MARIA ISABEL ALVES DE SOUZA WADDINGTON ACHATZ

**Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene
TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de
Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*: impacto dos polimorfismos
intragênicos do *TP53* e de genes que regulam a atividade da p53**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de
Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Achatz, Maria Isabel Alves de Souza Waddington

Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene *TP53* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*: impacto dos polimorfismos intragênicos do *TP53* e de genes que regulam a atividade da p53 / Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz. -- São Paulo, 2008.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia.

Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Ricardo Renzo Brentani.

Descritores: 1.Síndrome de Li-Fraumeni 2.Proteína supressora de tumor p53
3.Mutação em linhagem germinativa 4.Deleção de genes 5.Polimorfismo genético
6.Predisposição genética para doença 7.Carcinoma adrenocortical 8.Proteínas
proto-oncogênicas c-mdm2

USP/FM/SBD-446/08

DEDICATÓRIA

*A Yvonne, por seu infinito amor.
Aos meus filhos, meus grandes amores.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, pelo reconhecimento e incentivo. Por ter sempre acreditado em mim e apoiado minhas escolhas.

As todas as famílias que confiaram em meu trabalho e que me acompanharam nos últimos anos, em especial à Augusta Tereza.

Ao Dr. Pierre Hainaut por ser muito mais do que um grande professor. Obrigada por acreditar tanto em meu trabalho.

A Prof. Dra. Patricia Prolla, por ser meu exemplo, meu apoio e minha grande companheira nas discussões de casos. Obrigada pela sua amizade.

Aos meus filhos tão amados, Thiago, Rafaela, Mariana e Felipe, por todas as vezes que abriram mão da minha presença, pela compreensão, carinho e incentivo.

Agradeço a Deus a cada dia por vocês terem me escolhido.

Ao Michael, pela persistência, pelo seu amor e apoio.

Aos meus pais, Ary e Maria Martha, por todo amor e pelo carinho.

Aos meus irmãos Cristina, Eduardo e Roberto, pela grande amizade que nos liga.

À Tereza Messias, Joana Alecrim e Alfredo Messias, por me darem todo apoio e suporte, eu eterno agradecimento pelo amor que vocês têm pelos meus filhos.

A nossa equipe da Oncogenética, sem a qual não conseguiria ter completado este trabalho.

À Enfermeira Amanda França, pelo grande apoio, incentivo e amizade.

À Assistente de Pesquisa Andreia Veloso, pela coragem e por me apoiar tanto.

À Psicóloga Christina, por todo apoio, infindável perseverança e amizade.

À Edaise Silva, pela coragem em aceitar os desafios.

À Dra Simône Noronha por todo o nosso caminhar e à Dra. Rima Jbili pela coragem.

As colegas do IARC, Dra Edenir Palmero, pela ajuda inestimável na revisão da tese.

À Dra. Ghyslaine Martel-Planche, pela orientação nas manipulações e por ter me acolhido de braços abertos no IARC.

À Virginie Marcel, por ter aberto as portas no estudo do PIN3 e paciência em me explicar as técnicas.

Aos Dra. Florence e Olaf Kelm, amigos queridos que me ensinaram tanto e me hospedaram tantas vezes.

À Dra. Magali Olivier, pela orientação no Database *TP53*.

À Dra. Audrey Petijean, pelo trabalho no Database *TP53*.

À Michelle Wrizes por todo apoio em Lyon.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, pela confiança, pelo seu grande apoio e ajuda

Ao Dr. Luis Fernando Lima Reis, pela sua amizade, apoio e força.

Ao Prof. Dr. Roger Chammas, pelo apoio ao meu trabalho.

Aos Dras Helena Brentani, Dr Cesar Torres e todo Laboratório de Bioestatística.

Dra. Adriana Abalen e Dr. Alex Fiorinni pelo apoio e orientação.

À Dra. Dirce Carraro e todo o seu laboratório pela extração de DNA de nossos pacientes, e em especial a Eloisa Olivieri, Thiago Saraiva e Louise Mota.

À Dra. Lygia da Veiga Pereira, pelo infindável incentivo, amizade e apoio.

Ao Dr. André Lopes Carvalho pela disponibilidade e incentivo.

À Dra. Silvia Rogatto pela orientação e apoio em todos momentos.

À Dra. Maria Aparecida Koike pelo apoio e exemplo.

À equipe da Anatomia Patologia e Alexandra Longo e Gilmara da Silva pelo apoio.

À Dra. Isabela Werneck e Dra. Renata Coudry, pelas explicações e amizade.

Drs Gilles Landman, Dr. Antonio Hugo Froes, Dra. Cyntia Osório e Dra. Maria Dirley Begnami.

Ao Prof. Dr. Fabio Alves e toda a equipe de Estomatologia, pelo imenso apoio, companheirismo e gentileza em terem nos recebido.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes e toda equipe da Cirurgia Pélvica.

Ao Dr. Benedito Rossi, pela grande disponibilidade, orientação e amizade.

Ao Dr. Gustavo Guimarães pelos inúmeros conselhos e explicações.

Ao grupo do GETH, Enfermeira Erika, Dr. Fábio Ferreira, Dr. Wilson Nakagawa e Dr. Samuel Aguiar Jr.

Ao Dr. João Duprat e a equipe da Dermatologia, Dra. Bianca de Sá, Dr. Alexandre Leon, Dr. Marco Antonio de Oliveira e Dra. Adriana Mendes.

Ao Dr. Mário Mourão e a equipe da Mastologia: Dras. Fabiana Makdissi, Maria do Socorro Maciel, Solange Carvalho e Dr. Hirofumi Iyeyasu pela confiança e apoio.

Ao Dr. Marcelo Fanelli e a toda equipe da Oncologia: Dr. Daniel Gimenez, Dr. Dr. Celso Mello, Dr. Wladimir Lima, Dra. Andreia Guimarães e Dr. José Augusto Rinck Jr. E Dr. Aldo Dettino pela ajuda e apoio no acompanhamento de nossos pacientes.

Ao Dr. Eduardo Nóbrega Lima e Dr Rubens Choniack e suas equipes pelo apoio.

Ao Dr. Jefferson Gross, Dr. Fábio Haddad e toda equipe da cirurgia torácica.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalsky, Dr. Mauro Ikeda, Dr. Magrin, Dr. José Guilherme Vartanian e toda equipe da cirurgia de cabeça e pescoço.

Dra. Cecília Costa, Prof. Dra. Beatriz de Camargo, Dra Viviane Sonaglio e toda equipe da Pediatria.

Ao Dr. André Vettore, pelo apoio iniciado em meu projeto de mestrado

À Dra. Adriane Pelosof, pelo apoio e amizade.

Dr. André Montagnini, Dr. Felipe Coimbra e a equipe da cirurgia abdominal.

À bibliotecária Suely Francisco, Erica Falcão e Priscilla Gomes pelo apoio, prontidão e carinho.

Ao Prof. Dr. Fernando Vargas pela amizade e confiança.

Ao Prof. Dr. Roberto Giuliani pelo imenso apoio na Genética Medica.

Ao Dr. Humberto Torloni e Dr. Alois Bianchi, pelo incentivo e exemplo.

Ao Dr. Carlos Lotfi, pela confiança e apoio.

