

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: ENDOCRINOLOGIA

PAPEL DA MUTAÇÃO GERMINATIVA TP53 *p.R337H* NO
CANCER PAPILAR DE TIREOIDE

CARLA BRAUNER BLOM

Orientador: Profa. Dra. Ana Luiza Maia

Colaborador: Profa. Dra. Patricia Ashton-Prolla

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Endocrinologia, UFRGS,
como requisito para obtenção do título de Mestre

Porto Alegre, dezembro de 2014

Dedicatória

Aos pacientes, que me ensinam diariamente.

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora neste trabalho, Profa Dra Ana Luiza Maia, pelo conhecimento, pelo apoio, pela paciência e pela amizade. Em vários momentos foi muito além da orientação acadêmica.

À minha colaboradora, Profa Dra Patricia Ashton-Prolla, pela disponibilidade e ensinamento.

Aos meus bolsistas de iniciação científica, Mariana Carlucci e Arthur Garbin pela atenção e ajuda nas coletas de pacientes e confecção do banco de dados.

Às colegas do Laboratório de Endocrinologia, Lucielli Ceolin, Mirian Romitti e Carla Vaz por me ensinarem os passos e as técnicas necessárias para a realização deste projeto.

À Shana Weber por concluir a extração do DNA e diluição das amostras.

À Juliana Giacomazzi e ao Rudinei Correa pela realização das análises genéticas e disponibilidade em esclarecer as minhas dúvidas.

Ao Rafael Scheffel e José Miguel Dora, pela amizade, pelas conversas bem humoradas, pelo apoio e pelo incentivo.

Aos funcionários do Centro de Pesquisas Clínicas, pelas coletas de sangue.

À minha família, pelo apoio.

E, finalmente, àqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração e condução deste estudo, gostaria de expressar o mais profundo agradecimento.

“If we have been able to see further, it is because we stand on the shoulders of those who have gone before us”

(Isaac Newton)

“In the last analysis, we see only what we are ready to see, what we have been taught to see. We eliminate and ignore everything that is not a part of our prejudices.”

(Jean-Martin Charcot)

Esta Dissertação de Mestrado segue o formato proposto pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas: Endocrinologia, Metabolismo e Nutrição, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Ao longo do período do Mestrado, foi ainda desenvolvido o seguinte trabalho:

Relato de Caso e Artigo de Revisão:

The rare intracellular RET mutation p.Ser891Ala in an apparently sporadic medullary thyroid carcinoma: a case report and review of the literature. Publicado nos Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia 2012: 56(8) 586-591.

Resumo

Introdução: O câncer papilar de tireóide (CPT) é responsável pela maioria dos tumores malignos da tireóide. O CPT pode ocorrer como parte de síndromes genéticas hereditárias em aproximadamente 5% dos casos, mas não está incluído no espectro de tumores da síndrome de Li-Fraumeni (LFS). Entretanto, em pacientes com LFS carreadores da mutação germinativa TP53 *R337H*, o CPT é o segundo tipo de câncer mais prevalente, sugerindo ele que possa fazer parte do espectro das neoplasias relacionadas à síndrome. A prevalência da mutação *p.R337H* em pacientes com CPT não é conhecida.

Objetivo: Determinar a prevalência da mutação germinativa TP53 *p.R337H* e correlacioná-la com as características clínicas e oncológicas em uma coorte de pacientes com PTC.

Desenho, Métodos e pacientes: Coorte aleatória de pacientes com PTC em atendimento em Hospital Terciário Universitário. A extração de DNA de sangue periférico foi realizada através do protocolo de precipitação de sal (Puregene Gentra®) e através do kit GE. A identificação da mutação do TP53 *R337H* foi realizada pelo ensaio TaqMan – PCR em Tempo Real. Dados clínicos e laboratoriais foram obtidos de registros em prontuários e por meio de entrevistas individuais.

Resultados: Um total de 62 pacientes com CPT foi incluído. A idade média dos pacientes no momento do diagnóstico foi de 48.1 ± 16.2 anos e 53 (85.5%) eram mulheres. O tamanho mediano do tumor foi de 2.3 (1.3-3.7), 23 (37.1%) pacientes tiveram metástases linfonodais e 3 (4.8%) apresentaram metástases à distância. A maioria (37 pacientes; 59.7%) apresentaram categoria I do TNM e foram classificados como Baixo Risco pelo ATA (3; 53.2%). Exposição à radiação ionizante na infância estava presente em 4 (6.5%) pacientes e 9 (14.5%) tinham uma história familiar positiva para CPT. Apenas um paciente apresentou as características da Síndrome de Li-Fraumeni. Nenhum dos pacientes analisados foi positivo para a mutação *p.R337H*. De modo interessante, 6 (9.7%) pacientes tinham história de câncer de mama e de tireóide sincrônicos. Eles apresentaram idade maior no momento do diagnóstico do PTC (55.73 ± 10.0 vs. 44.53 ± 14.63 ; $p=0.004$), mas nenhuma outra característica clínica ou oncológica específica foi identificada neste subgrupo de pacientes.

Conclusões: A mutação germinativa TP53 *p.R337H*, não foi identificada em uma coorte de pacientes com PTC. Baseado em dados da literatura, a prevalência da mutação pode ter sido superestimada e, a possibilidade de uma população não representativa deve ser considerada.

Palavras-Chave: Carcinoma papilar de tireóide; mutação terminativa *p.R337H*

Lista de Quadros

Quadro 1. Critérios Revisados de Chompret para teste do TP53	14
Quadro 2: Síndromes Hereditárias associadas a Câncer Diferenciado de Tireóide.	19

Lista de Tabelas

Tabela 1. Clinical and Oncological features of PTC patients.....	40
Tabela 2. Clinical and Oncological features of 520 female PTC patients: Comparison between patients with or without breast cancer	41

Lista de Figuras

Figura 1. TP53 e suas partes	16
Figura 2. Neoplasias malignas da tireóide	18

Lista de Abreviaturas e Siglas

ATA - American Thyroid Association

CA - California

CAC - Carcinoma adrenocortical

CAT - Câncer anaplásico de tireóide

CDT - Câncer diferenciado de tireóide

CFT - Câncer folicular de tireóide

CNV - variação do numero de cópias

CPT - Câncer papilar de tireóide

DE - Delaware

DNA - Ácido desoxirribonucleico

DTC - Differentiated thyroid cancer

dp – Desvio padrão

ER – Estrogen receptor

FTC - Follicular thyroid cancer

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

HNMTTC - Hereditary non medullary thyroid cancer

IARC - International Agency for Research on Cancer

Inc. - Incorporation

kD - Kilodalton

LFL - Li-Fraumeni Like

LFS - Síndrome de Li-Fraumeni / Li-Fraumeni Syndrome

NCCN - National Comprehensive Cancer Network

PCR - Polymerase Chain Reaction

pH - Potencial de hidrogênio

PTC - Papillary thyroid cancer

RET/PCT – Rearranged during transfections/papillary thyroid cancer

R337H - mutação CGC para CAC no codon 337

sd - Standard deviation

TNM - Classificação de tumores malignos (T= tumor, N= linfonodo, M= metástases)

