–1225.
- Lee, J.T., and Gu, W. (2010). The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell Death Differ.* 17, 86–92.
- Lemay, J.F., Lemieux, C., St-André, O., and Bachand, F. (2010). Crossing the borders: Poly(A)-binding proteins working on both sides of the fence. *RNA Biol.* 7, 291–295.
- Lerario, A.M., Mohan, D.R., Montenegro, L.R., Funari, M.F. de A., Nishi, M.Y., Narcizo, A. de M., Benedetti, A.F.F., Oba-Shinjo, S.M., Vitorino, A.J., Dos Santos, R.A.S.X., et al. (2020). SELADB: A database of exonic variants in a brazilian population referred to a quaternary medical center in São Paulo. *Clinics* 75, 1–9.
- Leroy, B., Ballinger, M.L., Baran-Marszak, F., Bond, G.L., Braithwaite, A., Concin, N., Donehower, L.A., El-Deiry, W.S., Fenaux, P., Gaidano, G., et al. (2017). Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of TP53 variants in clinical practice. *Cancer Res.* 77, 1250–1260.
- Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev.*

Pathol. Mech. Dis. 9, 287–314.

Levine, A.J. (1989). The p53 tumor suppressor gene and gene product. Princess Takamatsu Symp. 20, 221–230.

Levine, A.J. (1997). p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88, 323–331.

Levine, A.J. (2020). p53: 800 million years of evolution and 40 years of discovery. Nat. Rev. Cancer 20, 471–480.

Li, F.P., and Fraumeni, J.F. (1969a). Rhabdomyosarcoma in children: Epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. J. Natl. Cancer Inst. 43, 1365–1373.

Li, F.P., and Fraumeni, J.F. (1969b). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? Ann. Intern. Med. 71, 747–752.

Li, F.P., Fraumeni, J.F., Mulvihill, J.J., Blattner, W.A., Dreyfus, M.G., Tucker, M.A., and Miller, R.W. (1988). A Cancer Family Syndrome in Twenty-four Kindreds. Cancer Res. 48.

Li, M., Brooks, C.L., Kon, N., and Gu, W. (2004). A dynamic role of HAUSP in the p53-Mdm2 pathway. Mol. Cell 13, 879–886.

Li, Q., Qian, Z., and Wang, L. (2017). Pri-microRNA-124 rs531564 polymorphism minor allele increases the risk of pulmonary artery hypertension by abnormally enhancing proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. Int. J. COPD 12, 1351–1361.

Li, Y., Gordon, M.W., Xu-Monette, Z.Y., Visco, C., Tzankov, A., Zou, D., Qiu, L., Montes-Moreno, S., Dybkaer, K., Orazi, A., et al. (2013). Single nucleotide variation in the TP53 3' untranslated region in diffuse large B-cell lymphoma treated with rituximab-CHOP: A report from the International DLBCL Rituximab-CHOP Consortium Program. Blood 121, 4529–4540.

Lin, S., and Gregory, R.I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. Nat. Rev. Cancer 15, 321–333.

Liu, B., Parsons, R., Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Lynch, H.T., Watson, P., Jass, J.R., Dunlop, M., Wyllie, A., Peltomäki, P., et al. (1996). Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. Nat. Med. 2, 169–174.

Liu, J., Zhang, C., Zhao, Y., and Feng, Z. (2017). MicroRNA Control of p53. J. Cell. Biochem. 118, 7–14.

López de Silanes, I., Paz Quesada, M., and Esteller, M. (2007). Aberrant regulation of messenger RNA 3'-untranslated region in human cancer. Anal. Cell. Pathol. 29, 1–17.

Lu, J., Getz, G., Miska, E.A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B.L., Mak, R.H., Ferrando, A.A., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. Nature 435, 834–838.

Luna, R.M.D.O., Wagner, D.S., and Lozano, G. (1995). Rescue of early embryonic lethality in mdm2-deficient mice by deletion of p53. Nature 378, 203–206.

Lutz, C.S. (2008). Alternative polyadenylation: A twist on mRNA 3' end formation. ACS Chem. Biol. 3, 609–617.

Lv, H., Pei, J., Liu, H., Wang, H., and Liu, J. (2014). A polymorphism site in the pre-miR-34a coding region reduces miR-34a expression and promotes osteosarcoma cell proliferation and migration. Mol. Med. Rep. 10, 2912–2916.

- M. Witkos, T., Koscianska, E., and J. Krzyzosiak, W. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* 11, 93–109.
- Macedo, G.S., Lisbôa da Motta, L., Giacomazzi, J., Netto, C.B.O., Manfredini, V., S.Vanzin, C., Vargas, C.R., Hainaut, P., Klamt, F., and Ashton-Prolla, P. (2012). Increased Oxidative Damage in Carriers of the Germline TP53 p.R337H Mutation. *PLoS One* 7, e47010.
- Macedo, G.S., Araujo, I., Paula, A., Giacomazzi, J., Inez, E., Volc, S., Paixão-côrtes, V.R., Caleffi, M., Silva, M., Isabel, M., et al. (2016). Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3 ' UTR : Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet.* 209, 97–106.
- Macedo, G.S., Vieira, I.A., Vianna, F.S.L., Alemar, B., Giacomazzi, J., Brandalize, A.P.C., Caleffi, M., Volc, S.M., de Campos Reis Galvão, H., Palmero, E.I., et al. (2018). p53 signaling pathway polymorphisms, cancer risk and tumor phenotype in TP53 R337H mutation carriers. *Fam. Cancer* 17, 269–274.
- Mai, P.L., Best, A.F., Peters, J.A., DeCastro, R.M., Khincha, P.P., Loud, J.T., Bremer, R.C., Rosenberg, P.S., and Savage, S.A. (2016). Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer* 122, 3673–3681.
- Mai, P.L., Sand, S.R., Saha, N., Oberti, M., Dolafi, T., DiGianni, L., Root, E.J., Kong, X., Bremer, R.C., Santiago, K.M., et al. (2021). Li-Fraumeni Exploration Consortium Data Coordinating Center: Building an Interactive Web-Based Resource for Collaborative International Cancer Epidemiology Research for a Rare Condition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 29, 927–935.
- Malkin, D. (2011). Li-fraumeni syndrome. *Genes and Cancer* 2, 475–484.
- Malkin, D., Li, F.P., Strong, L.C., Fraumeni, J.F., Nelson, C.E., Kim, D.H., Kassel, J., Gryka, M.A., Bischoff, F.Z., Tainsky, M.A., et al. (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* (80-.). 250, 1233–1238.
- Marcel, V., Palmero, E.I., Falagan-Lotsch, P., Martel-Planche, G., Ashton-Prolla, P., Olivier, M., Brentani, R.R., Hainaut, P., and Achatz, M.I. (2009). TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: Impact on age at first diagnosis. *J. Med. Genet.* 46, 766–772.
- Masciari, S., Dewanwala, A., Stoffel, E.M., Lauwers, G.Y., Zheng, H., Achatz, M.I., Riegert-Johnson, D., Foretova, L., Silva, E.M., Digianni, L., et al. (2011). Gastric cancer in individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Genet. Med.* 13, 651–657.
- Mastellaro, M.J., Seidinger, A.L., Kang, G., Abrahão, R., Miranda, E.C.M., Pounds, S.B., Cardinalli, I.A., Aguiar, S.S., Figueiredo, B.C., Rodriguez-Galindo, C., et al. (2017). Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer* 123, 3150–3158.
- Mastellaro, M.J., Ribeiro, R.C., Oliveira-Filho, A.G., Seidinger, A.L., Cardinalli, I.A., Miranda, E.C.M., Aguiar, S.S., Brandalise, S.R., Yunes, J.A., and Barros-Filho, A.A. (2018). Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. *J. Pediatr. (Rio. J).* 94, 432–439.
- Mathias, C., Bortoletto, S., Centa, A., Komechen, H., Lima, R.S., Fonseca, A.S., Sebastião, A.P., Urban, C.A., Soares, E.W.S., Prando, C., et al. (2020). Frequency of the TP53 R337H variant in sporadic breast cancer and its impact on genomic instability.

Sci. Rep. 10, 16614.

Matoulkova, E., Michalova, E., Vojtesek, B., and Hrstka, R. (2012). The role of the 3' untranslated region in post-transcriptional regulation of protein expression in mammalian cells. *RNA Biol.* 9, 563–576.

McBride, K.A., Ballinger, M.L., Killick, E., Kirk, J., Tattersall, M.H.N., Eeles, R.A., Thomas, D.M., and Mitchell, G. (2014). Li-Fraumeni syndrome: Cancer risk assessment and clinical management. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 260–271.

Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P.A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L.M., Ding, W., et al. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science* (80-). 266, 66–71.

Mirnoori, S.M., Shahangian, S.S., Salehi, Z., Mashayekhi, F., Talesh Sasani, S., and Saedi, H.S. (2018). Influence of single nucleotide polymorphisms in pri-miR-124-1 and STAT3 genes on gastric cancer susceptibility. *Br. J. Biomed. Sci.* 75, 182–186.

Mohthash, M.T., Shah, S.K., and Thirupathi, A. (2020). KRAS gene polymorphism (rs61764370) and its impact on breast cancer risk among women in kerala population, South India. *J. Nat. Sci. Biol. Med.* 11, 140–144.

Murga, M., and Fernández-Capetillo, O. (2007). Genomic instability: On the birth and death of cancer. *Clin. Transl. Oncol.* 9, 216–220.

Mw, Z., Mj, J., Yx, Y., Sc, Z., B, L., X, J., Yf, P., Ql, L., Xy, M., and K, C. (2012). Associations of lifestyle-related factors, hsa-miR-149 and hsa-miR-605 gene polymorphisms with gastrointestinal cancer risk. *Mol. Carcinog.* 51, E21–E31.

Naslavsky, M.S., Scliar, M.O., Yamamoto, G.L., Yu Ting Wang, J., Zverinova, S., Karp, T., Nunes, K., Ricardo Magliocco Ceroni, J., Lima de Carvalho, D., Eduardo da Silva Simões, C., et al. (20AD). Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis (São Paulo, Brazil). *Wagner CS Magalhães* 10, 24.

Navarro, F., and Lieberman, J. (2015). miR-34 and p53: New insights into a complex functional relationship. *PLoS One* 10, e0132767.

Nigro, J.M., Baker, S.J., Preisinger, A.C., Jessup, J.M., Hosteller, R., Cleary, K., Bigner, S.H., Davidson, N., Baylin, S., Devilee, P., et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342, 705–708.

O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., and Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 9, 402.

Okada, N., Lin, C.P., Ribeiro, M.C., Biton, A., Lai, G., He, X., Bu, P., Vogel, H., Jablons, D.M., Keller, A.C., et al. (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes Dev.* 28, 438–450.

Olivier, M., Goldgar, D.E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., and Eeles, R.A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 63.

Olivier, M., Hussain, S.P., Caron de Fromentel, C., Hainaut, P., and Harris, C.C. (2004). TP53 mutation spectra and load: a tool for generating hypotheses on the etiology of cancer. *IARC Sci. Publ.* 247–270.

Olivier, M., Petitjean, A., Marcel, V., Pétré, A., Mounawar, M., Plymoth, A., De Fromentel, C.C., and Hainaut, P. (2009). Recent advances in p53 research: An interdisciplinary

perspective. *Cancer Gene Ther.* 16, 1–12.

Olivier, M., Hollstein, M., and Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a001008.

Ørsted, D.D., Bojesen, S.E., Tybjærg-Hansen, A., and Nordestgaard, B.G. (2007). Tumor suppressor p53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *J. Exp. Med.* 204, 1295–1301.

Osborne, C., Wilson, P., and Tripathy, D. (2004). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *Oncologist* 9, 361–377.

Palmero, E.I., Schüler-Faccini, L., Caleffi, M., Achatz, M.I.W., Olivier, M., Martel-Planche, G., Marcel, V., Aguiar, E., Giacomazzi, J., Ewald, I.P., et al. (2008). 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.* 261, 21–25.

Paranjape, T., Heneghan, H., Lindner, R., Keane, F.K., Hoffman, A., Hollestelle, A., Dorairaj, J., Geyda, K., Pelletier, C., Nallur, S., et al. (2011). A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: A case-control and genetic analysis. *Lancet Oncol.* 12, 377–386.

Park, J.H., Li, J., Starost, M.F., Liu, C., Zhuang, J., Chen, J., Achatz, M.I., Kang, J.G., Wang, P. yuan, Savage, S.A., et al. (2018). Mouse homolog of the human TP53 R337H mutation reveals its role in tumorigenesis. *Cancer Res.* 78, 5375–5383.

Park, J.H., Wang, P.Y., and Hwang, P.M. (2019). Modeling the prevalent germline TP53 R337H mutation in mouse. *Oncotarget* 10, 631–632.

Paskulin, D.D., Giacomazzi, J., Achatz, M.I., Costa, S., Reis, R.M., Hainaut, P., Dos Santos, S.E.B., and Prolla, P.A. (2015). Ancestry of the brazilian TP53 c.1010G>A (p. Arg337His, R337H) Founder mutation: clues from haplotyping of short tandem repeats on chromosome 17p. *PLoS One* 10, e0143262.

Peng, Q., Lao, X., Chen, Z., Lai, H., Deng, Y., Wang, J., Mo, C., Sui, J., Wu, J., Zhai, L., et al. (2013). TP53 and MDM2 gene polymorphisms, gene-gene interaction, and hepatocellular carcinoma risk: Evidence from an updated meta-analysis. *PLoS One* 8.

Perry, M.E. (2010). The regulation of the p53-mediated stress response by MDM2 and MDM4. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2, a000968.

Petitjean, A., Mathe, E., Kato, S., Ishioka, C., Tavtigian, S. V., Hainaut, P., and Olivier, M. (2007). Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum. Mutat.* 28, 622–629.

Pharoah, P.D.P., Palmieri, R.T., Ramus, S.J., Gayther, S.A., Andrulis, I.L., Anton-Culver, H., Antonenkova, N., Antoniou, A.C., Goldgar, D., Beattie, M.S., et al. (2011). The role of KRAS rs61764370 in invasive epithelial ovarian cancer: Implications for clinical testing. *Clin. Cancer Res.* 17, 3742–3750.

Pietsch, E.C., Humbey, O., and Murphy, M.E. (2006). Polymorphisms in the p53 pathway. *Oncogene* 25, 1602–1611.

Pilarski, R., Patel, D.A., Weitzel, J., McVeigh, T., Dorairaj, J.J., Heneghan, H.M., Miller, N., Weidhaas, J.B., Kerin, M.J., McKenna, M., et al. (2012). The KRAS-variant is associated with risk of developing double primary breast and ovarian cancer. *PLoS One* 7, e37891.

Pilarski, R., Berry, M.P., Jude, S., Buys, S.S., Friedman, S., Garber, J.E., Hutton, M.L., Kauff, N.D., Khan, S., Lurie, R.H., et al. (2019). FORCE: Facing Our Risk of Cancer Empowered NCCN Guidelines Version 3.2019 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian.

Pinto, E.M., and Zambetti, G.P. (2020). What 20 years of research has taught us about the TP53 p.R337H mutation. *Cancer* 126, 4678–4686.

Pinto, C., Veiga, I., Pinheiro, M., Peixoto, A., Pinto, A., Lopes, J.M., Reis, R.M., Oliveira, C., Baptista, M., Roque, L., et al. (2009). TP53 germline mutations in Portugal and genetic modifiers of age at cancer onset. *Fam. Cancer* 8, 383–390.

Pinto, E.M., Billerbeck, A.E.C., Villares, M.C.B.F., Domenice, S., Mendonça, B.B., and Latronico, A.C. (2004). Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48, 647–650.

Pinto, E.M., Chen, X., Easton, J., Finkelstein, D., Liu, Z., Pounds, S., Rodriguez-Galindo, C., Lund, T.C., Mardis, E.R., Wilson, R.K., et al. (2015). Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat. Commun.* 6.

Pinto, E.M., Figueiredo, B.C., Chen, W., Galvao, H.C.R., Formiga, M.N., Fragoso, M.C.B.V., Ashton-prolla, P., Ribeiro, E.M.S.F., Felix, G., Costa, T.E.B., et al. (2020). XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. 1–11.

Ponder, B. (1997). Genetic testing for cancer risk. *Science* (80-). 278, 1050–1054.

Portnoy, V., Huang, V., Place, R.F., and Li, L.C. (2011). Small RNA and transcriptional upregulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 2, 748–760.

Qi, L., Hu, Y., Zhan, Y., Wang, J., Wang, B.B., Xia, H.F., and Ma, X. (2012). A SNP site in pri-miR-124 changes mature miR-124 expression but no contribution to Alzheimer's disease in a Mongolian population. *Neurosci. Lett.* 515, 1–6.