Ao Dr. Décio Brunoni e todos do CGM-UNIIFESP pelo apoio desde o início.

À Dra. Ana Maria Camargo Aranha e Valéria paixão pela gentileza, apoio e compreensão.

À Secretária Elizete Costa, pela atenção e imensa paciência.

Às secretárias Iara Bittencourt e Solange de Melo, pelo carinho e simpatia.

Às secretárias da pós graduação da Faculdade de Medicina da USP, D. Iara e D. Gorette, pela assistência e apoio.

Às secretárias da Oncologia/Radiologia da Faculdade de Medicina da USP, Elisângela e Rosilene, pelo imenso apoio.

Aos funcionários do Lavoisier pela coleta de sangue dos pacientes.

A Fundação Antonio Prudente e ao IARC pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de quadros

Lista de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de siglas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer, genes e mutações herdadas no gene <i>TP53</i> : contribuição para a ocorrência do câncer na população brasileira.....	1
1.2	Incidência do câncer no Brasil: contribuição das síndromes de predisposição hereditária na compreensão da genética dos tumores hereditários.....	3
1.3	O desenvolvimento de serviços de Oncogenética clínica no Brasil.....	5
1.4	Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo, São Paulo.....	7
1.5	AG em pacientes com síndromes de predisposição hereditária ao câncer...	8
1.5.1	Definição de aconselhamento genético.....	8
1.5.2	Quando encaminhar uma família para aconselhamento genético e avaliação do risco.....	8
1.5.3	Identificação de famílias com tumores hereditários.....	9
1.5.4	AG nas síndromes de predisposição hereditária ao câncer.....	10
1.5.4.1	Anamnese e exame físico.....	10
1.5.4.2	História familiar e elaboração do heredograma.....	12
1.5.4.3	Diagnóstico.....	12
1.5.4.4	AG pré-teste.....	13
1.5.4.5	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	14
1.5.4.6	Teste genético.....	15

1.5.4.7	AG pós-teste.....	16
1.5.4.8	Estratégias de acompanhamento prospectivas.....	17
1.5.4.9	Limitações do teste genético.....	17
1.6	Síndrome de Li-Fraumeni.....	18
1.6.1	Histórico.....	18
1.6.2	Diagnóstico clínico da LFS/LFL.....	20
1.6.3	Espectro tumoral da LFS/LFL.....	22
1.6.4	Acompanhamento e rastreamento na LFS/LFL.....	23
1.7	O gene supressor de tumor <i>TP53</i> - estrutura e função.....	27
1.7.1	Histórico.....	27
1.7.2	Características do gene <i>TP53</i>	29
1.7.3	A família de genes relacionados ao <i>TP53</i>	31
1.7.4	A proteína p53.....	34
1.7.5	A regulação da expressão.....	35
1.7.6	Regulação pós-traducional: sinalização de danos ao DNA.....	35
1.7.7	A proteína p53 como fator fundamental no controle do ciclo celular, na apoptose e no reparo ao DNA.....	36
1.7.8	Mutações em <i>TP53</i> no câncer em humanos.....	38
1.7.9	R337H: mutação específica da população brasileira.....	40
1.7.10	Propriedades bioquímicas e biológicas do R337H.....	44
1.8	Características do padrão de mutações em famílias brasileiras LFS/LFL...	46
1.9	Modificadores genéticos de mutações no gene <i>TP53</i> : <i>MDM2</i> e polimorfismos intragênicos do gene <i>TP53</i>	48
1.9.1	<i>MDM2</i> : efeito modificador a partir do principal regulador de <i>TP53</i>	48
1.9.2	Polimorfismos intragênicos no gene <i>TP53</i>	49
2	OBJETIVOS.....	52
2.1	Objetivo geral.....	52
2.2	Objetivos específicos.....	52
3	PACIENTES E MÉTODOS.....	54
3.1	Seleção de famílias e pacientes.....	54

3.1.1	Recrutamento da série 1 LFS/LFL.....	54
3.1.2	Recrutamento da série 2 LFS/LFL.....	55
3.2	Extração de DNA.....	56
3.3	Identificação das mutações no gene <i>TP53</i>	58
3.4	Identificação de rearranjos no gene <i>TP53</i> pelo método de MLPA (<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>)	61
3.5	Identificação dos haplótipos dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX 4 no gene <i>TP53</i>	62
3.6	Identificação do SNP309 (rs2279744) do gene <i>MDM2</i>	65
3.7	Análise estatística.....	66
4	RESULTADOS.....	67
4.1	Caracterização clínica e molecular das famílias LFS/LFL avaliadas e seus familiares.....	67
4.1.1	Definição do perfil brasileiro das famílias LFS/LFL.....	67
4.1.2	Investigação aprofundada em uma das famílias portadoras da mutação R337H – recrutamento e avaliação clínica e molecular de membros de uma mesma família.....	67
4.1.3	Pesquisa de mutações germinativas no gene <i>TP53</i> em novas famílias LFS/LFL e recrutamento de familiares para avaliação clínica e molecular	69
4.1.4	Detecção de rearranjos pelo método de MLPA em famílias sem mutações	70
4.1.5	Avaliação do padrão tumoral em famílias LFS/LFL: risco aumentado para câncer de estômago e colorretal de manifestação precoce.....	73
4.2	Origem e disseminação da mutação germinativa R337H e alta frequência de predisposição a câncer na população do sul e sudeste do Brasil: evidência de efeito fundador.....	75
4.3	Penetrância do R337H e risco para o desenvolvimento de tumores.....	81
4.4	Prevalência e distribuição do R337H na população do sul e sudeste brasileiro.....	83
4.5	Rastreamento de tumores nas famílias LFS/LFL brasileiras.....	84
4.6	Modificadores genéticos de penetrância: haplótipos do gene <i>TP53</i> e <i>MDM2</i>	86

4.6.1	Susceptibilidade ao câncer ligada aos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 de <i>TP53</i>	86
4.6.1.1	Determinação dos polimorfismos na população brasileira.....	86
4.6.1.2	Associação entre os polimorfismos na população avaliada como referência.....	87
4.6.1.3	Determinação dos polimorfismos em famílias LFS/LFL.....	89
4.6.1.4	Impacto dos polimorfismos na idade de acometimento dos tumores.....	91
4.6.1.5	Efeito de PIN3 no risco de câncer e idade de acometimento.....	93
4.6.1.6	Impacto do PIN3 na idade de acometimento de acordo com o tipo tumoral.....	96
4.6.1.7	Impacto do polimorfismo PIN3 no número de cânceres.....	98
4.6.2	Efeito do SNP 309 do gene <i>MDM2</i> no risco de câncer e idade de acometimento.....	99
4.6.3	Efeitos combinados dos diferentes polimorfismos.....	103
4.6.3.1	Associações entre PIN3 e PEX4.....	103
4.6.3.2	Associações entre PIN3 e <i>MDM2</i>	104
5	DISCUSSÃO.....	106
5.1	Caracterização clínica e populacional de LFS/LFL no Brasil.....	106
5.1.1	Padrão tumoral: espectro tumoral e alta frequência de câncer colorretal e de estômago nas famílias brasileiras LFS/LFL.....	106
5.1.2	Incidência estimada, excesso de risco e manejo.....	108
5.1.3	Panorama atual da LFS/LFL no mundo e no Brasil: contribuição do nosso estudo.....	111
5.1.4	A família Y12 e o desafio do aconselhamento genético.....	112
5.2	R337H e a presença da mutação fundadora em uma população aberta.....	113
5.2.1	R337H: efeito fundador evidente em população de origem caucasiana.....	113
5.2.2	Origem da R337H: hipótese histórica e a rota dos tropeiros.....	115
5.2.3	Paradoxo da persistência de uma mutação deletéria em uma população aberta.....	117
5.2.4	Desafios no manejo das famílias R337H da população do sul e sudeste brasileiro.....	120