TP53 - gene supressor de tumor P53

USA - United States of America

WI - Wisconsin

X² - qui-quadrado

FAP – Adenomatose Poliposa Familiar

Sumário

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	12
1.1 Síndrome de Li Fraumeni	12
1.1.1 Definição	12
1.1.2 Critérios diagnósticos	12
1.1.3 Risco de câncer e protocolos de acompanhamento	14
1.1.4 TP53 e Síndrome de Li-Fraumeni / Li-Fraumeni Like	15
1.2 Mutação germinativa <i>p.R337H</i>	17
1.3 <i>p.R337H</i> e carcinoma Papilar de Tireóide.....	18
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	22
3 OBJETIVO.....	26
4 ARTIGO ORIGINAL	28
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
6 APÊNDICES	43
6.1 Ficha Clínica	43
6.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	45

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Síndrome de Li-Fraumeni

1.1.1 Definição

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma rara síndrome de predisposição hereditária ao câncer, descrita inicialmente em 1969 pelos epidemiologistas Frédérick Li e Joseph Fraumeni, a partir de quatro famílias identificadas em um estudo retrospectivo de 280 prontuários médicos e de 418 certificados de óbito de crianças com diagnóstico de rabdomiossarcoma nos Estados Unidos, de 1960 a 1964 (1,2). Análises de segregação e estudos epidemiológicos posteriores confirmaram tratar-se de uma síndrome autonômica dominante (3-5), comumente associada a mutações germinativas no gene supressor de tumor p53 (TP53), que predispõe indivíduos afetados ao surgimento de múltiplas neoplasias malignas de início precoce, e pode afetar diversos membros da mesma família (6). Dentre as neoplasias associadas à LFS se incluem sarcomas de partes moles e osteossarcomas, cancer de mama pré-menopáusico, tumores cerebrais, carcinomas adrenocorticais e leucemias agudas (7,8).

1.1.2 Critérios diagnósticos

Os critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni “Clássica” foram baseados na análise prospectiva de 24 famílias e definidos como: um probando com sarcoma diagnosticado antes dos 45 anos; um familiar de primeiro grau com qualquer câncer antes dos 45 anos; outro familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 45 anos OU sarcoma em qualquer idade (5).

Relatos posteriores descreveram a ocorrência de um espectro tumoral mais amplo em pacientes portadores da síndrome, incluindo cânceres de pulmão,

próstata, estômago, cólon, tumores de células germinativas, carcinoma de plexo coróide, melanoma, linfoma e tumor de Wilms (9-11).

Aquelas famílias que não se enquadravam nos critérios da LFS clássica, foram caracterizadas inicialmente como apresentando um fenótipo incompleto da síndrome e chamadas coletivamente de Li-Fraumeni Like (LFL). Diversos critérios diagnósticos de LFL foram descritos e refinados (12-14). A versão atual dos critérios de Chompret, data de 2009 (Quadro 1), inclui um probando com um tumor da LFS antes dos 46 anos e um familiar de primeiro ou segundo grau com um tumor da LFS antes dos 56 anos. Os tumores considerados típicos da LFS são sarcomas ósseos ou de partes moles, tumores cerebrais, cânceres de mama antes da menopausa, leucemias, carcinomas adrenocorticais (CAC) e carcinomas broncoalveolares. Câncer de mama em familiar de primeiro ou segundo grau é excluído se o probando tem cancer de mama. Alternativamente, o probando deve ter múltiplos tumores (excluindo-se múltiplos cânceres de mama), sendo que pelo menos dois deles façam parte do espectro tumoral da LFS, e que o primeiro tenha surgido antes dos 46 anos de idade. Finalmente, um probando com CAC ou carcinoma de plexo coróide, independentemente da história familiar, também preenche critérios para a testagem do TP53 (15).

Quadro 1: Critérios Revisados de Chompret para teste do TP53

Probando com um tumor da LFS* antes dos 46 anos E

familiar de primeiro ou segundo grau com um tumor da LFS** antes dos 56 anos ou múltiplos tumores

OU

Probando com múltiplos tumores (excluindo-se múltiplos cânceres de mama), o primeiro ocorrendo antes dos 46 anos de idade, sendo pelo menos dois deles do espectro tumoral da LFS

OU

Probando com CAC ou carcinoma de plexo coróide, independentemente da história familiar

*Inclui sarcomas ósseos ou de partes moles, tumores cerebrais, cânceres de mama antes da menopausa, leucemias, carcinomas adrenocorticais (CAC) e carcinomas broncoalveolares

** Exceto câncer de mama se o probando tem cancer de mama

(Adaptado de Tinat et al. 2009)

1.1.3 Risco de Câncer e Protocolos de Acompanhamento

Estima-se que pacientes com LFS apresentem cerca de 50% de chances de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparados a 1% na população geral (16). No entanto, este panorama tem mudado à medida que a definição da síndrome foi ampliada. Para os indivíduos portadores de mutações genéticas associadas à LFS, o risco de desenvolver câncer durante a vida é significativamente mais alto para mulheres (100% x 73% para homens) e a idade de surgimento mais precoce (17), mesmo após análises ajustadas para câncer de mama, ovário e próstata (8,18). Portadores que desenvolveram tumor na infância apresentam uma

probabilidade cumulativa de 57% ($dp \pm 10\%$) de tumores secundários em 30 anos de seguimento. Apesar de indivíduos com LFS apresentarem uma maior tendência ao desenvolvimento de malignidades secundárias à radiação terapêutica, este fenômeno não pode ser atribuído isoladamente aos efeitos carcinogênicos do tratamento (5,19).

Por estes motivos, foram propostas diretrizes e protocolos para rastreamento das mutações do P53 e aconselhamento genético, assim como protocolos de rastreamento tumoral precoce em pacientes com LFS / LFL. O National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recomenda exame clínico anual incluindo avaliação neurológica e avaliação cuidadosa da pele; atenção especial para cânceres raros, novos tumores primários / secundários e cânceres pediátricos. Colonoscopia é aconselhada a cada 2-5 anos, a partir dos 25 anos de idade. Mamografia e/ou ressonância magnética das mamas anual é recomendada a partir dos 25 anos de idade ou antes, conforme a história familiar. Exames adicionais de vigilância são baseados no histórico de cada família (20).

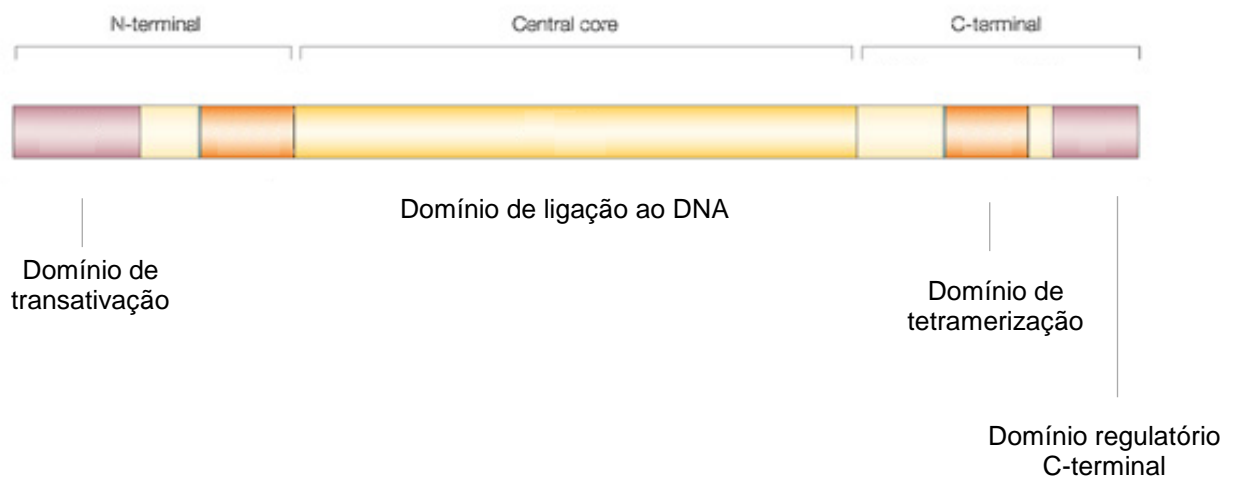
Mediante a presença aumentada de tumores pouco descritos na LFS/LFL, em 2006 foi proposta uma adaptação do protocolo à população brasileira. Foram incluídos exames para a detecção precoce de tumores colorretais e gástricos, avaliação renal por métodos de imagem e citologia oncótica e rastreamento de tumores de tireóide (21).