Qian, F., Feng, Y., Zheng, Y., Ogundiran, T.O., Ojengbede, O., Zheng, W., Blot, W., Ambrosone, C.B., John, E.M., Bernstein, L., et al. (2016). Genetic variants in microRNA and microRNA biogenesis pathway genes and breast cancer risk among women of African ancestry. *Hum. Genet.* 135, 1145–1159.

Rachagani, S., Kumar, S., and Batra, S.K. (2010). MicroRNA in pancreatic cancer: Pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett.* 292, 8–16.

Ratner, E., Lu, L., Boeke, M., Barnett, R., Nallur, S., Chin, L.J., Pelletier, C., Blitzblau, R., Tassi, R., Paranjape, T., et al. (2010). A KRAS-variant in ovarian cancer acts as a genetic marker of cancer risk. *Cancer Res.* 70, 6509–6515.

Renaux-Petel, M., Sesboüé, R., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Fourneau, S., Bessenay, E., Frébourg, T., and Bougeard, G. (2014). The MDM2 285G-309G haplotype is associated with an earlier age of tumour onset in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Fam. Cancer* 13, 127–130.

Ribeiro, R.C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G.P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A.R., DeLacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G., et al. (2001). An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 9330–9335.

Royds, J.A., and Iacopetta, B. (2006). p53 and disease: When the guardian angel fails. *Cell Death Differ.* 13, 1017–1026.

Ruan, K., Fang, X., and Ouyang, G. (2009). MicroRNAs: Novel regulators in the

hallmarks of human cancer. *Cancer Lett.* 285, 116–126.

Ruijs, M.W.G., Schmidt, M.K., Nevanlinna, H., Tommiska, J., Aittomäki, K., Pruntel, R., Verhoef, S., and van't Veer, L.J. (2007). The single-nucleotide polymorphism 309 in the MDM2 gene contributes to the Li-Fraumeni syndrome and related phenotypes. *Eur. J. Hum. Genet.* 15, 110–114.

Ruijs, M.W.G., Verhoef, S., Rookus, M.A., Pruntel, R., Van Der Hout, A.H., Hogervorst, F.B.L., Kluijdt, I., Sijmons, R.H., Aalfs, C.M., Wagner, A., et al. (2010). 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.* 47, 421–428.

Rupaimoole, R., and Slack, F.J. (2017). MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 16, 203–221.

Ryan, B.M. (2017). microRNAs in Cancer Susceptibility. In *Advances in Cancer Research*, (Academic Press Inc.), pp. 151–171.

Ryan, B.M., Robles, A.I., and Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: The implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* 10, 389–402.

Sablina, A.A., Budanov, A. V., Ilyinskaya, G. V., Agapova, L.S., Kravchenko, J.E., and Chumakov, P.M. (2005). The antioxidant function of the p53 tumor suppressor. *Nat. Med.* 11, 1306–1313.

Sagne, C., Marcel, V., Bota, M., Martel-Planche, G., Nobrega, A., Palmero, E.I., Perriaud, L., Boniol, M., Vagner, S., Cox, D.G., et al. (2014). Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: Association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures. *Carcinogenesis* 35, 807–815.

Samuel, N., Wilson, G., Lemire, M., Said, B.I., Lou, Y., Li, W., Merino, D., Novokmet, A., Tran, J., Nichols, K.E., et al. (2016). Genome-wide DNA methylation analysis reveals epigenetic dysregulation of MicroRNA-34A in TP53-associated cancer susceptibility. *J. Clin. Oncol.* 34, 3697–3704.

Sanaei, S., Hashemi, M., Eskandari, E., Hashemi, S.M., and Bahari, G. (2017). KRAS gene polymorphisms and their impact on breast cancer risk in an Iranian population. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* 18, 1301–1305.

Schneider, K., Zelle, K., Nichols, K.E., and Garber, J. (2019). Li-Fraumeni Syndrome. 1999 Jan 19 [updated 2013 Apr 11] (University of Washington, Seattle; 1993-2019).

Schwarzenbach, H., Nishida, N., Calin, G.A., and Pantel, K. (2014). Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 11, 145–156.

Sclafani, F., Chau, I., Cunningham, D., Peckitt, C., Lampis, A., Hahne, J.C., Braconi, C., Tabernero, J., Glimelius, B., Cervantes, A., et al. (2015). Prognostic role of the LCS6 KRAS variant in locally advanced rectal cancer: Results of the EXPERT-C trial. *Ann. Oncol.* 26, 1936–1941.

Sebio, A., Paré, L., Páez, D., Salazar, J., González, A., Sala, N., Del Río, E., Martín-Richard, M., Tobeña, M., Barnadas, A., et al. (2013). The LCS6 polymorphism in the binding site of let-7 microRNA to the KRAS 3'-untranslated region: Its role in the efficacy of anti-EGFR-based therapy in metastatic colorectal cancer patients. *Pharmacogenet. Genomics* 23, 142–147.

Seidinger, A.L., Mastellaro, M.J., Paschoal Fortes, F., Godoy Assumpção, J., Aparecida Cardinalli, I., Aparecida Ganazza, M., Correa Ribeiro, R., Brandalise, S.R., Dos Santos Aguiar, S., and Yunes, J.A. (2011). Association of the highly prevalent TP53 R337H

mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil. *Cancer* 117, 2228–2235.

Seidinger, A.L., Fortes, F.P., Mastellaro, M.J., Cardinali, I.A., Zambaldi, L.G., Aguiar, S.S., and Yunes, J.A. (2015). Occurrence of neuroblastoma among TP53 p.R337H carriers. *PLoS One* 10.

Sethupathy, P., Corda, B., and Hatzigeorgiou, A.G. (2006). TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA* 12, 192–197.

Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N.S., Wang, J.T., Ramage, D., Amin, N., Schwikowski, B., and Ideker, T. (2003). Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504.

Shlien, A., Tabori, U., Marshall, C.R., Pienkowska, M., Feuk, L., Novokmet, A., Nanda, S., Druker, H., Scherer, S.W., and Malkin, D. (2008). Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11264–11269.

Sidransky, D. (1997). Nucleic acid-based methods for the detection of cancer. *Science* (80-). 278, 1054–1058.

Silva, A.G., Krepischi, A.C.V., Pearson, P.L., Hainaut, P., Rosenberg, C., and Achatz, M.I. (2014). The profile and contribution of rare germline copy number variants to cancer risk in Li-Fraumeni patients negative for TP53 mutations. *Orphanet J. Rare Dis.* 9, 1–6.

Slack, F.J., and Chinnaiyan, A.M. (2019). The Role of Non-coding RNAs in Oncology. *Cell* 179, 1033–1055.

Soussi, T., and Bérout, C. (2001). Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat. Rev. Cancer* 1, 233–240.

Soussi, T., Leroy, B., Devir, M., and Rosenberg, S. (2019). High prevalence of cancer-associated TP53 variants in the gnomAD database: A word of caution concerning the use of variant filtering. *Hum. Mutat.* 40, 516–524.

Stacey, S.N., Sulem, P., Jonasdottir, A., Masson, G., Gudmundsson, J., Gudbjartsson, D.F., Magnusson, O.T., Gudjonsson, S.A., Sigurgeirsson, B., Thorisdottir, K., et al. (2011). A germline variant in the TP53 polyadenylation signal confers cancer susceptibility. *Nat. Genet.* 43, 1098–1103.

Strmsek, Z., and Kunej, T. (2014). Data integration of 104 studies related with microRNA epigenetics revealed that miR-34 gene family is silenced by DNA methylation in the highest number of cancer types. *Discoveries* 2, e18.

Tabori, U., Nanda, S., Druker, H., Lees, J., and Malkin, D. (2007). Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* 67, 1415–1418.

Tian, B., Hu, J., Zhang, H., and Lutz, C.S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res.* 33, 201–212.

Tinat, J., Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Bouvignies, E., Caron, O., BrigitteBressac-De Pailleters, B., Berthet, P., Dugast, C., et al. (2009). 2009 Version of the Chompret Criteria for Li Fraumeni Syndrome. *J. Clin. Oncol.* 27.

Tong, N., Chu, H., Wang, M., Xue, Y., Du, M., Lu, L., Zhang, H., Wang, F., Fang, Y., Li, J., et al. (2016). Pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphism contributes to acute lymphoblastic leukemia susceptibility in Chinese children. *Leuk. Lymphoma* 57, 1436–1441.