5.3	Padrão tumoral em portadores R337H	120
5.3.1	Aspectos clínicos e risco de câncer em portadores R337H: muito além dos tumores adrenocorticais.....	120
5.3.2	Aspectos moleculares e propriedades bioquímicas do R337H.....	122
5.3.2.1	Hipótese sobre o espectro tumoral apresentado nas famílias R337H.....	123
5.3.2.2	O conceito de penetrância condicional do mutante R337H.....	126
5.4	Impacto populacional do mutante R337H: consequências para a saúde pública brasileira.....	127
5.4.1	Possível contribuição para o risco geral de câncer nas regiões sul e sudeste do Brasil.....	127
5.4.2	R337H: um caso para triagem neonatal?	128
5.4.3	Perspectivas futuras no manejo do alto impacto populacional do R337H...	130
5.5	Revisão da definição e diagnóstico clínico da LFS/LFL: Consórcio Internacional da LFS, IARC, Lyon.....	133
5.5.1	LFS/LFL: um diagnóstico clínico ou molecular?	133
5.5.2	Revisão da definição LFS/LFL: <i>Lyon Consensus Criteria</i>	134
5.6	Modificadores de mutações no <i>TP53</i> : impacto dos polimorfismos genéticos como modificadores de penetrância.....	135
5.6.1	PIN3: regulador fundamental na idade de acometimento.....	135
5.6.2	Polimorfismos intragênicos de <i>TP53</i> : PIN2 e PEX4.....	137
5.6.3	<i>MDM2</i> como modificador tumor específico.....	138
5.6.4	Modificadores e seu impacto na prática clínica: auxílio nas estratégias de rastreamento e manejo?	140
5.7	Mutações germinativas em <i>TP53</i> : quem deve ser testado e por onde começar?	141
5.7.1	Recomendações para testagem do gene <i>TP53</i>	141
5.7.2	Manejo de famílias LFS/LFL.....	142
6	CONCLUSÕES.....	144
7	PERSPECTIVAS.....	146

8	ANEXOS.....	149
9	REFERÊNCIAS.....	208

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas fundamentais da carcinogênese - capacidades adquiridas do câncer.....	2
Figura 2	Tumores associados com mutações na linhagem germinativa de <i>TP53</i>	23
Figura 3	O gene <i>TP53</i> e a proteína p53.....	30
Figura 4	Interação entre p53, p63 e p73.....	32
Figura 5	Ilustração esquemática das vias de ação da proteína p53.....	37
Figura 6	Mutações mais frequentes no gene <i>TP53</i>	39
Figura 7	Mutação R337H no gene <i>TP53</i>	45
Figura 8	ARMs PCR para determinação dos haplótipos PIN2, PEX3 e PEX4.....	64
Figura 9	Transmissão do R337H e padrão de tumores nos membros da família Y12.....	68
Figura 10	Genotipagem do SNP RS9903378.....	77
Figura 11	PCR alelo-específico, seqüenciamento e desequilíbrio de ligação entre o R337H e o SNP rs9894946.....	80
Figura 12	Incidência cumulativa de casos de câncer em portadores R337H.....	81
Figura 13	Ocorrência de tumores e idade de acometimento nas famílias R337H.....	82
Figura 14	Heredograma família NMPOA.....	84
Figura 15A	Ocorrência de câncer em portadores de mutação no gene <i>TP53</i> em relação ao genótipo de PIN3 <i>TP53</i>	94
Figura 15 B	Ocorrência de câncer em pacientes sem a mutação detectada no gene <i>TP53</i> em relação ao genótipo de PIN3 <i>TP53</i>	94

Figura 16	Ocorrência de câncer relacionado à idade em portadores e não portadores de mutação no gene <i>TP53</i> em relação ao genótipo do SNP 309 do gene <i>MDM2</i>	101
Figura 17	Panorama atual de portadores de mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	111
Figura 18	Distribuição geográfica das famílias R337H e rota histórica dos tropeiros.....	116
Figura 19	Trios/quartetos para estudos de CNVs na família Y12.....	148

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Perfil de mutações em famílias LFS/LFL brasileiras.....	70
Tabela 2	Perfil de rearranjos em famílias LFS/LFL brasileiras.....	71
Tabela 3	Perfil de mutações e rearranjos encontrados em famílias brasileiras com LFS/LFL.....	72
Tabela 4	Espectro e idade média ao diagnóstico de tumores em 45 famílias brasileiras com diagnóstico clínico de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni <i>like</i>	74
Tabela 5	Haplótipos mais frequentes encontrados na análise de amostras provenientes de 90 Caucasianos (HapMap DNA sample set), 8 portadores da mutação R337H no gene <i>TP53</i> não aparentados, um trio e um duo mãe e filha.....	78
Tabela 6	Frequência alélica dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 nas diferentes populações.....	86
Tabela 7	Haplótipos dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 em controles da população brasileira.....	88
Tabela 8	Distribuição do polimorfismo PIN2 em indivíduos afetados (pacientes-índice e familiares) com o diagnóstico clínico da LFS/LFL.....	90
Tabela 9	Distribuição do polimorfismo PIN3 em indivíduos afetados com o diagnóstico clínico da LFS/LFL.....	90
Tabela 10	Distribuição do polimorfismo PEX4 em indivíduos afetados com o diagnóstico clínico da LFS/LFL.....	91
Tabela 11	Distribuição dos genótipos para PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL e idade média de aparecimento de tumores.....	92
Tabela 12	Distribuição dos genótipos para PEX4 em indivíduos afetados LFS/LFL e idade média de aparecimento de tumores.....	93

Tabela 13	Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto na idade de acometimento do câncer de mama.....	96
Tabela 14	Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto na idade de acometimento de sarcomas de partes moles (SPM).....	97
Tabela 15	Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto no número de cânceres desenvolvidos por cada paciente.....	98
Tabela 16	Distribuição dos genótipos do SNP 309 do gene <i>MDM2</i> em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto na idade ao diagnostico de câncer.....	99
Tabela 17	Distribuição dos genótipos do SNP 309 do gene <i>MDM2</i> em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto na idade de acometimento pelo câncer de mama.....	102
Tabela 18	Distribuição dos genótipos do SNP 309 do gene <i>MDM2</i> em indivíduos LFS/LFL afetados, com e sem mutação no gene <i>TP53</i> , e impacto na idade de acometimento pelo SPM.....	102
Tabela 19	Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e PEX4, em portadores e em não portadores de mutações em <i>TP53</i> , e idade de acometimento de tumores.....	103
Tabela 20	Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e PEX4, em portadores e em não portadores de mutações em <i>TP53</i> , e idade de acometimento de SPM.....	104
Tabela 21	Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e <i>MDM2</i> SNP 309, em portadores e em não portadores de mutações em <i>TP53</i> , e idade de acometimento de tumores.....	105