1.1.4 TP53 e Síndrome de Li-Fraumeni / Li-Fraumeni Like

O gene supressor de tumor TP53 (figura 1) foi descoberto em 1979. Localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD, p53, responsável pela regulação do ciclo celular, pela apoptose e pela estabilidade genômica (6,22-25). Sabe-se que mutações somáticas do TP53 foram observadas em mais de 50% dos cânceres humanos esporádicos (26). Essas mutações inativam as funções regulatórias de crescimento celular, causam a perda da atividade supressora de tumor e, em alguns casos, conferem uma função promotora de tumor, com a ativação de genes envolvidos na proliferação celular, no aumento da sobrevivência celular e na angiogênese (27).

Cerca de 80% das famílias com LFS “Classica” apresentam mutações germinativas no TP53, enquanto que nas famílias com LFL, essa prevalência gira ao redor dos 20-40% (28,29). A maioria das mutações ocorre no domínio de ligação ao DNA, sendo que 74% localizam-se entre os éxons 5 e 9 (30).

Figura 1- TP53 e suas partes



A ausência de mutações do TP53 em uma proporção considerável de famílias com LFS / LFL, sugere que outros tipos de alterações hereditárias contribuam para a susceptibilidade ao câncer. Alterações pós-translacionais ou deleção completa da p53, efeitos de genes modificadores ou alterações de outros genes poderiam explicar fenótipos específicos, enquanto que as mutações germinativas do TP53 estabeleceriam o risco basal de desenvolvimento de tumores na LFS. Recentemente foi sugerido que o aumento do número de cópias de um segmento de DNA (CNV, do inglês, copy number variable) possa contribuir para a variabilidade fenotípica da LFS (31).

1.2. Mutação germinativa *p.R337H*

Dentre as mutações germinativas do TP53 identificadas na LFS, a grande maioria foi descrita no domínio de ligação do DNA, nos exons 5 a 8. No Sul e Sudeste do Brasil, uma mutação germinativa específica no domínio de oligomerização do gene TP53 (éxon 10, códon 337) foi inicialmente descrita em crianças com CAC, sem história familiar documentada de câncer. Posteriormente, confirmou-se a presença da *p.R337H* em pacientes com CAC e carcinoma de plexo coróide, sem história familiar clássica para LFS (32). Em famílias com LFS/LFL, ela corresponde à cerca de 46,1% de todas as mutações germinativas encontradas e apresenta um amplo espectro tumoral, que inclui a alta incidência de câncer de tireóide e câncer renal, além de tumores típicos da LFS (33). Estudos independentes sugerem uma prevalência entre 0,27 a 0,3% da mutação *p.R337H* na população em geral do Sul e Sudeste do Brasil (34-36).

O mutante *p.R337H* é caracterizado pela troca do nucleotídeo guanina por uma adenina no segundo par de bases do códon 337 do éxon 10, resultando na troca de uma arginina por histidina. Esta alteração leva a uma inativação da proteína frente a condições de *pH* discretamente alcalino, interferindo com sua capacidade de ligar-se ao DNA (23). A partir destes dados, pode-se inferir que esta proteína mutante atue de maneira condicional e perca sua função apenas nas células que apresentam discreto aumento do *pH* intracelular, o que poderia justificar a baixa penetrância e o espectro tumoral heterogêneo das famílias portadoras da *p.R337H*.

A grande maioria dos casos de *p.R337H* foi descrita em famílias brasileiras, ainda que existam alguns relatos europeus desta mutação (37-39). Foi demonstrado que a mutação ocorre no mesmo haplótipo do TP53 em todos os carreadores brasileiros, evidenciando a presença de um efeito fundador que justificaria esta alta prevalência no Brasil (36,40,41).

Recentemente, diversos estudos têm demonstrado uma associação da mutação *p.R337H* com câncer de mama, sugerindo a avaliação do TP53 na rotina de investigação de pacientes com câncer de mama precoce no Brasil (42-45).

1.3. *p.R337H* e carcinoma papilar de tireóide

O câncer de tireóide é a neoplasia endócrina mais freqüente, sendo responsável por 1% do total de neoplasias malignas (0,5% do total de cânceres nos homens e 1,5% nas mulheres) (46). Dados brasileiros mostram que a incidência de neoplasia da tireóide em Porto Alegre é de 1,1/100.000 habitantes para homens e 2,7/100.000 habitantes para mulheres (47). O aumento da incidência do câncer de tireóide detectado em diferentes países tem sido atribuído à detecção precoce de tumores subclínicos (48).

Os três tipos histológicos mais comuns do câncer de tireóide são o carcinoma papilar de tireóide, carcinoma folicular de tireóide e carcinoma medular de tireóide. Os dois primeiros são denominados de carcinomas diferenciados da tireóide e correspondem a cerca de 90% das neoplasias malignas da glândula (46). O CPT corresponde de 70-90% dos carcinomas diferenciados (figura 2). Além da exposição à radiação ionizante na infância (49), o principal fator de risco para o CPT é a presença de um familiar de primeiro grau com história de câncer de tireóide, que representa um aumento de risco de até 10 vezes (50).

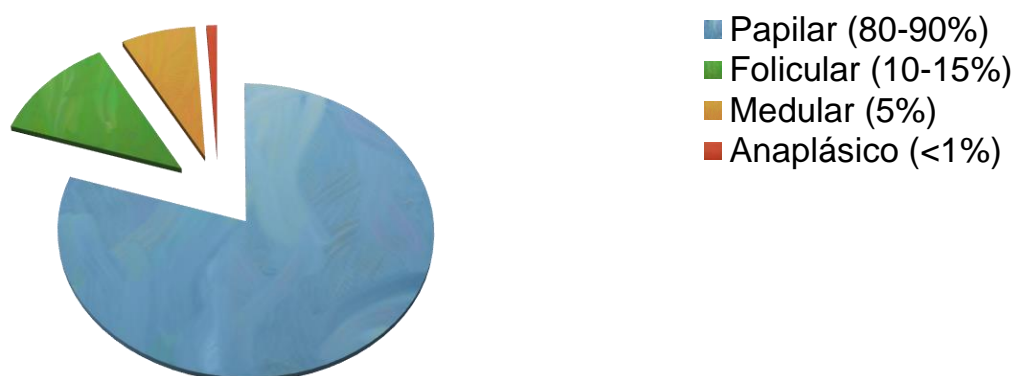


Figura 2 - Neoplasias malignas da Tireóide

O CDT também tem sido associado, em cerca de 5% dos casos, a herança familiar. Os casos de CDT familiar podem ser divididos em dois grupos clínico-patológicos. O primeiro, coletivamente chamado de PTC Familiar, necessita de dois ou mais indivíduos afetados de uma mesma família, e inclui tumores com ou sem oxifilia, aqueles associados ao bócio multinodular e ao carcinoma papilar de células renais. O segundo grupo se caracteriza por tumores diferenciados de tireóide como um componente menor de determinadas síndromes genéticas hereditárias como a Síndrome de Cowden, Síndrome de Werner, Complexo de Carney, Polipose adenomatosa familiar, entre outras (Quadro 2) (50-53).