- Tucker, T., and Friedman, J.M. (2002). Pathogenesis of hereditary tumors: Beyond the “two-hit” hypothesis. *Clin. Genet.* 62, 345–357.
- Varley, J.M. (2003). Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum. Mutat.* 21, 313–320.
- Vieira, I.A., Recamonde-Mendoza, M., da Silva, V.L., Leão, D.P., Scheid, M.R., de Souza, S.J., and Ashton-Prolla, P. (2019). A comprehensive analysis of core polyadenylation sequences and regulation by microRNAs in a set of cancer predisposition genes. *Gene* 712, 143943.
- Volc, S.M., Ramos, C.R.N., Galvao, H.D.C.R., Felicio, P.S., Coelho, A.S., Berardineli, G.N., Campacci, N., Sabato, C.D.S., Abrahao-Machado, L.F., Santana, I.V.V., et al. (2020). The Brazilian TP53 mutation (R337H) and sarcomas. *PLoS One* 15, e0227260.
- Vousden, K.H., and Lane, D.P. (2007). p53 in health and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 275–283.
- Vousden, K.H., and Prives, C. (2009). Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell* 137, 413–431.
- Walcott, F.L., Wang, P.Y., Bryla, C.M., Huffstutler, R.D., Singh, N., Pollak, M.N., Khincha, P.P., Savage, S.A., Mai, P.L., Dodd, K.W., et al. (2020). Pilot Study Assessing Tolerability and Metabolic Effects of Metformin in Patients with Li-Fraumeni Syndrome. *JNCI Cancer Spectr.* 4.
- Wang, P.-Y., Ma, W., Park, J.-Y., Celi, F.S., Arena, R., Choi, J.W., Ali, Q.A., Tripodi, D.J., Zhuang, J., Lago, C.U., et al. (2013). Increased Oxidative Metabolism in the Li–Fraumeni Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 368, 1027–1032.
- Wang, X., Lu, X., Fang, Y., Chen, H., Deng, X., Peng, C., Li, H., and Shen, B. (2014). Association between miR34b/c polymorphism rs4938723 and cancer risk: A meta-analysis of 11 studies including 6169 cases and 6337 controls. *Med. Sci. Monit.* 20, 1977–1982.
- Weinstein, I.B., and Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Res.* 68, 3077–3080.
- Weitzel, J.N., Chao, E.C., Nehoray, B., Tongeren, L.R. Van, LaDuca, H., Blazer, K.R., Slavin, T., FACMG, D.A.B.M.D., Pesaran, T., Rybak, C., et al. (2017). Somatic TP53 variants frequently confound germ-line testing results. *Genet. Med.* 2018 208 20, 809–816.
- Wen, J., Lv, Z., Ding, H., Fang, X., and Sun, M. (2018). Association of miRNA biosynthesis genes DROSHA and DGCR8 polymorphisms with cancer susceptibility: A systematic review and meta-analysis. *Biosci. Rep.* 38.
- Whibley, C., Pharoah, P.D.P., and Hollstein, M. (2009). p53 polymorphisms: Cancer implications. *Nat. Rev. Cancer* 9, 95–107.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., and Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: MicroRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat. Cell Biol.* 11, 228–234.
- Wooster, R., Neuhausen, S.L., Mangion, J., Quirk, Y., Ford, D., Collins, N., Nguyen, K., Seal, S., Tran, T., Averill, D., et al. (1994). Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* (80-.). 265, 2088–2090.
- Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Luo, X., and Wang, Z. (2011). MiR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress. *EMBO J.* 30, 524–532.

- Xu, Y., Liu, L., Liu, J., Zhang, Y., Zhu, J., Chen, J., Liu, S., Liu, Z., Shi, H., Shen, H., et al. (2011). A potentially functional polymorphism in the promoter region of miR-34b/c is associated with an increased risk for primary hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer* 128, 412–417.
- Yu, K. (2017). The Rs4938723 Polymorphism Reduces Expression of MicroRNA-34b and Increases the Risk of Recurrence after Endoscopic Dissection in Early Gastric Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 43, 1235–1246.
- Yue, X., Zhao, Y., Xu, Y., Zheng, M., Feng, Z., and Hu, W. (2017). Mutant p53 in Cancer: Accumulation, Gain-of-Function, and Therapy. *J. Mol. Biol.* 429, 1595–1606.
- Zerdoumi, Y., Lanos, R., Raad, S., Flaman, J.M., Bougeard, G., Frebourg, T., and Tournier, I. (2017). Germline TP53 mutations result into a constitutive defect of p53 DNA binding and transcriptional response to DNA damage. *Hum. Mol. Genet.* 26, 2591–2602.
- Zha, Y., Gan, P., Liu, Q., and Yao, Q. (2016). TP53 Codon 72 Polymorphism Predicts Efficacy of Paclitaxel Plus Capecitabine Chemotherapy in Advanced Gastric Cancer Patients. *Arch. Med. Res.* 47, 13–18.
- Zhang, J., Huang, X., Xiao, J., Yang, Y., Zhou, Y., Wang, X., Liu, Q., Yang, J., Wang, M., Qiu, L., et al. (2014). Pri-miR-124 rs531564 and pri-miR-34b/c rs4938723 polymorphisms are associated with decreased risk of esophageal squamous cell carcinoma in Chinese populations. *PLoS One* 9, e100055.
- Zhang, L., Liao, Y., and Tang, L. (2019). MicroRNA-34 family: A potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 38, 1–13.
- Zhang, Y., Coillie, S. V., Fang, J.Y., and Xu, J. (2016). Gain of function of mutant p53: R282W on the peak? *Oncogenesis* 5, 196.
- Zhao, Y., Li, X., and Zhu, S. (2016). Rs78378222 polymorphism in the 3'-untranslated region of TP53 contributes to development of age-associated cataracts by modifying microRNA-125b-induced apoptosis of lens epithelial cells. *Mol. Med. Rep.* 14, 2305–2310.
- Zhu, F., Dollé, M.E.T., Berton, T.R., Kuiper, R. V., Capps, C., Espejo, A., McArthur, M.J., Bedford, M.T., Van Steeg, H., De Vries, A., et al. (2010). Mouse models for the p53 R72P polymorphism mimic human phenotypes. *Cancer Res.* 70, 5851–5859.

Capítulo XII – Produção Científica Adicional no Período

12.1. Artigos publicados no período do doutoramento

Em colaboração com pesquisadores do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos:

a. Santin R, **Vieira IA**, Nunes JC, Benevides ML, Quadros F, Brusius-Facchin AC, Macedo G, Bertoni APS. A novel DMD intronic alteration: a potentially disease-causing variant of an intermediate muscular dystrophy phenotype. *Acta Myol.* 2021; 40:93-100. doi: 10.36185/2532-1900-048.

b. Gomes JA, Sgarioni E, **Vieira IA**, Fraga LR, Ashton-Prolla P, Terças-Tretell ACP, da Silva JH, Ribeiro BFR, Galera MF, de Oliveira TM, Carvalho de Andrade MDF, Carvalho IF, Schuler-Faccini L, Vianna FSL. Functional Polymorphisms in the p53 Pathway Genes on the Genetic Susceptibility to Zika Virus Teratogenesis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:641413. doi: 10.3389/fcimb.2021.641413.

c. **Vieira IA**, Recamonde-Mendoza M, da Silva VL, Leão DP, Scheid MR, de Souza SJ, Ashton-Prolla P. A comprehensive analysis of core polyadenylation sequences and regulation by microRNAs in a set of cancer predisposition genes. *Gene.* 2019; 712:143943. doi: 10.1016/j.gene.2019.143943.

d. Bittar CM, **Vieira IA**, Sabato CS, Andreis TF, Alemar B, Artigalás O, Galvão HCR, Macedo GS, Palmero EI, Ashton-Prolla P. TP53 variants of uncertain significance: increasing challenges in variant interpretation and genetic counseling. *Fam Cancer.* 2019; 18(4):451-456. doi: 10.1007/s10689-019-00140-w.

e. Kersting N, Kunzler Souza B, **Araujo Vieira I**, Pereira Dos Santos R, Brufatto Olguins D, José Gregianin L, Tesainer Brunetto A, Lunardi Brunetto A, Roesler R, Brunetto de Farias C, Schwartzmann G. Epidermal Growth Factor Receptor Regulation of Ewing Sarcoma Cell Function. *Oncology.* 2018; 94(6):383-393. doi: 10.1159/000487143.

f. Souza BK, da Costa Lopez PL, Menegotto PR, **Vieira IA**, Kersting N, Abujamra AL, Brunetto AT, Brunetto AL, Gregianin L, de Farias CB, Thiele CJ, Roesler R. Targeting Histone Deacetylase Activity to Arrest Cell Growth and Promote Neural Differentiation in Ewing Sarcoma. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(9):7242-7258. doi: 10.1007/s12035-018-0874-6.

g. Macedo GS, **Vieira IA**, Vianna FSL, Alemar B, Giacomazzi J, Brandalize APC, Caleffi M, Volc SM, de Campos Reis Galvão H, Palmero EI, Achatz MI, Ashton-Prolla P. p53 signaling pathway polymorphisms, cancer risk and tumor phenotype in TP53 R337H mutation carriers. *Fam Cancer*. 2018; 17(2):269-274. doi: 10.1007/s10689-017-0028-4.