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer.....	7
Quadro 2	Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni.....	21
Quadro 3	Estratégias de rastreamento na LFS/LFL – NCCN.....	24
Quadro 4	Histórico dos 20 anos de descobrimento da p53.....	28
Quadro 5	Pacientes com diagnóstico de LFS/LFL incluídos no projeto.....	56
Quadro 6	Seqüência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para DHPLC e seqüenciamento.....	59
Quadro 7	Descrição de linhagens celulares com diferentes mutações no gene <i>TP53</i> usadas como controles positivos no DHPLC.....	60
Quadro 8	Seqüência do gene <i>TP53</i> (Éxon 2 até éxon 4).....	63
Quadro 9	Oligonucleotídeos para os polimorfismos PIN2 e PEX4.....	64
Quadro 10	Condições e reagentes empregados na ARMs PCR para determinação dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Carcinoma adrenocortical
AG	Aconselhamento genético
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CCR	Câncer colorretal
DHPLC	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
DNA	Ácido desoxiribonucléico
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>
LFL-B	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Birch
LFL-E1	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Eeles 1
LFL-E2	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Eeles 2
LFS/LFL	Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni <i>like</i>
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni clássica
mRNA	mensageiro do ácido ribonucleico
mt DNA	Ácido desoxiribonucléico mitocondrial
OMIM	<i>On-line Mendelian Inheritance in Men</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polimerase chain reaction</i>
PCR-RFLP	<i>Restriction fragment length polimerase chain reaction</i>
PET-CT	Tomografia de Emissão Pósitron
Prof	Professor
SNC	Tumores do sistema nervoso central
SNPs	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
SO	Sarcoma ósseo
SPHC	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer
SPM	Sarcoma de partes moles
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

LISTA DE SÍMBOLOS

<i>KD</i>	<i>Quilodalton</i>
μL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	Milimolar
pmol	Picomol
rpm	Rotações por minuto

LISTA DE SIGLAS

ASHG	<i>American Society of Human Genetics</i>
IARC	<i>International Agency for the Research on Cancer</i>
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Cancer
HACC	Hospital A.C. Camargo
HCPOA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NMPOA	Núcleo Mama de Porto Alegre
OMS	Organização Mundial da Saúde
RCRU	Registro de Câncer do Reino Unido

RESUMO

Achatz MIW. Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene TP53 em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *like*: impacto dos polimorfismos intragênicos do *TP53* e de genes que regulam a atividade da p53. [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 228p.

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e sua variante *like* (LFL) são associadas a mutações germinativas no gene *TP53* e predispõe ao alto risco para múltiplos tumores em idade jovem. Analisamos 91 famílias LFS/LFL do sul/sudeste do Brasil para mutações germinativas e haplótipos de *TP53* (PIN2, PIN3 e PEX4) e *MDM2* (309T-G). A mutação R337H ocorreu em 44,4% das famílias avaliadas. Em 750 controles da região a frequência populacional da mutação foi 0,3%. A genotipagem de oito indivíduos não relacionados R337H-positivos para 29 *TAG SNPs* intragênicos demonstrou o mesmo haplótipo raro estabelecendo efeito fundador para R337H. O alelo duplicado no PIN3 apresenta impacto modificador e retardo de 17,1 anos na ocorrência de tumores em famílias com mutação no *TP53*, enquanto o SNP309 *MDM2* modula a idade dos sarcomas de partes moles.

Descritores: Síndrome de Li-Fraumeni; Proteína supressora de tumor p53; Mutação em linhagem germinativa; Deleção de genes; Polimorfismo genético; Predisposição genética para doença; Carcinoma adrenocortical; Proteínas proto-oncogênicas c-mdm2.

SUMMARY

Achatz MIW. *Genetic modifiers of germline TP53 mutation in Brazilian families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni Like syndromes: impact of TP53 intragenic polymorphisms and p53 regulatory genes*. [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2008. 228p.

Li-Fraumeni syndrome (LFS) and its variant like (LFL) are associated with germline mutations in the *TP53* gene and predispose to a variety of cancers at an earlier age.

We analyzed 91 LFS/LFL families from southern Brazil for germline mutations in *TP53* and polymorphisms in *TP53* (PIN2, PIN3, PEX4) and *MDM2* (309T-G). The germline *TP53* mutation R337H was found in 44.4% of all families included. In 750 controls from the same region, mutation prevalence was 0.3%. Genotyping of eight unrelated R337H-positive individuals for 29 intragenic TAG SNPs showed that they all shared the same rare haplotype confirming the founder effect for the mutation. Duplication of PIN3 had a modifier effect on the age of tumor onset (delay of 17.1 years) in *TP53* mutation carriers whereas *MDM2* SNP309 modulated age of onset for soft-tissue sarcomas.

Keywords: Li-Fraumeni Syndrome; Tumor suppressor protein p53; Germline mutation; Gene deletion; Genetic Polymorphism; Genetic predisposition to disease; Adrenocortical carcinoma; Proto-oncogene proteins c-mdm2.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer, genes e mutações herdadas no gene *TP53*: contribuição para a ocorrência do câncer na população brasileira

O processo da carcinogênese é caracterizado pela aquisição de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em diversos processos relacionados, envolvendo o controle do ciclo celular, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a angiogênese, além da motilidade celular e capacidade migratória (Hanahan e Weinberg 2000) (Figura 1). Os mecanismos moleculares relacionados à carcinogênese são extremamente diversos e complexos. Atualmente sabe-se que um pequeno grupo de genes controla a maior parte das vias ligadas à carcinogênese e freqüentemente encontra-se alterado no câncer humano. Estes genes são partes centrais dos mecanismos envolvidos no câncer, ou vias da carcinogênese. O gene supressor de tumor *TP53*, que codifica a proteína p53, é o protótipo destes genes. O papel fundamental do *TP53* na regulação do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA consagrou-o com a denominação de “guardião do genoma” (Lane 1992).

Alterações somáticas na sequência codificante do gene *TP53* ocorrem em aproximadamente 33% de todos os tumores malignos esporádicos e em até 50% de todos os tumores invasivos (Malkin et al. 1990). Mutações são as principais alterações verificadas na carcinogênese, no entanto, diversos outros mecanismos de inativação da p53 nas células cancerosas podem ocorrer. Estas alterações incluem a perda de um alelo ou mesmo de todo cromossomo, o sequestro e destruição da

proteína ativa por proteínas celulares ou virais, repressão transcricional, degradação protéica acelerada, modificação da conformação da proteína, inativação protéica e alteração na distribuição celular da proteína (Hainaut e Wiman 2004). Atualmente, acredita-se que células nas quais há funcionamento regular da via da p53 são células estáveis e com baixa probabilidade de transformação maligna. No entanto, é importante ressaltar que a inativação da proteína p53 isoladamente não é suficiente para iniciar um processo de carcinogênese na célula normal.

FONTE: Adaptado de Hanahan e Weinberg (2000).

Figura 1. Etapas fundamentais da carcinogênese – capacidades adquiridas do câncer.