Quadro 2: Síndromes Hereditárias associadas a Câncer Diferenciado de Tireóide

Síndrome	Tipo Histológico	Incidência de CDT
FAP e Gardner	CPT	2-12%
Cowden	CPT, CFT	> 10%
Complexo de Carney	CPT, CFT	64%
Werner	CPT, CFT, CAT	18%

CDT: Câncer diferenciado de tireóide; CPT: Câncer papilar de tireóide; CFT: Câncer folicular de tireóide; CAT: Câncer anaplásico de tireóide

(Adaptado de Dotto e Nosé et al. 2008)

Os casos de CDT hereditário têm sido associados a um padrão de doença mais agressivo que os esporádicos, maiores taxas de tumores multicêntricos, de metástases linfonodais, de invasão extra-tireoidiana e a menor taxa de sobrevida livre de doença.

O câncer papilar de tireóide não faz parte do espectro de neoplasias descritas nos critérios diagnósticos da LFS/LFL. Entretanto, este foi o segundo tipo de câncer mais prevalente (20%) em pacientes com LFS/LFL e mutação *p.R337H*, atrás apenas do câncer de mama (40%) (54), sugerindo CPT possa fazer parte do espectro tumoral associado a esta mutação.

2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71:747-52
2. Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1969;43:1365-73
3. Lynch HT, Mulcahy GM, Harris RE, et al. Genetic and pathologic findings in a kindred with hereditary sarcoma, breast cancer, brain tumors, leukemia, lung, laryngeal, and adrenal cortical carcinoma. *Cancer.* 1978 May;41(5):2055-64.
4. Strong LC, Stine M, Norsted TL. Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives. *J Natl Cancer Inst.* 1987; 79:1213-20
5. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48(18):5358-62.
6. Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutation in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 1990; 250(4985):1233-8.
7. Ruijjs MWG, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Gen.* 2010; 47: 421-428.
8. Gonzales KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With p53 Germline Mutations. *J Clin Onc.* 2009; 27:1250-1256.
9. Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, et al. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? *Cancer Genet Cytogenet.* 1989; 15;42(2):221-226.
10. Hartley AL, Birch JM, Tricker K, et al. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;67(2):133-135.

11. Nichols KE, Malkin D, Garber JE, et al. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10:83-7.
12. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li–Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994; 54:1298–1304.
13. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995;25:101-24.
14. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 2001;38:43-7.
15. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2009;27(26):e108-9.
16. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene.* 2001;20(34):4621-8.
17. Wu CC, Shete S, Amos CI, et al. Joint effects of germ-line p53 mutation and sex on cancer risk in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* 2006;66:8287-92.
18. Hwang SJ, Lozano G, Amos CI, et al. Germline p53 mutations in a cohort with childhood sarcoma: sex differences in cancer risk. *Am J Hum Genet.* 2003;72:975–983.
19. Hisada M, Garber JE, Fung CY, et al. Multiple primary cancers in families with Li–Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:606–611.
20. National Comprehensive Cancer Network (NCCN). 2013. Genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian. Version 4/2013.
21. Achatz MI. Diagnóstico molecular da Síndrome de Li-Fraumeni em famílias brasileiras. São Paulo: 2006. [Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente].
22. Birch JM. Germline mutations in the p53 tumour suppressor gene: scientific, clinical and ethical challenges. *Br J Cancer,* 1992; 66:424-426.

23. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*, 2002; 9:12-16.
24. Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res*, 2002; 511:45-62.
25. Volgestein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 2000; 408:307-310.
26. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science*. 1989;244:217-21
27. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene*. 2001;277(1-2):15-30
28. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res*. 2003;63:6643-50
29. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*. 2003;21:313-20
30. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat*. 2007; 28:622-629.
31. Silva AG, Krepschi ACV, Pearson PL, et al. 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*. 2014;9:63.
32. Giacomazzi J, Selistre SG, Rossi C, et al. Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer*. 2013;119:4341-4349.
33. Achatz MIW, Olivier M, Calvez FL, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters*, 2007; 245: 96-102.

34. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98:9330–9335.
35. Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 2008; 261:21-25.
36. Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol.* 2013; 31:2619–2626.
37. Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer.* 2000; 82:1932–1937.
38. Herrmann LJ, Heinze B, Fassnacht M, et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012; 97:E476–E485.
39. Waldmann J, Patsalis N, Fendrich V, et al. Clinical impact of TP53 alterations in adrenocortical carcinomas. *Langenbecks Arch Surg.* 2012; 397:209–216.
40. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2004; 48:647–650.
41. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat.* 2010; 31:143–150.
42. Assumpcao JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer.* 2008; 8:357.

43. Carraro DM, Folgueira MAK, Lisboa BCG, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. *PLoS One*. 2013; 8:e57581.
44. Cury NM, Ferraz VE, Silva WA Jr. TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hered Cancer Clin Pract*. 2014; 12:8.
45. Giacomazzi J, Graudenz MS, Osorio CA, et al. Prevalence of the TP53 p.R337H Mutation in Breast Cancer Patients in Brazil. *PLoS One*. 2014; 9(6):e99893.
46. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*, 2003; 361:501-511
47. Coeli CM, Brito AS, Barbosa FS, et al. Incidência e mortalidade por cancer de tireóide no Brasil. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, 2005; 49:503-509.
48. Brito JP, Morris JC, Montori VM. Thyroid cancer: zealous imaging has increased detection and treatment of low risk tumors. *BMJ*. 2013;347:f4706
49. Schneider AB, Sarne DH. Long-term risks for thyroid cancer and other neoplasms after exposure to radiation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2005; 1(2):82-91.
50. Pal T, Vogl FD, Chappuis PO, et al. Increased risk for nonmedullary thyroid cancer in the first degree relatives of prevalent cases of nonmedullary thyroid cancer: a hospital-based study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001; 86:5307-5312.
51. Dotto J., Nosé V. Familial thyroid carcinoma a diagnostic algorithm. *Adv. Anat. Pathol*. 2008; 15(6):332-349.
52. Nosé V. Familial non-medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr. Pathol*. 2008; 19(4):226-240.
53. Vriens M., Suh I., Moses W., Kebebew E. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1343–13491.

54. Cannavan MC. Diagnóstico Molecular de mutações germinativas no gene TP53 em pacientes portadores de múltiplos tumores primários ou tumores isolados típicos da síndrome de Li-Fraumeni. São Paulo, 2011. [Dissertação de Mestrado – Fundação Antônio Prudente].

3 OBJETIVO

Determinar a prevalência da mutação germinativa TP53 *p.R337H* em amostra aleatória de pacientes com carcinoma papilar de tireoide atendidos no Ambulatório de Tireoide do Serviço de Endocrinologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

4 ARTIGO ORIGINAL

ROLE OF GERMLINE TP53 R337H MUTATION IN PATIENTS WITH PAPILLARY THYROID CANCER

Carla Brauner Blom, M.D., Mariana Carlucci, Shana de Souto Weber, Arthur Garbin, Juliana
Giacomazzi M.D. Ph.D., Patricia Ashton-Prolla, M.D., Ph.D., and Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Thyroid Section, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre and Faculdade de
Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Running title: *TP53 R337H Germline Mutation in Thyroid Cancer*

Keywords: Papillary Thyroid Carcinoma, Germline R337H mutation

Correspondence and Reprints:

Ana Luiza Maia, M.D., Ph.D.