12.2. Artigos em preparação ou aceitos no período do doutoramento

Em colaboração com pesquisadores do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos:

a. Julia A. Gomes, **Igor A. Vieira**, Eduarda Sgarioni, Ana Cláudia P. Terças-Tretell, Juliana H. da Silva, Bethânia F. R. Ribeiro, Marcial F. Galera, Thalita M. de Oliveira, Maria Denise F. Carvalho de Andrade, Isabella F. Carvalho, Lavínia Schüler-Faccini, Fernanda S. L. Vianna. “*A polymorphism (rs531564) in the gene encoding miR-124 may contribute to the occurrence of Congenital Zika Syndrome*”. Artigo em preparação. 2021.

b. Bruno S. Correa, **Igor A. Vieira**, Tiago F. Andreis, Guilherme D. Viola, Patricia Ashton-Prolla, Gabriel S. Macedo. “*Reclassification of missense BRCA1 variants associated with hereditary breast and ovarian cancer using Sherlock and ACMG-AMP classification criteria*”. Artigo em preparação. 2021.

c. Camila M. Bittar, Yasminne M. A. Rocha, **Igor A. Vieira**, Clévia Rosset, Tiago F. Andreis, Ivaine T. S. Sartor, Osvaldo Artigalás, Cristina B. O. Netto, Barbara Alemar, Gabriel S. Macedo, Patricia Ashton-Prolla. “*Clinical and molecular characterization of patients fulfilling Chompret criteria for Li-Fraumeni Syndrome in Southern Brazil*”. Artigo aceito (*PLOS One*). 2021.

13.1. Premiação na 40ª Semana Científica do HCPA

Apresentação Oral Destaque do dia em 09/11 – ano de 2020



9 a 13
NOV
2020

Certificamos que o trabalho REDE DE MIRNAS ENVOLVIDA NA REGULAÇÃO DA VIA DE P53 E ANÁLISE DE MIRSNPS COMO POTENCIAIS MODIFICADORES DE FENÓTIPO NA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI de autoria de IGOR ARAUJO VIEIRA e coautoria EDUARDA HEIDRICH PEZZI; MARIANA RECAMONDE-MENDONZA; LARISSA BRUSSA REIS; MARINA SIEBERT; MARIA NIRVANA FORMIGA; DIRCE MARIA CARRARO; EDENIR INEZ PALMERO; GABRIEL DE SOUZA MACEDO; PATRICIA ASHTON PROLLA, foi escolhido Destaque do Dia 9 de novembro, durante a 40ª Semana Científica do HCPA, realizada no formato digital, no período de 9 de novembro a 13 de novembro de 2020.


Prof.ª Nadiné Oliveira Clausell
Diretora-Presidente do Hospital de Clínicas


Prof.ª Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora do GPPG

Promoção



13.2. Prêmio de produtividade do PPGBM-UFRGS

1º Lugar na categoria Doutorado – ano de 2019



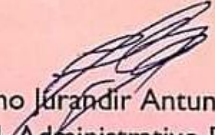
CERTIFICADO



Certificamos que **Igor Araujo Vieira** recebeu o 1º lugar no prêmio de Aluno com Maior Produtividade no ano de 2019 (Área Humana/Médica - Nível Doutorado), concedido pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Porto Alegre, 06 de janeiro de 2020.


Prof. Dr. Thales Renato Ozhotorena de Freitas
Coordenador PPGBM-UFRGS


Elmo Jurandir Antunes Cardoso
Coord. Administrativo PPGBM-UFRGS

13.3. Premiação na 38ª Semana Científica do HCPA

Pôster Destaque do dia em 22/10 – ano de 2018

38ª  **Semana Científica do HCPA**

Tecnologias disruptivas em saúde
22 a 26 de outubro de 2018

Certificado

Certificamos que o trabalho **POTENTIAL ASSOCIATION BETWEEN THE FUNCTIONAL VARIANT RS2043556 IN MIR605 GENE AND DEVELOPMENT OF MULTIPLE PRIMARY TUMORS IN TP53 P.ARG337HIS MUTATION CARRIERS** de autoria de **Igor Araujo Vieira; Isabel Cristina Bandeira da Silva; Larissa Brussa Reis; Tiago Finger Andreis; Edener Inez Palmero; Karina Miranda Santiago; Maria Isabel Waddington Achatz; Patricia Ashton-Prolla**, recebeu Menção Honrosa de Melhor E-Pôster do dia **22 de outubro** durante a 38ª Semana Científica do HCPA, realizada no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, no período de 22 a 26 de outubro de 2018.


Profª. Nadine Oliveira Clausell
Diretora-Presidente do Hospital de Clínicas


Profª. Patricia Ashton-Prolla
Coordenadora do GPPG

Promoção:  HOSPITAL DE CLÍNICAS PORTO ALEGRE - RS

Apoio:  GPPG Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação

 UFRGS UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

 Fundação Médica do Rio Grande do Sul

13.4. Cartas de aprovação dos projetos de pesquisa

13.4.1. Investigação das variantes funcionais de TP53 em casos de adenocarcinomas de pulmão e próstata e leiomioma uterino

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DE PACIENTES BRASILEIROS DIAGNOSTICADOS COM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO

Pesquisador: Gabriel de Souza Macedo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 83557418.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.730.011

Apresentação do Projeto:

As neoplasias de traqueia, brônquios e pulmão são os tipos de câncer que mais causam mortes no mundo, levando a cada ano aproximadamente 1,7 milhões de pessoas a óbito. Estima-se que em 10 anos o número de casos cresceu 29%, com 2 milhões estimados somente em 2015. Neoplasias pulmonares são divididas em dois grandes grupos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e câncer de pulmão de nãopequenas células (CPNPC), este último responsável por 85% dos casos. Apesar dos avanços em tratamentos nos últimos anos, a taxa relativa de sobrevivência de 5 anos é de apenas 15% para pacientes diagnosticados com CPNPC. Marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta para auxiliar na terapêutica do câncer de pulmão, a qual baseia-se nas características histológicas e genéticas dos tumores. Por exemplo, deleções do éxon 19 e a substituição L858R do éxon 21 no gene EGFR estão associadas a altas taxas de resposta no tratamento com inibidores de tirosina quinase (ITQs). Já fusões de ALK e ROS1 apresentam uma taxa de resposta de 72% ao tratamento com crizotinibe. Recentemente foi aprovado um novo tratamento imunoterápico chamado de pembrolizumabe, droga recomendada para CPNPC que expressam altos níveis da proteína PD-L1. No entanto, uma resposta satisfatória com o uso de um único agente anti-PD-1/PD-L1 tem variado de 10% - 45% em pacientes positivos para este biomarcador. Outras mutações que conferem resistência aos tratamentos com ITQs envolvem

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.730.011

decisões, identificação a potenciais novos mecanismos associados a sensibilidade ou resistência a tratamentos, melhorando, assim, a reposta terapêutica e guiando novas políticas públicas para o tratamento desta neoplasia. Ressaltamos que não há benefícios diretos aos pacientes, apenas indiretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de emenda ao projeto com a seguinte justificativa:

(1) Acrescentar o seguinte objetivo específico: "Investigar a frequência da mutação TP53 p.Arg337His em amostras de adenocarcinoma de pulmão".

Recentemente, em um estudo publicado por um grupo brasileiro, 4 em 45 pacientes (8,9%) diagnosticados com câncer de pulmão foram identificados como sendo portadores da mutação germinativa p.Arg337His no gene TP53. Mutações germinativas no gene TP53, incluindo esta mutação específica, estão associadas a Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes, doenças autossômicas dominantes associada a um risco aumentado para uma ampla variedade de tumores em idade jovem. Indivíduos com mutações em heterozigose (ou seja, com perda da função de um dos alelos de TP53) apresentam um risco significativamente maior que o da população de desenvolverem câncer, sendo a magnitude deste risco dependente da mutação e do tipo de tumor em questão. Dentre os principais tumores que compõem o espectro desta síndrome estão: tumores do sistema nervoso central, carcinomas adrenocorticais, sarcomas, osteossarcomas e tumores de mama. Câncer de pulmão não tem sido descrito como um tumor frequente em pacientes portadores de mutações em TP53, embora possa ocorrer, especialmente o subtipo lepidico. A saber, estudos prévios do nosso grupo e de outros grupos de pesquisa, identificaram a mutação p.R337H como uma fundadora brasileira presente em aproximadamente 0,3% da população geral. Em bancos de dados internacionais de mutações de TP53 em tumores (somáticas), por outro lado esta mutação específica não tem sido reportada.