O papel fundamental do gene *TP53* na carcinogênese foi confirmado frente à detecção de mutações germinativas em portadores da síndrome de Li-Fraumeni (LFS). O gene supressor de tumor *TP53* é o principal gene envolvido na LFS. A LFS é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer, de alta penetrância, na qual

portadores de mutação patogênica em *TP53* apresentam um risco cumulativo vital de até 90% para o desenvolvimento de câncer (Birch et al. 2001). É uma das síndromes mais dramáticas de predisposição ao câncer na qual os tumores podem ocorrer em diferentes sítios e na qual os portadores apresentam alto risco para a ocorrência de múltiplos tumores primários. A observação clínica do alto risco para ocorrência de múltiplos tumores associado às mutações germinativas no gene *TP53* demonstra de forma direta a importância central e crítica da função da proteína p53 na proteção de células normais contra o risco de transformação maligna e progressão tumoral.

Nesta tese, descreveremos a alta prevalência da LFS na população brasileira devido à ocorrência da mutação germinativa R337H no gene *TP53*, encontrada na população brasileira do sul e sudeste do país. Além disso, avaliaremos a origem desta mutação e a existência de polimorfismos e genes que possam agir como modificadores de risco para mutações em *TP53*. Serão avaliadas as possíveis consequências e implicações desta ocorrência não somente nas populações do sul e sudeste brasileiro.

1.2 Incidência do câncer no Brasil: contribuição das síndromes de predisposição hereditária na compreensão da genética dos tumores hereditários

O Brasil é o maior e mais populoso país da América Latina, sendo dividido em 26 estados que estão agrupados em cinco grandes regiões, com um total de 184.184.264 habitantes segundo o último censo realizado em 2005 e uma estimativa de 186.770.562 habitantes no ano de 2008 (IBGE 2008). A população das regiões sul

e sudeste do país corresponde à maioria deste contingente, contando com mais de 100 milhões de indivíduos.

A origem étnica da população destas regiões é heterogênea e apresenta grande influência de imigrantes europeus, especialmente nos estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná. Apesar da grande variedade na população brasileira contemporânea, verifica-se que nos estados do sul do Brasil a contribuição Africana no *pool* genético é menor se comparada ao resto do país (De Souza et al. 2007). Estima-se que a ancestralidade européia e Africana corresponda respectivamente a 71% e 11% dos alelos em indivíduos brasileiros. Alves-Silva et al. (2000) descreveram, a partir do estudo do DNA mitocondrial (mtDNA) e alelos nucleares, a distribuição diferencial de alelos Ameríndios, Africanos e Europeus na população branca brasileira. Os pesquisadores encontraram uma taxa alta de contribuição africana e européia nos indivíduos estudados. No entanto, nos indivíduos provenientes dos estados do sul, verificou-se uma predominância européia, tanto no DNA mitocondrial (66%) como no nuclear (79%). Segundo dados do IBGE a prevalência entre origens populacionais no estado do Rio Grande do Sul é a européia (IBGE 2008).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2008 indicam que 466.730 casos novos de câncer ocorrerão neste ano na população. Os tipos mais incidentes, à exceção do câncer de pele do tipo não-melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e de colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada no mundo (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2008). Para a maior parte dos tumores malignos conhecidos estima-se que 5 a 10% sejam hereditários e 20 a 30%

correspondam a agrupamentos de tumores ocorridos em uma mesma família, ou tumores familiares (ASHG 1975, Lindor et al. 2008).

Tumores hereditários ocorrem a partir de uma predisposição herdada, que tem como origem alterações germinativas que conferem a seu portador um risco de câncer significativamente maior que o da população. Mutações germinativas ocorridas em genes de reparo e genes supressores de tumor são a causa principal destes tumores (Tucker e Friedman 2002). Levando em conta as estimativas brasileiras sobre a ocorrência do câncer no país em 2008, entre 23.336 a 46.673 dos tumores malignos ocorridos neste ano podem ser de origem hereditária. Estes dados são alarmantes, pois a maior parte destes tumores não é reconhecida como hereditário. A identificação de um indivíduo afetado por câncer hereditário é fundamental para a identificação dos familiares em risco e sua inclusão em programas de redução de risco e/ou prevenção do câncer (Hartmann et al. 1999; Eisen et al. 2000; Kauff et al. 2002; Rebbeck et al. 2002; Alpert e Haffty 2004; Kuhl et al. 2005; Narod e Offit 2005). Poucos serviços especializados no diagnóstico e aconselhamento genético (AG) de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC) existem no país e o acompanhamento prospectivo destes pacientes e seus familiares é fundamental para promover efetivamente estratégias de redução do risco de câncer nestes indivíduos.

1.3 O desenvolvimento de serviços de Oncogenética clínica no Brasil

A Oncogenética é a disciplina médica que visa avaliar pacientes que apresentem história familiar ou pessoal de câncer, sugestivas de hereditariedade,

como fator originário. No Brasil, serviços de Oncogenética se formaram frente à necessidade de acompanhamento de tais famílias, identificadas com frequência crescente nos serviços oncológicos. Entre os anos de 1999 e 2000, três serviços de Oncogenética iniciaram o atendimento nas capitais de São Paulo (São Paulo), Porto Alegre (Rio Grande do Sul) e Rio de Janeiro (Rio de Janeiro). Porto Alegre está 1.123km de São Paulo e a 1.752 km do Rio de Janeiro, e, juntamente com Curitiba, formam o eixo de capitais Sul-Sudeste (Palmero et al. 2007a). Nas regiões centro-oeste, norte e nordeste não existe nenhum serviço hospitalar reconhecido que preste atendimento a pacientes portadores de SPHC.

Os pacientes indicados para acompanhamento oncogenético apresentam histórico familiar de câncer, incluindo vários casos de um mesmo tipo de câncer na família ou diferentes tumores relacionados ao espectro de determinada síndrome, tumores em indivíduos jovens, tumores raros ou pacientes com tumores bilaterais, multifocais ou múltiplos. O acompanhamento consiste na avaliação inicial com detalhamento do histórico de saúde do paciente, história pessoal e familiar de câncer, questionamentos sobre hábitos e informações sobre a origem étnica. Após realizar consulta inicial com paciente, é formulada uma hipótese diagnóstica. O AG oferecido aos pacientes tem entre seus objetivos informar o paciente e seus familiares sobre o risco de câncer e reduzir o impacto sócio-emocional do diagnóstico, reduzindo o stress causado pela expectativa do resultado dos testes moleculares. O processo de AG é contínuo e envolve a orientação ao paciente sobre a importância de acompanhamento multidisciplinar para os familiares que apresentem alto risco para o desenvolvimento de neoplasias.

1.4 Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo, São Paulo

O Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo (HACC) em São Paulo foi criado em outubro de 1999, sendo pioneiro no Brasil. O atendimento oferece acompanhamento multidisciplinar e integrado com todas as especialidades. Tem como principal função fazer o diagnóstico das síndromes de predisposição hereditária ao câncer (Quadro 1).

Quadro 1. Síndromes de predisposição hereditária ao câncer.