Thyroid Section, Endocrine Division, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Rua Ramiro Barcelos, 2350. CEP 90035 –003

Porto Alegre, RS, Brazil

Phone: 51-33310207 / Fax: 55-51-3332-5188

E-mail: almaia@ufrgs.br

Grant support: This work has been made possible due to grants from Conselho Nacional de
Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande
do Sul (FAPERGS), Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE)
and Programa de Apoio à Núcleos de Excelência (PRONEX), Brazil.

Abstract

Context: Papillary thyroid cancer (PTC) accounts for the majority of all thyroid malignancies. PTC can occur as part of inherited genetic syndromes in approximately 5% of cases, but it is not included in the spectrum of tumors described as Li-Fraumeni Syndrome (LFS). However, in LFS patients harboring the TP53 *R337H* germline mutation, this is the second most prevalent cancer, suggesting that PTC can be part of the spectrum of malignancies related to the syndrome. The prevalence of p.R337H mutation in patients with PTC is unknown.

Objective: To determine the prevalence of germline TP53 *p.R337H* mutation in a cohort of PTC patients and correlate with clinical characteristics and oncologic features.

Design, setting and patients: A cohort of unselected patients with PTC attending a tertiary care, university-teaching Hospital was included. DNA extraction from peripheral blood was held through protocol by salt precipitation (Puregene Gentra®) and through GE kit. The identification of TP53 mutation *p.R337H* was performed by TaqMan assay - Real-Time PCR. Clinical and laboratory data were obtained from medical records and individual interviews.

Results: A total of 62 PTC patients were included. The mean age of patients at the time of diagnosis was 48.1 ± 16.2 years and 53 (85.5%) were women. Exposure to radiation in childhood was present in 4 (6.5%) and 9 (14.5%) had a positive family history for PTC. The median tumor size was 2.3 (1.3-3.7) centimeters, 23 (37.1%) patients had lymph node metastasis and 3 (4.8%) had distant metastasis. The majority (37 patients; 59.7%) had TNM category I and were classified as a Low ATA risk (33; 53.2%). Exposure to radiation in childhood was present in 4 (6.5%) patients and 9 (14.5%) had a positive family history for PTC. Only one patient presented the features of Li-Fraumeni Syndrome / Li-Fraumeni-Like. None of the patients were positive for the R337H mutation. Interestingly 6 (9.7%) patients presented a synchronous thyroid and breast cancer. They were older at the time of PTC diagnosis (55.73 ± 10.0 vs. 44.53 ± 14.63 ; $p=0.004$), but no other particular clinical or oncological features were identified in this subgroup of patients.

Conclusions: The germline TP53 p.R337H mutation was not identified in a cohort of PTC patients. Based on previous data, the prevalence of the mutation may have been overestimated and the possibility of a none-representative population should be considered.

Introduction

Thyroid cancer is the most frequent endocrine malignancy, and accounts for 1% of all malignant neoplasia (0.5% of all malignancies in men and 1.5% in women). Differentiated thyroid cancer (DTC) includes papillary (PTC) and follicular cancer (FTC), and accounts for the vast majority (90%) of all thyroid malignancies. PTC alone accounts for 70-90% of DTC (1). It's incidence has increased strikingly in many countries (2-6), a finding that has been mainly attributed to the early detection of sub-clinical tumors of uncertain significance (7). Besides exposure to high levels of radiation in childhood (8), the main risk factor for PTC is history of thyroid cancer in first degree relative, which accounts for a 10 fold risk increase (9).

Differentiated thyroid cancer has been associated with certain inherited genetic syndromes in approximately 5% of cases, such as Cowden's Syndrome, Werner's Syndrome, Carney's Complex, Familial adenomatous polyposis, among others (10-12). Several studies have reported an increased incidence of thyroid cancer after a primary malignancy, and also a higher incidence of non-thyroidal neoplasias among thyroid cancer survivors (13-15). Recent data suggests that breast cancer and thyroid cancer might have a close association in women (16).

Li-Fraumeni Syndrome (LFS) is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome characterized by a variety of early onset tumors, including sarcomas, breast carcinomas, brain tumors, adrenocortical carcinomas and acute leukemias (17-20). Classic LFS was based on 24 families (21). More inclusive clinical classification schemes were described, which characterized Li Fraumeni-like syndrome (LFL) as having an incomplete phenotype of LFS (22-24). More recently alternative criteria for identifying patients with p53 germline mutations were adapted by Tinat et al. in 2009 (25).

Germline mutations in the tumor suppressing gene TP53 are described in about 80% of LFS and 20-40% of LFL cases (26, 27). The TP53 gene codes for a transcription factor implicated in cell proliferation, apoptosis, and genomic stability (28-31). Although the majority of mutations are located in the central DNA binding-core domain, mutations are also described in the homo-oligomerization domain.

Among the mutations identified in patients with LFS, Achatz et al. demonstrated that the germline TP53 *p.R337H* mutation is highly prevalent in southern and southeastern Brazil, accounting

for 46,1% of all germline mutations (32). In Cannavan's study, *p.R337H* accounted for 71,4% of all mutations found in patients with multiple primary tumors (33). Studies in asymptomatic individuals (34) and newborns (35) suggest a prevalence of 0.15 to 0.39% for the *p.R337H* mutation in general population. The *p.R337H* mutant, characterized by a guanidine to adenine exchange at the second base pair in codon 337, exon 10, results in arginine to histidine exchange, leading to an inactivation of the protein in front of alkaline pH conditions, interfering with its ability to bind DNA (36). Interestingly, family carriers of this mutation had a broader tumor spectrum that included high incidence of thyroid and kidney cancer, besides typical LFS tumors. PTC is not part of the spectrum of neoplasia described in the LFS/LFL. In patients with features suggestive of LFS / LFL harboring *p.R337H* mutation, PTC was the second most prevalent type of cancer (20%), only behind breast cancer (40%) (33), suggesting that PTC can be part of the tumor spectrum associated with this mutation.

In this study, we aimed to evaluate the prevalence germline TP53 *p.R337H* mutation in a cohort of patients with PTC. Moreover, we have accessed the prevalence of synchronous thyroid and breast cancer in our cohort.

Material and Methods

Patients and study design

We evaluated a cohort of unselected individuals with PTC attending the Thyroid Outpatient Clinic of the Endocrine Division of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), a tertiary care, university-teaching Hospital in Southern Brazil. The inclusion criteria applied was the histological diagnosis of PTC. Clinical and laboratory data were obtained from medical records and from individual interviews. The study was approved by the Institution Ethical Committee of the HCPA, Porto Alegre, Brazil.

Molecular analysis

Molecular analyses were held in Endocrinology and Genomic Medicine Laboratory - Experimental Research Center - Hospital de Clinicas de Porto Alegre.