Devido a este cenário, o resultado do estudo recentemente publicado foi surpreendente porque em estando a mutação p.Arg337His na linhagem germinativa, deveria aparecer também na linhagem somática (tumor) o que não tem sido demonstrado em bancos de dados com milhares de amostras. Ressalta-se que a grande maioria dos tumores nestas bases de dados públicas não são de pacientes brasileiros. Sendo assim, a proposta de emenda visa a determinação da frequência da mutação p.Arg337His no gene TP53 em 600 casos de adenocarcinoma de pulmão (linhagem somática, análise no tumor) já coletados no âmbito do Programa de Medicina Personalizada do HCPA. Esta seria uma oportunidade de confirmação da possível associação entre a mutação p.Arg337His em TP53 e câncer de pulmão em uma população onde a mutação ocorre

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.730.011

frequentemente (0.3% da população geral). Diferente do estudo já publicado com amostras de pacientes, estaremos fazendo a análise do tumor e não sangue. O resultado do sequenciamento de TP53 no tumor (primeiramente por análise de qPCR da mutação e depois por sequenciamento de nova geração, NGS) permitirá também fazer uma inferência sobre a frequência da mutação germinativa. Para confirmar se essa inferência é real, teremos que propor, posteriormente um segundo projeto prospectivo coletando amostras de sangue e tumor para avaliar a frequência nas linhagens germinativa e somático do mesmo indivíduo, respectivamente.

As amostras incluídas no estudo que propomos com esta emenda serão desidentificadas, ou seja, nenhuma informação clínica será levada em consideração e relacionada ao resultado do status dessa mutação. Cabe ressaltar que a análise do tumor não permite dizer com certeza se a mutação está apenas no tumor ou também na linhagem germinativa. Apenas se pode fazer uma inferência pela frequência alélica obtida na análise por NGS. Como não temos ainda a certeza dessa alta frequência mutacional no sangue ou tumor (apenas um artigo publicado), solicitamos dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), entendendo que não seria exequível do ponto de vista prático e que num cenário ainda de incerteza sobre o significado, poderia ser mais ansiogênico do que benéfico para os pacientes. Se a alta frequência se confirmar, ai então se justificaria a realização de um estudo prospectivo como descrito anteriormente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta todos os documentos pertinentes para a avaliação da emenda.

Recomendações:

Na próxima atualização, harmonizar as informações do projeto e as informações básicas da Plataforma Brasil.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A emenda não apresenta pendências e está em condições de aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda incluída em 08/06/2018 aprovada.

Documento aprovado:

Nova versão de projeto de 08/06/2018 (projeto.docx)

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DE PACIENTES BRASILEIROS DIAGNOSTICADOS COM ADENOCARCINOMA DE PULMÃO

Pesquisador: Gabriel de Souza Macedo

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 4

CAAE: 83557418.5.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.875.206

Apresentação do Projeto:

As neoplasias de traqueia, brônquios e pulmão são os tipos de câncer que mais causam mortes no mundo, levando a cada ano aproximadamente 1,7 milhões de pessoas a óbito. Estima-se que em 10 anos o número de casos cresceu 29%, com 2 milhões estimados somente em 2015. Neoplasias pulmonares são divididas em dois grandes grupos: câncer de pulmão de células pequenas (CPCP) e câncer de pulmão de nãopequenas células (CPNPC), este último responsável por 85% dos casos. Apesar dos avanços em tratamentos nos últimos anos, a taxa relativa de sobrevivência de 5 anos é de apenas 15% para pacientes diagnosticados com CPNPC. Marcadores moleculares surgiram como uma nova ferramenta para auxiliar na terapêutica do câncer de pulmão, a qual baseia-se nas características histológicas e genéticas dos tumores. Por exemplo, deleções do éxon 19 e a substituição L858R do éxon 21 no gene EGFR estão associadas a altas taxas de resposta no tratamento com inibidores de tirosina quinase (ITQs). Já fusões de ALK e ROS1 apresentam uma taxa de resposta de 72% ao tratamento com crizotinibe. Recentemente foi aprovado um novo tratamento imunoterápico chamado de pembrolizumabe, droga recomendada para CPNPC que expressam altos níveis da proteína PD-L1. No entanto, uma resposta satisfatória com o uso de um único agente anti-PD-1/PD-L1 tem variado de 10% - 45% em pacientes positivos para este biomarcador. Outras mutações que conferem resistência aos tratamentos com ITQs

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.875.206

tratamentos, melhorando, assim, a reposta terapêutica e guiando novas políticas públicas para o tratamento desta neoplasia. Ressaltamos que não há benefícios diretos aos pacientes, apenas indiretos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de menda 2 com a seguinte justificativa:

(1) Acrescentar o seguinte objetivo específico: "Investigar a frequência da variante funcional TP53 rs78378222 (A>C) em amostras de tecido tumoral de adenocarcinoma de pulmão".

A razão para incluir esse objetivo se baseia em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, no qual uma variante germinativa rara, rs78378222 (A>C), que altera uma região não codificante do gene TP53, apresentou evidências de associação com o fenótipo da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e, sua variante, Li-Fraumeni-like (LFL). Tais síndromes são doenças autossômicas dominantes caracterizadas pela predisposição aumentada a uma ampla variedade de tumores em idade jovem, sendo associadas com mutações germinativas patogênicas no gene supressor tumoral TP53. Dentre os principais tumores que compõem o espectro desta síndrome podemos destacar os tumores do sistema nervoso central, carcinomas adrenocorticais, sarcomas, osteossarcomas e tumores de mama. Especificamente, o câncer de pulmão não tem sido descrito como um tumor frequente em pacientes portadores de mutações germinativas em TP53, embora vários casos tenham sido relatados em famílias SLF/LFL. Ainda no nosso estudo anterior, foi observada uma redução na expressão da proteína p53 em amostras biológicas de pacientes LFL portadores da variante. A saber, essa variante foi primeiramente descrita em um estudo de associação por varredura genômica (GWAS) como um alelo de risco para diversos tipos de tumores em populações da Europa e Estados Unidos, incluindo carcinoma basocelular, glioma, câncer de próstata e adenoma colorretal, com sua frequência nos casos variando de 0,7 a 4,9%. Em relação ao risco para câncer de pulmão, até o momento o único estudo que avaliou essa variante observou ausência de associação, no entanto, os autores não especificaram o subtipo histológico dos tumores analisados, bem como vale ressaltar que a população estudada foi exclusivamente de caucasianos não-hispânicos dos Estados Unidos. Mais recentemente, os resultados de uma metanálise robusta indicaram que o alelo rs78378222[C] foi significativamente associado com um risco aumentado para câncer em geral (OR=1.51, IC 95%=1.28-1.77).