Síndrome	Neoplasias associadas	Gene	Posição	Incidência	Referência
Câncer de Mama e Ovario Hereditários	Mama, ovário, próstata	BRCA1 BRCA 2	17q21 13q12-13	<1/400	Whittemore et al.2004
Li Fraumeni	SPM, SO, mama, SNC, ADR, CCR	<i>TP53</i>	17q13	< 1/5.000-10 000	Laloo et al. 2003 Sidransky et al. 1992
Câncer colorretal hereditário não-polipose (HNPCC) ou Lynch	CCR, endométrio, estômago, delgado, ovário, vias urinárias, mama	<i>MLH1</i> , <i>MSH2</i> , <i>MHH6</i> , <i>PMS2</i>	3p21.3, 2p22-p21, 2p16, 7p22	<1/300-3.000	Katballe et al. 2002; De La Chapelle 2005.
Polipose Adenomatosa Familiar (FAP)	CCR, tumor desmoide, tireóide	<i>APC</i>	5q21-q22	<1/10 000-30 000	Sifri et al. 2004; Benito et al. 2006.
Cowden	Mama, tireóide, endométrio, renal	<i>PTEN</i>	10q23.3.	<1/200000	Nelen et al. 1999
Peutz - Jeghers	Gastro-intestinais	<i>STK11</i>	19p13.3	<1/280 000	Hemminki et al. 1998
Câncer Gástrico Familiar	Estômago, lobular de mama	<i>CDH1</i>	16q22.1	1/10 000	Campeau et al. 2008
Melanoma Familiar	Melanoma, pâncreas	<i>CDKN2A</i>	9p21	0,2% dos melanomas	Pho et al.
Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 2	Carcinoma medular de tireóide, feocromocitoma	<i>RET</i>	10q11.2	1/30 000	Lindor et al. 2008
Doença de Von Hippel-Lindau	Renal, SNC	<i>VHL</i>	3p25-26	1/40 000	Lindor et al. 2008
Retinoblastoma Hereditário	Retinoblastoma, OS	<i>RB</i>	13q14	1/13.500	Lindor et al. 2008

O AG é oferecido a todos os pacientes que recebem o diagnóstico. Pacientes e seus familiares são orientados sobre as possibilidades de diagnóstico precoce e prevenção baseadas nas informações levantadas e no teste molecular sempre que possível. Atualmente tem um registro de mais de 4.000 pacientes e famílias que procuraram o serviço devido a suspeita da ocorrência de tumores hereditários em suas famílias.

1.5 AG em pacientes com síndromes de predisposição hereditária ao câncer

1.5.1 Definição de aconselhamento genético

AG é um processo de comunicação que trata dos problemas associados à ocorrência ou à possibilidade de ocorrência de um distúrbio genético em uma família. Centrais à filosofia e prática do AG encontram-se as seguintes premissas: utilização voluntária dos serviços, tomada de decisão informada, aconselhamento não-diretivo e não-coercitivo, proteção à privacidade e confidencialidade da informação genética e atenção aos aspectos psicossociais e afetivos relacionados ao impacto e manejo da informação genética (ASHG 1975; Kessler et al. 1979).

1.5.2 Quando encaminhar uma família para aconselhamento genético e avaliação do risco

Famílias que apresentam múltiplos casos de câncer, tumores bilaterais ou tumores diagnosticados em idades muito precoces em relação à média da idade ao

diagnóstico na população geral devem ser avaliados. Na maior parte das vezes não é possível chegar ao diagnóstico clínico da síndrome em um primeiro momento. O primeiro passo é a confirmação dos tumores ocorridos nos familiares, a partir de biópsias ou relatórios médicos, ou mesmo atestado de óbito. Com a confirmação dos dados, é possível o estabelecimento do diagnóstico clínico (Rocha et al. 2001).

A confirmação da síndrome poderá ser feita, na maioria dos casos, a partir do diagnóstico molecular para detecção de mutações germinativas de genes relacionados. Os rápidos avanços em técnicas de biologia molecular nas últimas décadas resultaram na identificação de genes que, quando alterados, aumentam significativamente o risco de desenvolver câncer, dentre eles o *TP53*, responsável pela síndrome de Li-Fraumeni.

1.5.3 Identificação de famílias com tumores hereditários

Mutações germinativas em genes diretamente ligados ao controle celular, os genes supressores de tumor, genes de reparo e oncogenes, levam a maior predisposição para o desenvolvimento de tumores hereditários. É importante ressaltar que a maioria destas síndromes tem penetrância incompleta, ou seja, indivíduos podem ser portadores da mutação patogênica e nunca desenvolverem câncer. O risco aumentado é transmitido de geração em geração sendo que a maior parte das SPHC tem caráter autossômico dominante, que originam um risco de 50% para a prole. Tumores hereditários podem ser identificados devido às características específicas que os diferem dos demais tumores: (1) ocorrem freqüentemente em indivíduos jovens; (2) presença de multifocalidade ou bilateralidade nos tumores (como no caso

dos tumores de mama ou tumores renais); (3) ocorrência de múltiplos tumores primários em um mesmo indivíduo e (4) ocorrência de câncer em vários familiares.

1.5.4 AG nas síndromes de predisposição hereditária ao câncer

O processo do AG de pacientes e famílias portadoras de síndromes de predisposição hereditária ao câncer inicia-se no momento da identificação do indivíduo em risco (Palmero et al. 2007b). Sendo assim, as informações transmitidas durante o AG devem permitir ao indivíduo compreender o diagnóstico e risco pessoal de desenvolver câncer; compreender o modo de herança das SPHC e seu risco de recorrência; compreender as opções disponíveis de manejo e controle do risco de ocorrência; facilitar a decisão sobre opções de manejo mais apropriadas para seu caso individual e aceitar melhor o diagnóstico e o risco de recorrência individual e/ou familiar (ASHG 1975; Nussbaum et al. 2002). A detecção das SPHC é possível através da realização de detalhada avaliação clínica dos pacientes e dos casos de câncer ocorridos nas famílias. Esta avaliação pode ser dividida em dez etapas, descritas a seguir:

1.5.4.1 Anamnese e exame físico

A avaliação é iniciada pela anamnese detalhada do paciente índice, seguida da avaliação da história familiar. É importante questionar sobre a ocorrência de tumores benignos e malignos ocorridos no paciente. Todos os pacientes devem ser questionados quanto à origem étnica, devido à maior prevalência de determinadas

mutações em certas populações, ou mutações fundadoras. Esta ocorrência deve-se à existência de efeito fundador descrita em algumas das SPHC. O exemplo mais representativo é o da população Ashkenazim, que apresenta em 2,5% de sua população três diferentes mutações nos genes *BRCA1* - 185delAG - 5382insC e *BRCA2* - 6174delT (Rubinstein 2004). A presença destas mutações confere aos portadores um risco de até 85% para o desenvolvimento de câncer de mama e de até 60% para câncer de ovário (Tonin et al. 1995, Roa et al. 1996). Como a população atual de judeus de origem Ashkenazim é de 8 milhões de indivíduos, estima-se que até 200 000 indivíduos desta origem sejam portadores de uma das mutações fundadoras (Behar et al. 2006). O risco para tumores colorretais hereditários também é maior nesta população, sendo relatada maior prevalência de mutações 1906C>G no gene *MSH2* nas síndromes do câncer colorretal hereditário, na população Ashkenazim (Guillem et al. 2003). Outro exemplo é a mutação fundadora no gene *CDH1* (E-Caderina) encontrada em famílias provenientes de Newfoundland, na Columbia Britânica, e com diagnóstico clínico da síndrome do câncer gástrico hereditário difuso (Kaurah et al. 2007).