Genomic DNA was obtained from peripheral blood leukocytes, according to standard protocols, through the extraction protocol by salt precipitation (Puregene Gentra®, Qiagen Inc., Venlo, The Netherlands) and using the Illustra™ blood genomic Prep Mini spin Kit (GE Healthcare, Madison, WI, USA) as described by the manufacturer, followed by quantification of genomic DNA, in the NanoDrop™ equipment (Thermo Scientific FoscHer Inc., Wilmington, DE, USA). Genomic DNA was screened for the *TP53* p.R337H mutation with allele-specific TaqMan® probes (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using a MX 3000P™qPCR System - Stratagene (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA) and analyzed using the Stratagene MxPro qPCR Software. Presence of the mutation would be confirmed by PCR-RFLP using the restriction enzyme *HhaI* [30] and by bidirectional gene sequencing of exon 10 using an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) following the sequencing protocol described in the *IARC TP53* database (37).

Statistical analysis

The study was originally designed to enroll 59 patients. On the basis of previous data, sample size was calculated to provide a statistical power of 80% to detect a mutation prevalence of 5%, assuming a two-sided alpha level of less than 0.05. Clinical and laboratory data are reported as mean \pm standard deviation (sd) or median and interquartile interval (continuous variables) or absolute numbers and percentages (categorical variables) and were compared using unpaired Student's t test, Mann-Whitney U test, or χ^2 , as appropriate.

Results

A total of 62 patients were included. The clinical and oncological characteristics of the patients are described in Table 1. The mean age of patients at the time of diagnosis was 48.1 ± 16.2 years and 53 (85.5%) were women. Exposure to radiation in childhood was present in 4 (6.5%) patients and 9 (14.5%) had a positive family history for PTC. Regarding disease extension, the median tumor size was 2.3 [1.3; 3.7] centimeters, 23 (37.1%) of the patients had lymph node metastasis and 3 (4.8%) had distant metastasis.

All 62 patients were negative for the TP53 *R337H* mutation. Only one patient presented the diagnostic criteria for the Classical Li-Fraumeni Syndrome, but was also negative for the studied mutation. Interestingly, however, we identified 6 (9.7%) patients with a history of breast cancer.

Based on the observation of the high prevalence of breast cancer in our sample, we sought to search for synchronous breast cancer in our database of PTC female patients (520 patients). Fourteen patients were found to have a history of breast cancer. Six of them were part of our initial female population (6 out of 53, 11.3%). Eight additional patients were identified, totalizing 14 (2.7%) patients with a personal history of both PTC and breast cancer.

The clinical and oncological characteristics of the patients with a history of PTC and breast cancer are described in Table 2. Patients with both malignancies were older (55.73 ± 10.0 vs. 44.53 ± 14.63 ; $p=0.004$). Breast cancer patients presented similar thyroid tumor sizes ($1.5[0.6; 2.7]$ vs. $1.8 [1.0; 3.0]$; $p=0.349$), and rates of lymph node (33.3% vs. 29.1% ; $p=0.775$) and distant metastasis (0% vs. 3.6% ; $p=1.00$). No difference was observed in the TNM stage at diagnosis (I: 26.7% vs. 23.9% ; II: 6.7% vs. 9.7% ; III: 13.3% vs. 10.5% ; IV: 6.7% vs. 10.7% ; $p=0.951$). Accordingly, the ATA risk was similar between the groups (L: 46.7% vs. 59.5% ; I: 46.7% vs. 33.8% ; H: 6.7% vs. 6.3% ; $p=0.578$). No difference was observed in the rate of thyroid cancer treatment with radioactive iodine (75% vs. 91.5% ; $p=0.313$). Of interest, thyroid cancer was the second primary malignancy in majority of cases (10; 66.7%) and most of these patients (8 out of 10; 80%) had a history of exposure to radiation in the course of the breast cancer treatment (radiotherapy).

Discussion

PTC is most prevalent thyroid malignancy and its incidence is growing worldwide. This neoplasia can occur as part of inherited genetic syndromes in approximately 5% of cases (10-12) and a positive family history of malignancy is a hallmark for proper diagnosis. It is established when two or more first-degree family members are affected. Hereditary nonmedullary thyroid cancer (HNMTc) may occur as a minor component of familial cancer syndromes or as a primary feature. Although there is some controversy, it is associated with more aggressive disease than sporadic cases, with higher

rates of multicentric tumors, lymph node metastasis, extra-thyroidal invasion, and shorter disease-free survival. (38).

In southern and southeastern Brazil, the TP53 *p.R337H* mutation is highly prevalent in LFS patients (32) and, interestingly, an increase rate of PTC has been reported in these series.

Here, we have investigated the prevalence of the TP53 *p.R337H* mutation in subgroup of PTC patients followed at our Institution. Like all syndromes whose definition is based on family criteria, the problem of a possible underestimation due to the small size of families should also be considered. The literature data suggests a prevalence of 0.15 to 0.39% of TP53 *p.R337H* in general population (34, 35), and based on the fact that in patients with LFS harboring this mutation, CPT was the second most prevalent type of cancer, we expected at least 5% of the sample to be positive. However, we did not identify this mutation in the PTC patients studied, not even in a patient with features of LFS. The clinical and oncological characteristics of patients in our sample were similar to those found in the literature. Only one patient presented features compatible with LFS/LFL. The incidence and prevalence of this rare syndrome in general population is difficult to estimate because of its very strict diagnostic criteria. Data about the prevalence of TP53 *p.R337H* mutation in general population is based on studies that were conducted mainly in Southeastern Brazil, while our sample is from Southern Brazil, which highlights the question whether the genetic background of our sample could be slightly different from that of previous studies.

A curious observation of this study was the high prevalence of a breast cancer history (6 out of 53 patients, 11.3%) observed in our initial population. A subsequent search in the database of our historical cohort of female PTC patients identified additional 8 patients, totalizing 14 cases with both primary malignancies (14 out of 520, 2.7%). The patients with PTC and breast cancer were older at the thyroid tumor diagnosis but no other differences were observed in clinical or oncological features.

Worldwide, breast cancer is the most common invasive cancer in women. The association between thyroid cancer and other malignancies has been well documented in the literature. Indeed, a significantly elevated risk of thyroid cancer following breast cancer was first demonstrated in 1984, with data from the Connecticut Tumor Registry (39). This issue was further explored, and studies in different populations have also found an increased risk of developing a second primary cancer of the

thyroid in females with history of breast cancer (40-41), as high as up to three times the chance in women with no such history (42). The reasons for the synchronous neoplasia are still open to debate. Several mechanisms have been proposed to explain the association between thyroid and breast cancer. The use of radiotherapy to treat cancer patients may have a role in the increased risk of developing a second malignancy (19). Some studies have suggested the relevance of autoimmune thyroid disorders (43), while others have postulated the role of several different signaling pathways (44, 45). Recently, rearranged during transfections/papillary thyroid carcinoma (RET/PTC) kinase, has been identified as an estrogen-dependent gene whose expression is induced by estrogen in breast cancer cells and is a critical regulator in the proliferation of estrogen receptor (ER) - positive breast cancer cells (46). Nonetheless, one cannot exclude the possibility that this finding may be due to a closer medical surveillance of cancer patients, which could have increased early diagnosis of second tumors.

The study has some limitations. Based on previous data, we may have overestimated the prevalence of TP53 *p.R337H* in patients with CPT, affecting the sample size calculation. Although we have slightly increased the initial sample size, the possibility of a none-representative population should be considered.

In conclusion

We have not identified the germline TP53 *p.R337H* mutation in a cohort of PTC patients but we observed a high prevalence of breast cancer in patients with PTC followed at our Institution. Although most of the patients received radiotherapy as part of the breast cancer treatment, and presented thyroid cancer as a second neoplasia, additional studies are warranted to further explore this association.