Por outro lado, é importante destacar que a grande maioria dos estudos publicados até o momento sobre essa variante avaliou sua presença na linhagem germinativa de pacientes com câncer. Apenas um estudo que utilizou resultados de bancos de dados internacionais de variantes

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: oep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.875.206

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não apresenta pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda 2 aprovada.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1207575_E2.pdf	24/08/2018 16:33:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_ADENOCARCINOMA_GabrielMacedo_versao3_agosto2018.docx	24/08/2018 16:32:15	Igor Araujo Vieira	Aceito
Outros	termo_compromisso_utilizacao_de_dados_novo_participante.pdf	24/08/2018 16:29:50	Igor Araujo Vieira	Aceito
Outros	delegacao_de_funcoes_novo_participante.pdf	24/08/2018 16:28:03	Igor Araujo Vieira	Aceito
Outros	EMENDA02ago2018.doc	24/08/2018 10:29:17	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Outros	projeto.docx	08/06/2018 15:44:41	Gabriel de Souza Macedo	Aceito
Outros	EMENDA.doc	08/06/2018 15:28:14	Gabriel de Souza Macedo	Aceito
Orçamento	orcamento.pdf	08/06/2018 15:27:41	Gabriel de Souza Macedo	Aceito
Outros	STROBE_checklist_cohort.doc	15/03/2018 16:04:58	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Outros	RespostasParecer2537613Assinado.pdf	15/03/2018 16:04:27	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Outros	RespostasParecer2537613.doc	15/03/2018 16:03:57	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Parecer Anterior	PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_2537613.pdf	15/03/2018 16:00:47	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	15/03/2018 15:59:32	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	fomulario_de_autorizacao_das_areas_para_projetos_de_pesquisa_e_desenvolvimento.pdf	22/02/2018 16:04:06	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	termo_de_compromisso_para_utilizacao_de_dados_prontuarios_.pdf	22/02/2018 16:03:27	TIAGO FINGER ANDREIS	Aceito

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Associação entre mutações do receptor de androgênios em tumores de próstata

Pesquisador: Ilma Simoni Brum da Silva

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 09346919.9.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: HOSPITAL DE CLINICAS DE PORTO ALEGRE

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.346.999

Apresentação do Projeto:

As doenças da próstata atingem cerca de 80% dos homens com idade superior a 50 anos, sendo que as duas formas mais comuns são a hiperplasia prostática benigna (HPB) e o câncer de próstata (CaP), ambas resultantes da proliferação celular anormal. O CaP é o segundo tipo de câncer mais incidente no Brasil, tendo o Rio Grande do Sul (RS) como o estado com a maior prevalência. É sabido que os androgênios possuem um papel crucial na glândula prostática e que suas ações são mediadas pelo receptor celular denominado receptor de androgênios (AR), um receptor nuclear que age como fator de transcrição dependente de ligante. Sendo assim, alterações no AR e no gene supressor tumoral TP53 podem estar relacionadas com o desenvolvimento da HPB e do CaP. Visto que o crescimento de células do CaP é dependente da ação dos androgênios, a privação hormonal é a principal terapia utilizada, porém, alguns homens desenvolvem resistência e o tumor continua progredindo, invadindo órgãos próximos (bexiga e uretra) e distantes (ossos, fígado e pulmões). Mutações do AR têm sido apontadas como fatores de resistência à terapia antiandrogênica e recidiva bioquímica em tumores avançados, mas, pouco se sabe de seu papel no tumor primário. Duas importantes mutações relacionadas à resistência terapêutica já foram descritas: AR-T878A e AR-Q784*. Além das mutações do AR, o gene TP53 também está associado ao desenvolvimento de tumores. A variante germinativa rara rs78378222 (A>C) do gene TP53 predispõe a uma ampla variedade de tumores em idade jovem, porém, o CaP não tem sido descrito como um tumor frequente em pacientes portadores de mutações germinativas em TP53. A

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-003
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

elucidação dos mecanismos envolvidos neste processo e o manejo de tumores primários são necessários para que seja possível diferenciar tumores indolentes daqueles com alto potencial de malignidade e/ou propor novas alternativas para o controle da HPB. Sendo assim, o Projeto "Associação entre mutações do receptor de androgênios em tumores de próstata e a agressividade tumoral" é um estudo transversal que tem como objetivo principal descrever a frequência das mutações AR-T878A, AR-Q784* e rs78378222 (A>C) em uma amostra de pacientes do RS e avaliar possível associação ao desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica. Os resultados serão obtidos a partir de análises moleculares do DNA genômico extraído de amostras de sangue e tecido prostático de 237 pacientes atendidos no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

- Descrever a frequência das mutações de receptores de androgênio, AR-T878A e AR-Q784*, e da variante funcional rs78378222 em uma amostra de pacientes do Rio Grande do Sul submetidos à cirurgia de próstata, por hiperplasia prostática benigna ou câncer de próstata, no Serviço de Urologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e avaliar sua possível implicação no desenvolvimento, agressividade tumoral e recidiva bioquímica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a presença das mutações do AR, AR-T878A e AR-Q784*, nos grupos HPB e CaP e descrever suas frequências.

- Determinar a frequência da variante funcional rs78378222 em amostras de DNA genômico de pacientes com CaP e HPB.

- Avaliar o risco de desenvolvimento de CaP em pacientes com a presença das mutações em análise.

- Avaliar a concordância da presença das mutações em análise no DNA genômico de amostras de sangue e de tecido prostático derivadas de pacientes com CaP e HPB.

- Avaliar se as variantes AR-T878A, AR-Q784* e rs78378222 apresentam efeito modificador de fenótipo no mesmo grupo de pacientes com CaP, considerando as seguintes manifestações clínicas: idade ao diagnóstico, agressividade tumoral, desenvolvimento de resistência à deprivação androgênica e recidiva bioquímica;

- Verificar se existe associação entre o genótipo para a variante rs78378222 com os níveis de expressão de mRNA TP53 analisados anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa em tecido

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3350-7640 Fax: (51)3350-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 3.346.999

Recomendações:

Os pesquisadores devem incluir no TCLE, versão re consentimento, que há riscos de quebra de confidencialidade em relação à manipulação de dados dos participantes e que esse risco será minimizado pelo uso de códigos, e não nomes dos participantes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 3.283.865 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 06/05/2019. Não apresenta novas pendências.

Ver recomendações

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (versão projeto 17/04/2019 TCLE 06/05/2019 (ver recomendação e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 237 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com pacientes incluídos no centro HCPA, assim como os desvios de protocolo quando envolver diretamente estes pacientes, deverá ser realizada através do Sistema GEO (Gestão Estratégica Operacional) disponível na intranet do HCPA.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de metilação gene específico do receptor de progesterona total em leiomiomas uterinos.

Pesquisador: Helena von Eye Corleta

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 93970518.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.910.306

Apresentação do Projeto:

Leiomiomas uterinos ou miomas são tumores benignos que se desenvolvem no miométrio e acometem cerca de 50% da população feminina. Têm como principais sintomas associados, sangramento excessivo e dor pélvica inespecífica. São classificados de três formas: intramurais, quando localizados no interior da parede uterina; submucosos, quando se projetam para a cavidade endometrial, e subserosos quando se projetam para a superfície externa do útero. Convencionalmente o estrogênio é considerado o responsável pelo início da proliferação tumoral, mas recentes evidências bioquímicas, histológicas e clínicas sugerem que a progesterona, agindo por meio dos seus receptores celulares também promova a proliferação celular nos leiomiomas uterinos. Além da ação dos hormônios esteroides e seus receptores, mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA parecem estar envolvidos na etiologia desses tumores. A metilação do DNA influencia na condensação da cromatina e conseqüentemente afeta diretamente a expressão gênica. Importante salientar que, somente nos EUA são realizadas 240 mil histerectomias/ano para tratar essa doença sendo considerado um problema de saúde pública. Frente a esses dados é imprescindível o entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento desses tumores e a busca de tratamentos menos invasivos. **Objetivos:** verificar se (1) a metilação global do DNA é igual em miométrio e em leiomiomas (2) se a metilação no receptor de progesterona é maior leiomiomas uterinos quando comparado ao miométrio, e (3) analisar e correlacionar os dados de metilação global e gene específico com a expressão gênica dos

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.910.306

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE.

Recomendações:

- * Deve ser acrescentado na versão aprovada do TCLE a informação essencial, antes das opções de armazenar as amostras: "Caso você concorde com o armazenamento, a nova utilização será apreciada pelo Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado novamente para consentir com o uso do material."
- * Embora os pesquisadores tenham reiterado que o material será coletado "após o término da cirurgia", não fica claro se a coleta ocorrerá no material já retirado ou diretamente na paciente. Sugerimos esclarecer verbalmente no processo de consentimento.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.849.660 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 30/08/2018. Não apresenta novas pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Lembramos que a presente aprovação (Projeto versão de 30/08/2018, TCLE versão de 30/08/2018 incluindo as Recomendações, e demais documentos que atendem às solicitações do CEP) refere-se apenas aos aspectos éticos e metodológicos do projeto.

Os pesquisadores devem atentar ao cumprimento dos seguintes itens:

- a) Este projeto está aprovado para inclusão de 50 participantes no Centro HCPA, de acordo com as informações do projeto ou do Plano de Recrutamento apresentado. Qualquer alteração deste número deverá ser comunicada ao CEP e ao Serviço de Gestão em Pesquisa para autorizações e atualizações cabíveis.
- b) O projeto deverá ser cadastrado no sistema AGHUse Pesquisa para fins de avaliação logística e financeira e somente poderá ser iniciado após aprovação final do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação.
- c) Qualquer alteração nestes documentos deverá ser encaminhada para avaliação do CEP. Informamos que obrigatoriamente a versão do TCLE a ser utilizada deverá corresponder na íntegra à versão vigente aprovada.
- d) Deverão ser encaminhados ao CEP relatórios semestrais e um relatório final do projeto.
- e) A comunicação de eventos adversos classificados como sérios e inesperados, ocorridos com

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229
Bairro: Santa Cecília CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cep@hcpa.edu.br

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

Carta de Aprovação

Projeto

2018/0517

Pesquisadores:

HELENA VON EYE CORLETA

ILMA SIMONI BRUM DA SILVA

GABRIELA DOS SANTOS SANT
ANNA

ANA PAULA DE BORTOLI

Número de Participantes: 50

Título: Análise de metilação gene específico do receptor de progesterona total em leiomiomas uterinos.