A realização de exame físico, com foco na detecção de dismorfias, possibilitará a detecção de alterações que contribuam para o diagnóstico. Este é o caso da ocorrência do *habitus marfanoide* verificado em alguns pacientes portadores da síndrome da neoplasia endócrina múltipla 2B (MEN2B) (Holloway et al. 1995). No entanto, não existem relatos descrevendo alterações dismórficas em pacientes com a LFS/LFL.

1.5.4.2 História familiar e elaboração do heredograma

O questionamento e realização da história familiar é o ponto central da consulta de Oncogenética. Neste momento é avaliada a ocorrência de tumores benignos e malignos nos familiares do paciente-índice. Frente às informações fornecidas, o heredograma é construído, incluindo informações sobre todos os familiares, afetados com câncer ou não, grau de parentesco para com o caso-índice, tipo de tumor e idade ao diagnóstico. A partir da análise do heredograma é possível observar, por exemplo, o padrão autossômico dominante, que é o padrão de herança típico de um gene supressor de tumor (Del Giglio et al. 2000).

É recomendável que os tumores referidos, benignos ou malignos, sejam comprovados a partir de laudos histopatológicos, relatório médico ou atestado de óbito, para possibilitar um diagnóstico mais acurado. No entanto, o relato verbal deve ser anotado e avaliado caso a caso pelo profissional que está realizando o AG.

1.5.4.3 Diagnóstico

Após o levantamento dos dados relativos aos tumores ocorridos nos familiares e a confecção do heredograma, é possível a elaboração do diagnóstico clínico da SPHC pelo médico geneticista e é possível definir qual o teste molecular para a busca de mutações germinativas que ocasionem a síndrome. Algumas famílias não preenchem todos os critérios para determinada síndrome, mas apresentam tumores característicos. Isto pode ocorrer em famílias pequenas e estas também devem seguir os protocolos de rastreamento (Weitzel et al. 2007). Outro grupo

importante inclui famílias com múltiplos casos de câncer relatados em mais de uma geração, mas que não preenchem critérios para nenhuma síndrome. Estas famílias são classificadas como agrupamento familiar de tumores, não havendo rastreamento específico. Tumores atípicos isolados ou em idades precoces devem ser avaliados e podem indicar a necessidade de acompanhamento oncogenético.

Em algumas famílias verifica-se a sobreposição de fenótipos (Kim et al. 2004). Já foram descritas famílias portadoras de mutação germinativa em mais de um gene, como em uma família italiana portadora de mutações germinativas nos genes *TP53* e *BRCA2*, e em uma família portuguesa portadora de mutações germinativas em *TP53* e *CDH-1* (Manoukian et al. 2007). Diante de um quadro clínico com história familiar de câncer que preencha critérios de inclusão em mais de uma síndrome, os pacientes devem ser esclarecidos sobre as opções de realização do diagnóstico. A opção por qual teste molecular iniciar deve ser feita baseado na ocorrência das SPHC na população em questão e a síndrome mais frequente, relacionada ao perfil encontrado, deve ser a primeira a ser testada (Campeau et al. 2008). A realização do teste molecular para mais de uma síndrome vai depender de diversos fatores, dentre eles a disponibilidade laboratorial para a realização do teste para as diversas síndromes, do custo das diferentes análises e da voluntariedade do paciente.

1.5.4.4 AG pré-teste

O AG pré-teste vai abordar diversos aspectos, dentre eles: (1) as opções de teste disponíveis de acordo com a história familiar; (2) os possíveis resultados do

teste genético; (3) esclarecimentos sobre a síndrome; (4) informações sobre a transmissibilidade da mutação na família; (5) possíveis riscos envolvidos na realização do teste, o que envolve o risco de estresse psicológico e de discriminação; (6) esclarecimento sobre benefícios relacionados ao teste (7) orientações sobre a opção da não-realização do teste genético e opções de prevenção. É fundamental que o AG pré-teste seja individualizado e não-direcionado, de modo que o geneticista não interfira diretamente nas decisões do paciente. O paciente deve estar ciente de que o teste genético e a identidade do indivíduo são confidenciais, impedindo assim quaisquer dificuldades relacionadas à discriminação e proporcionando uma relação de confiança entre o paciente e o médico geneticista (Palmeiro et al. 2007a). As informações no AG pré-teste visam à orientação para que o paciente possa tomar uma decisão autônoma e adequada à suas necessidades individuais.

1.5.4.5 Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

O TCLE foi desenvolvido para manter o princípio de escolha autônoma do indivíduo e pela necessidade de tornar explícito o acordo entre pesquisador/médico e sujeito da pesquisa/paciente (Carter et al. 1995). A obtenção do TCLE é imprescindível para a realização de testes de predisposição genética ao câncer (NACHGR 1994; Olopade et al. 1998). A discussão dos elementos do consentimento deve ocorrer antes do teste, permitindo uma decisão autônoma quanto à realização do teste genético de predisposição (Reilly et al. 1997). Frente à opção pela realização do teste, o paciente deverá receber os esclarecimentos sobre o teste mediante a leitura do TCLE. Os elementos básicos do TCLE são (1) a autonomia, que possibilitará a

tomada de decisões consciente a partir das informações sobre o teste e compreensão dos significados dos possíveis resultados. O paciente receberá opções de estimativas de risco sem a realização do teste e informações sobre o risco de transmitir a alteração genética aos filhos, opção pela não-realização do teste. (2) A beneficência, ou o esclarecimento das opções e limitações de estratégias de rastreamento e manejo posteriores ao teste. (3) A não-maleficiência que debate a acurácia do teste e os riscos de estresse psicológico e discriminação. (4) O paternalismo, que envolve o esclarecimento sobre as condutas de notificação de outros familiares em risco, a confidencialidade e a possibilidade de seguimento em longo prazo (Olopade et al. 1998).

1.5.4.6 Teste genético

Famílias que preencherem os critérios diagnósticos das síndromes genéticas de predisposição ao câncer serão elegíveis ao teste genético. A detecção da mutação permitirá identificar os indivíduos em risco e buscar familiares portadores, mesmo que assintomáticos. A identificação de indivíduos em risco vai permitir que indivíduos afetados tomem conhecimento do risco aumentado em relação à população e de que existem protocolos de rastreamento ou guias de conduta a serem seguidas para a redução deste risco. Medidas de rastreamento e intervenções preventivas (cirurgias profiláticas e quimioprofilaxia) se mostram eficazes em reduzir significativamente o risco de câncer em portadores de mutação em diferentes genes (Rebbeck 1999; Hartmann et al. 1999; Eisen et al. 2000; Hartmann et al. 2001;

Meijers-Heijboer et al. 2001; Kauff et al. 2002; Rebbeck et al. 2002; Eisen et al. 2005).