References

1. Sherman SI. Thyroid carcinoma. *Lancet*. 2003; 361:501-511
2. Davies L, Ouellette M, Hunter M, et al. The increasing incidence of small thyroid cancers: where are the cases coming from? *Laryngoscope*. 2010; 120(12):2446-2451.
3. Olaleye O, Ekrikpo U, Moorthy R, et al. Increasing incidence of differentiated thyroid cancer in South East England: 1987-2006. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2011; 268(6):899-906.
4. Kilfoy BA, Zheng T, Holford TR, et al. International patterns and trends in thyroid cancer incidence, 1973-2002. *Cancer Causes Control*. 2009; 20(5):525-31.
5. Enewold L, Zhu K, Ron E, et al. Rising thyroid cancer incidence in the United States by demographic and tumor characteristics, 1980-2005. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009; 18(3):784-791.
6. Cordioli MI, Canalli MH, Coral MH. Increase incidence of thyroid cancer in Florianopolis, Brazil: comparative study of diagnosed cases in 2000 and 2005. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2009; 53(4):453-460.
7. Brito JP, Morris JC, Montori VM. Thyroid cancer: zealous imaging has increased detection and treatment of low risk tumors. *BMJ*. 2013;347:f4706
8. Schneider AB, Sarne DH. Long-term risks for thyroid cancer and other neoplasms after exposure to radiation. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*. 2005; 1(2):82-91
9. Brito JP, Morris JC, Montori VM. Thyroid cancer: zealous imaging has increased detection and treatment of low risk tumors. *BMJ*. 2013;347:f4706
10. Dotto J., Nosé V. Familial thyroid carcinoma a diagnostic algorithm. *Adv. Anat. Pathol*. 2008; 15(6):332-349.
11. Nosé V. Familial non-medullary thyroid carcinoma: an update. *Endocr. Pathol*. 2008; 19(4):226-240.
12. Vriens M., Suh I., Moses W., Kebebew E. Clinical features and genetic predisposition to hereditary nonmedullary thyroid cancer. *Thyroid*. 2009;19(12):1343–13491.

13. Lal G1, Groff M, Howe JR, et al. Risk of subsequent primary thyroid cancer after another malignancy: latency trends in a population-based study. *Ann Surg Oncol.* 2012; 19(6):1887-1896
14. Subramanian S1, Goldstein DP, Parlea L, et al. Second primary malignancy risk in thyroid cancer survivors: a systematic review and meta-analysis. *Thyroid.* 2007; 17(12):1277-1288.
15. Kim C, Bi X, Pan D, et al. The risk of second cancers after diagnosis of primary thyroid cancer is elevated in thyroid microcarcinomas. *Thyroid.* 2013; 23(5):575-582.
16. Liu L, Shi J, Mao F, et al. Synchronous primary cancers of the thyroid and breast: A case report and review of the literature. *Oncology Letters.* 2015;9(1):351-354.
17. Li FP, fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas,breast câncer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Int Med.* 1969; 71:747-752.
18. Lynch HT, Guirgis HA. Childhood câncer and the SBLA syndrome. *Med Hypotheses.* 1979; 5:15-22.
19. Gonzales KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: Clinical Characteristics of Families With p53 Germline Mutations. *J Clin Onc.* 2009; 27:1250-1256.
20. Ruijjs MWG, Verhoef S, Rookus MA, et al. TP53 germline mutation testisng in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *J Med Gen.* 2010; 47: 421-428.
21. Li FP, Fraumeni JF, Jr, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48(18):5358-5362.
22. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994; 54:1298-1304.
23. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995;25:101-24.
24. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 2001; 38:43-47.
25. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2009; 27(26):e108-109.

26. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 2003; 63:6643-6650.
27. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat.* 2003; 21:313-320.
28. Birch JM. Germline mutations in the p53 tumour suppressor gene: scientific, clinical and ethical challenges. *Br J Cancer*, 1992; 66:424-426.
29. Morris SM. A role for p53 in the frequency and mechanism of mutation. *Mutat Res*, 2002; 511:45-62.
30. Volgestein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature.* 2000; 408:307-310.
31. Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene.* 2001;277(1-2):15-30
32. Achatz MIW, Olivier M, Calvez FL, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters.* 2007; 245:96-102.
33. Cannavan MC. Diagnóstico Molecular de mutações germinativas no gene TP53 em pacientes portadores de múltiplos tumores primários ou tumores isolados típicos da síndrome de Li-Fraumeni. São Paulo, 2011. [Dissertação de Mestrado – Fundação Antônio Prudente].
34. Palermo EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett*, 2008; 261:21-25.
35. Piovezzan GC. Prevalência do alelo TP53 p.R337H no Estado do Paraná. Curitiba, 2006. [Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Paraná]
36. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol.*2002; 9:12-16.
37. International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 database. 2012. URL: http://p53.iarc.fr/Download/TP53_DirectSequencing_IARC.pdf.

38. Uchino S, Noguchi S, Kawamoto H, et al. Familial nonmedullary thyroid carcinoma characterized by multifocality and a high recurrence rate in a large study population. *World J Surg.* 2002;26:897-902.
39. Ron E, Curtis R, Hoffman DA, et al. Multiple primary breast and thyroid cancer. *Br J Cancer.* 1984; 49(1):87-92.
40. Tanaka H, Tsukuma H, Koyama H, et al. Second primary cancers following breast cancer in the Japanese female population. *Jpn J Cancer Res.* 2001;92:1-8.
41. Volk N, Pompe-Kirn V. Second primary cancers in breast cancer patients in Slovenia. *Cancer Causes Control.* 1997;8:764-70.
42. McTiernan A, Weiss NS, Daling JR. Incidence of thyroid cancer in women in relation to known or suspected risk factors for breast cancer. *Cancer Res.* 1987;47:292-295.
43. Giani C, Fierabracci P, Bonacci R, et al. Relationship between breast cancer and thyroid disease: relevance of autoimmune thyroid disorders in breast malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013; 81(3):990-994.
44. Kim WG, Zhu X, Kim DW, et al. Reactivation of the silenced thyroid hormone receptor- β gene expression delays thyroid tumor progression. *Endocrinology.* 2013; 154:25–35
45. Guigon CJ, Kim DW, Willingham MC, et al. Mutation of thyroid hormone receptor- β in mice predisposes to the development of mammary tumors. *Oncogene.* 2011; 30:3381–3390.
46. Wang C, Mayer JA, Mazumdar A, et al. The rearranged during transfection/papillary thyroid carcinoma tyrosine kinase is an estrogen-dependent gene required for the growth of estrogen receptor positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 2012; 133:487–500.