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos, metodológicos, logísticos e financeiros para ser realizado no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Esta aprovação está baseada nos pareceres dos respectivos Comitês de Ética e do Serviço de Gestão em Pesquisa.

- Os pesquisadores vinculados ao projeto não participaram de qualquer etapa do processo de avaliação de seus projetos.

- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG).



Assinado digitalmente por:
PATRICIA ASHTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação

00112018 13:38:06

<https://www.hospitalclinicas.com.br/portal/assinatura/verificar-assinatura.aspx?codigo=00112018133806>

13.4.2. Estudo dos modificadores de fenótipo na SLF

HOSPITAL DE CLÍNICAS DE
PORTO ALEGRE - HCPA /
UFRGS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação do papel do SNP rs2043556 no gene MIR605 como potencial modificador de fenótipo na Síndrome de Li-Fraumeni.

Pesquisador: PATRICIA ASHTON PROLLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 52641616.0.0000.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: FIPE/HCPA

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.458.864

Apresentação do Projeto:

O projeto "Avaliação do papel do SNP rs2043556 no gene MIR605 como potencial modificador de fenótipo na Síndrome de Li-Fraumeni" é um estudo retrospectivo, observacional transversal, que pretende verificar se o polimorfismo rs2043556 do gene MIR605 pode exercer algum efeito modificador de fenótipo em pacientes com SLF/LFL portadores da mutação germinativa TP53 p.Arg337His, bem como em portadores de mutações clássicas (domínio de ligação ao DNA) do gene TP53. É um projeto que utilizará amostras de pacientes do HCPA (casos e controles) e de outras instituições brasileiras, as co-participantes Hospital de Câncer de Barretos/SP e Hospital A.C. Camargo/SP (casos).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo geral

Determinar as frequências alélicas e genotípicas e o efeito sobre fenótipo da variante rs2043556 (A>G) do gene MIR605 em indivíduos brasileiros com fenótipo da SLF/LFL portadores da mutação germinativa p.Arg337His e de mutações localizadas no domínio de ligação ao DNA de p53, bem como estudar os mecanismos funcionais potencialmente envolvidos na modulação fenotípica associada a essa variante.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F

Bairro: Bom Fim

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cephcpa@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 1.458.864

portadores tanto da mutação germinativa p.Arg337His no gene TP53 quanto da variante rs2043556 no gene MIR605.

- O projeto inclui referencial teórico, justificativa, objetivos, descrição das amostras e do cálculo amostral, descrição da metodologia, descrição dos riscos e benefícios no formulário da Plat Br, descrição breve e pontual de alguns testes estatísticos que serão utilizados para avaliar os resultados de dois tipos de experimentos, referências bibliográficas e cronograma de atividades. Os autores também incluíram o Formulário de Delegação de Funções, o Termo de Compromisso para Utilização de Material Biológico e Informações Associadas, o Termo de Compromisso para Utilização de Dados, e a Declaração de Ciência do Estudo e de Corresponsabilidade da Pesquisadora do Hospital de Câncer de Barretos/SP.

- Os autores apresentam apenas um orçamento simplificado do projeto, pois este não inclui todos os materiais e reagentes necessários para a execução do projeto. E, justificam que não incluíram TCLE para os casos porque todas estas amostras foram obtidas em estudos anteriores aprovados nos respectivos comitês de ética institucionais com a finalidade de genotipar TP53 e genes modificadores de fenótipo da síndrome de SLF/LFL, e que os pacientes consentiram com o armazenamento e uso posterior do seu material genético. Da mesma forma, não incluíram o TCLE dos casos porque as pacientes consentiram com o uso de suas amostras em estudos futuros de análise de polimorfismos genéticos que porventura pudessem estar associados a câncer e a câncer de mama.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Apresenta termo de compromisso para utilização de material biológico e informações associadas assinado pelos pesquisadores.
- Apresenta termo de compromisso para utilização de dados de prontuário assinado pelos pesquisadores.

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 1.406.768 foram adequadamente respondidas

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2227 F
Bairro: Bom Fim CEP: 90.035-903
UF: RS Município: PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3359-7640 Fax: (51)3359-7640 E-mail: cepcpa@hcpa.edu.br

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Caracterização molecular da região 5' e 3' UTR do gene TP53, perfil de transcriptoma e potenciais modificadores de fenótipo na síndrome de Li-Fraumeni.

Pesquisador: PATRICIA ASHTON PROLLA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 96211017.7.1001.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.940.234

Apresentação do Projeto:

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) e sua variante, a Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL), são síndromes autossômicas dominantes de predisposição hereditária a vários tipos de câncer diagnosticados em idade jovem. Os tumores mais comuns em indivíduos com a doença, também chamados tumores centrais da síndrome são os sarcomas de partes moles e osteosarcomas, câncer de mama (CM), tumores cerebrais, leucemias e carcinoma

adrenocortical. Mutações germinativas no gene supressor tumoral TP53 estão associadas com a síndrome, sendo estas identificadas em aproximadamente 70% e 40% das famílias que preenchem critérios clínicos para a SLF e LFL, respectivamente. Atualmente, o diagnóstico molecular de pacientes que preenchem critérios clínicos para síndrome de SLF/LFL se concentra principalmente no rastreamento de mutações em regiões codificantes (éxons 2-11) e junções éxon-intron no gene TP53. Poucos estudos incluem as regiões regulatórias 5' e 3'UTR no sequenciamento do gene, sugerindo que as mesmas podem ser negligenciadas na rotina de diagnóstico molecular da doença. Recentemente, em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa, a variante germinativa rara rs78378222 (A>C), que altera o sinal de poliadenilação constitutivo localizado na região 3'UTR do gene TP53, apresentou evidências de associação com o fenótipo da síndrome de

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3350-7640

Fax: (51)3350-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br

Continuação do Parecer: 2.940.234

imediatos para os pacientes SLF/LFL participantes da pesquisa, mas poderão no futuro, face a estudos adicionais, beneficiar outros pacientes que apresentarem a síndrome estudada. Caso sejam identificados pacientes com variantes potencialmente patogênicas situadas na região 5' e 3'UTR de TP53 e, futuramente, os pesquisadores

apresentarem recursos financeiros para realizar ensaios de validação funcional, ou existirem evidências mais robustas de patogenicidade, um novo estudo será submetido ao CEP/HCPA e os pacientes portadores das mesmas serão convidados a participar e deverão fornecer um novo consentimento para utilização dos seus materiais biológicos, dessa vez levando em consideração as implicações clínicas diretas na sua vida e na de

seus familiares no caso da confirmação de patogenicidade da variante; (c) as abordagens experimentais previstas no presente projeto consistem em análises moleculares envolvendo TP53 e genes que atuam como potenciais reguladores da sua expressão (potenciais modificadores de fenótipo da síndrome), como o gene MIR34A. Portanto, esses objetivos são idênticos àqueles desenvolvidos nos projetos anteriormente aprovados em que foram obtidas as amostras de DNA genômico para as quais solicita-se nesse momento dispensa de TCLE para manipulação e utilização. É importante destacar que todos os pacientes a serem incluídos já foram consentidos para genotipagem do gene TP53 e, no estudo aqui apresentado, o principal objetivo é avaliar regiões regulatórias do mesmo gene.

Recomendações:

Nos TCLEs, página 3, sugere-se substituir o trecho :

"Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material."

Por:

"Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para reconseguir com o uso do material, de acordo as resoluções vigentes."

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências emitidas para o projeto no parecer 2.891.399 foram adequadamente respondidas pelos pesquisadores, conforme carta de respostas adicionada em 26/09/2018. Não apresenta novas pendências.

Endereço: Rua Ramiro Barcelos 2.350 sala 2229

Bairro: Santa Cecília

CEP: 90.035-903

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)3359-7640

Fax: (51)3359-7640

E-mail: cep@hcpa.edu.br