Table 1: Clinical and Oncological features of PTC patients

n=62	
Age at diagnosis (years)	48.1 ± 16.2
Female Gender	53 (85.5%)
Tumor size (centimeters)	2.3 [1.3; 3.7]
TNM Stage	
I	37 (59.7%)
II	11 (17.7%)
III	7 (11.3%)
IV	5 (8,1%)
ATA Risk (61)	
Low	33 (53.2%)
Intermediate	23 (37.1%)
High	5 (8,1%)
Lymph node metastasis	
N0	39 (62.9%)
N1	23 (37.1%)
Distant metastasis	3 (4.8%)
Exposal to Radiation	4 (6.5%)
Family History of PTC	
Breast Cancer	6 (9.7%)
LFS/LFL	1 (1.6%)
TP53 R337H mutation	0 (0%)

PTC: papillary thyroid cancer; TNM: Tumor stage category; ATA: American Thyroid Association; LFS/LFL: Li-Fraumeni Syndrome/Li-Fraumeni Like
 Results presented in mean ±sd; median [interquartile intervals]; absolute numbers (percentages)

Table 2. Clinical and Oncological features of 520 female PTC patients: Comparison between patients with or without breast cancer

	Total (n=520)	PTC and BC (n=14)	PTC alone (n=506)	P
Age at diagnosis (years)	44.87 ± 14.63	55.73 ± 10.0	44.53 ± 14.63	0.004
Tumor size (centimeters)	1.8 [1.0; 3.0]	1.5 [0.6; 2.7]	1.8 [1.0; 3.0]	0.349
Microcarcinomas	121 (24%)	4 (26.7%)	121 (23.9%)	0.747
TNM Stage				0.951
I	352 (67.6%)	9 (60%)	343 (67.8%)	
II	50 (9.6%)	1 (6.7%)	49 (9.7%)	
III	55 (10.6%)	2 (13.3%)	53 (10.5%)	
IV	55 (10.6%)	1 (6.7%)	54 (10.7%)	
ATA Risk				0.578
Low	308 (59.1%)	7 (46.7%)	301 (59.5%)	
Intermediate	178 (34.2%)	7 (46.7%)	171 (33.8%)	
High	33 (6.3%)	1 (6.7%)	32 (6.3%)	
Lymph node metastasis				0.775
N0	368 (70.6%)	10 (66.7%)	358 (70.8%)	
N1	152 (29.2%)	5 (33.3%)	147 (29.1%)	
Distant metastasis	19 (3.6%)	0 (0%)	19 (3.8%)	1.00
Exposal to Radiation	**	9 (55.6%)	**	
Treatment with				
radioactive iodine (n)	443 (85%)	11 (73.3%)	432 (85.4%)	0.086

** data not available

PTC: papillary thyroid cancer; BC: breast cancer; TNM: Tumor stage category; ATA: American Thyroid Association

Results presented in mean ±sd; median [interquartile intervals]; absolute numbers (percentages)

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer papilar de tireóide é a neoplasia de tireóide mais prevalente e sua incidência vem crescendo em todo o mundo. Ao redor de 5% dos casos estão associados à herança familiar. A Síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome hereditária de predisposição à múltiplos tumores primários. No Sul e Sudeste do Brasil, a mutação germinativa TP53 *p.R337H* é altamente prevalente em pacientes com LFS. De modo interessante, diversos estudos demonstraram uma alta prevalência de CPT nestes pacientes.

Neste estudo, investigamos a prevalência da mutação germinativa TP53 *p.R337H* num subgrupo de pacientes com CPT, em acompanhamento no Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

As características clínicas e oncológicas dos pacientes incluídos na amostra foram semelhantes às descritas na literatura. Um paciente apresentava características compatíveis com a LFS. A mutação germinativa TP53 *p.R337H* não foi identificada na coorte de pacientes com CPT, mas foi observada uma alta prevalência de câncer de mama em pacientes com CPT em acompanhamento na nossa Instituição. Estes pacientes eram mais velhos no momento do diagnóstico do câncer de tireoide. A maioria dos pacientes com câncer de mama e de tireoide sincrônicos foi submetida à radioterapia como parte do tratamento do câncer de mama e apresentaram CPT como a segunda neoplasia. Entretanto, são necessários estudos adicionais para explorar esta associação.

6 APÊNDICES

6.1 Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA - AMBULATÓRIO DE ENDOCRINOLOGIA PROJETO LI FRAUMENI X CA PAPILAR DE TIREÓIDE

Nome do paciente: _____

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

Prontuário: _____ Sexo: _____

Data de nascimento: _____ Idade: _____

Etnia: _____

Endereço: _____

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

Município: _____ Estado: _____

CEP: _____

Outras observações: _____

Data da consulta: _____

Data da coleta: _____

Data da pesquisa da mutação: _____

Mutação R337H: _____

DADOS CLÍNICOS:

Peso: _____ Kg Altura: _____ cm

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

Tipo do tumor: Carcinoma Papilar de Tireóide

Idade ao diagnóstico: _____

Ecografia pré-operatória: _____

Paaf: _____

Data da cirurgia: _____

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

AP cirúrgico (descrição): _____

Tratamento:

() cirurgia () iodo radioativo

Recidiva:

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

Status Oncológico:

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

Demais observações:

Outros tumores associados:

CA Mama: _____	(sim/não)	Data do dx _____
CA cólon: _____	(sim/não)	Data do dx _____
CA SNC: _____	(sim/não)	Data do dx _____
Sarcoma: _____	(sim/não)	Data do dx _____
Melanoma: _____	(sim/não)	Data do dx _____
Leucemia : _____	(sim/não)	Data do dx _____
Linfoma: _____	(sim/não)	Data do dx _____
CA adrenal: _____	(sim/não)	Data do dx _____
Outros: _____		

Comorbidades:

() Diabetes Melittus () HAS () obesidade

Outras : () não () sim , qual _____

Exposição ambiental:

() fumo () álcool () radiação () medicamentos, quais _____

() agrotóxicos, quais _____

() outras substâncias químicas, quais _____

HISTÓRIA FAMILIAR:

Cancer papilar de tireóide:

() n) npapilar de tire: micas, quais _____

HEREDOGRAMA (com confirmação de laudos de exame anatomopatológico):

6.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Projeto de Pesquisa: “Prevalência da mutação germinativa R337H no gene *TP53*, em pacientes com Carcinoma Papilar de Tireóide”

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

Você está sendo convidado a participar deste estudo, pois teve o diagnóstico de carcinoma papilar da tireóide. Será testada uma mutação genética chamada *TP53-R337H*. Esta mutação está associada a uma síndrome genética chamada de Li-Fraumeni Esta Síndrome e as suas variantes são causadas por alterações genéticas (mutações) que são transmitidas na reprodução. Nem todas as pessoas que tem esta característica genética obrigatoriamente irão desenvolver outros tipos de câncer. Existe, porém, a possibilidade (risco) de desenvolver vários tumores, já em idade jovem. A frequência desta mutação em pacientes com câncer papilar de tireóide não é conhecida. Alguns estudos indicam que uma alteração, a mutação R337H, pode ser frequente nesses pacientes.

O objetivo desta pesquisa é estudar a frequência de uma alteração genética - a mutação *R337H* no gene *TP53* – em indivíduos com câncer papilar de tireóide.

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

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

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

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

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

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

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

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

Todas as informações de identificação pessoal coletadas serão mantidas de forma confidencial. O seu nome e dos seus familiares não serão vinculados aos resultados desse estudo quando os mesmos forem publicados, porque os dados serão avaliados e divulgados apenas de forma coletiva.

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

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

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

Nome: _____

Grau de Parentesco _____

Telefone: _____

Você poderá entrar em contato com a Dra. Patrícia Ashton Prolla ou com a Dra. Ana Luiza Maia, do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51) 3359-7661 para mais informações.

O Comitê de Ética em Pesquisa do HCPA, que aprovou o projeto, também pode auxiliar a esclarecer alguma dúvida que você tiver, pelo telefone 51-3359-8304.

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

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

Declaro ter recebido cópia deste Termo

_____/_____/_____
Assinatura do Paciente ou Pai/Mãe/Responsável Legal Data

_____/_____/_____
Nome do entrevistador Assinatura do entrevistador Data