1.5.4.7 AG pós-teste

No AG pós-teste o paciente receberá o resultado do teste e será informado quanto ao seu significado. Neste momento, são discutidas as conseqüências do resultado do teste. É proposta a investigação para os familiares em risco e são fornecidas informações sobre estratégias de prevenção e manejo frente ao risco de desenvolver câncer, de acordo com as recomendações da Sociedade Americana de Genética Humana (ASHG 1994). Este momento é delicado, pois envolve a abordagem direta de um resultado que tem grande impacto na vida do paciente (Peterson et al. 2008). É fundamental proporcionar ao paciente e a seus familiares a orientação e o suporte necessários para que estes possam adotar as estratégias de prevenção indicadas. As decisões reprodutivas também serão discutidas neste momento (Palmero 2007a). O impacto psicossocial da informação genética deve ser acompanhado de perto e sempre que possível os pacientes assistidos por psicólogos (Allain 2008; Beran et al. 2008; Lubin et al. 2008).

O teste genético deve ser oferecido como confirmação do diagnóstico clínico, porém o paciente deve estar bem informado a respeito de suas limitações, bem como dos seus possíveis resultados. Caso haja a detecção da mutação, esta poderá ser rastreada em seus familiares, possibilitando a identificação de portadores assintomáticos. No entanto, caso a mutação não seja detectada pelos métodos utilizados, o paciente deve estar ciente de que outros fatores não identificados podem

ocasionar a síndrome e que, mesmo sem o diagnóstico molecular, a família deverá continuar o rastreamento clínico (Hemminki e Eng 2004).

1.5.4.8 Estratégias de acompanhamento prospectivas

Após o diagnóstico ser realizado, é possível aplicarmos protocolos de rastreamento visando o diagnóstico precoce e a prevenção de tumores relacionados. O seguimento posterior, para avaliação das estratégias e dos desdobramentos derivados do estudo é fundamental. O acompanhamento das famílias em longo prazo é importante para manter a vigilância sobre a ocorrência de novos casos na família e para que os exames de rastreamento sejam repetidos com a frequência necessária. A cada retorno deve-se fazer o reforço das orientações preventivas e acompanhamento da aderência às recomendações. Este acompanhamento deve ser feito em jovens, adultos e idosos, buscando o acompanhamento e possível diagnóstico precoce de lesões relacionadas. A realização periódica dos exames indicados possibilita que tumores sejam detectados em estágio inicial, evitando procedimentos de alto custo que seriam necessários no tratamento de tumores avançados como cirurgias de grande porte e longas internações, assim como tratamentos de quimioterapia.

1.5.4.9 Limitações do teste genético

Fatores limitantes do teste genético incluem: (1) a existência de alterações que não são detectáveis pelos métodos mais comumente utilizados (como grandes deleções); (2) a existência de mutações cujo impacto funcional no gene alterado é

desconhecido; (3) herança multigênica das SPHC e o desconhecimento de todos os mecanismos moleculares envolvidos, podendo existir genes relacionados à doença que ainda não foram identificados. Este fator se evidencia pelo número considerável de famílias com múltiplos critérios clínicos para uma síndrome de predisposição nas quais não são encontradas mutações germinativas em genes reconhecidamente causadores do fenótipo; (4) a evidência de que um resultado positivo indica predisposição e não certeza para o desenvolvimento de um tumor (Hall et. 2006).

1.6 Síndrome de Li-Fraumeni

1.6.1 Histórico

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS; OMIM# 151623) é uma síndrome de predisposição ao câncer transmitida de forma autossômica dominante. Em 1969, os pesquisadores Li e Fraumeni revisaram 280 prontuários e 418 atestados de óbito de crianças norte americanas que tiveram o diagnóstico de rabdomiossarcoma. Buscando informações sobre a história familiar destes pacientes, verificaram que dentre as famílias estudadas, cinco apresentavam um perfil de alta ocorrência de tumores nas gerações avaliadas, incluindo familiares com diagnóstico de sarcoma na infância e casos de câncer de mama em idade jovem (Li e Fraumeni 1969a). As famílias avaliadas relataram ainda a presença de outras neoplasias em gerações precedentes. A partir da observação do agrupamento pouco comum de tumores malignos em idade precoce, que sugeria um padrão de transmissibilidade hereditária,

os autores propuseram uma nova síndrome de câncer familiar relacionada a diversos tumores - a Síndrome de Li- Fraumeni (Li e Fraumeni 1969b).

A caracterização inicial do espectro tumoral da síndrome foi realizada a partir de critérios que incluíam um indivíduo portador de sarcoma em idade jovem além de dois familiares de primeiro e/ou segundo grau portadores de osteossarcomas (SO), sarcomas de partes moles (SPM), câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, cânceres do sistema nervoso central (SNC), carcinomas adrenocorticais (ADR) e leucemias agudas sendo inicialmente denominada SBLA (do inglês *sarcoma, breast, leukemia and adrenocortical tumor syndrome*) (Lynch e Guirgis 1979) Relatos posteriores caracterizaram esta síndrome pela concentração familiar de SPM, SO, SNC, ADR e cânceres de mama, diagnosticados antes dos 45 anos de idade (Li et al. 1988; Malkin et al. 1990). A ocorrência de um espectro tumoral mais amplo também foi verificada, incluindo cânceres de pulmão, próstata, estômago, cólon, pâncreas, esôfago, além de tumores de células germinativas e melanoma (Hartley et al. 1989; Varley et al. 1997a). Tumores de células germinativas, papilomas do plexo coróide e tumor de Wilms' também foram descritos em portadores da síndrome (Garber et al. 1990; Hartley et al. 1993).

Estima-se que pacientes com LFS apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, comparados a 1% na população geral, e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 60 anos de idade (Birch et al. 2001). A LFS predispõe indivíduos afetados a um risco aumentado para o desenvolvimento de múltiplos tumores em idade jovem. Antecipação nas sucessivas gerações de portadores foi verificada em famílias com a síndrome (Trkova et al. 2002). Acredita-se que pacientes portadores da síndrome que desenvolveram algum tumor na infância

sejam mais predispostos à ocorrência de múltiplos tumores primários (Hisada et al. 1998).

Visando definir o diagnóstico clínico das famílias que não tinham a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome, mas que apresentavam tumores típicos em idade precoce, um critério diagnóstico adicional ao da LFS clássica foi proposto, sendo denominado Li-Fraumeni variante ou Li-Fraumeni-like (LFL) (Birch et al. 1994). Posteriormente, Eeles (1995) e Frebourg et al. (2001) propuseram a inclusão de critérios mais abrangentes para a variante LFL, incluindo famílias nas quais eram detectados pelo menos dois tumores típicos do espectro da síndrome ou pacientes com múltiplos tumores independente da história familiar.

A prevalência da LFS/LFL no mundo ainda não foi completamente estabelecida, porém a partir de estudos conduzidos nos Estados Unidos da América e na Europa, estima-se que mutações germinativas no gene *TP53* ocorram em baixa frequência, acometendo 1 a cada 5.000 indivíduos (Lalloo et al. 2003; Garber e Offit 2005). A prevalência em pacientes portadores de câncer de mama não selecionados para história familiar é de aproximadamente 0,25% (Sidransky et al. 1992).

1.6.2 Diagnóstico clínico da LFS/LFL

O diagnóstico da síndrome inicialmente é clínico, realizado a partir da observação e anotação dos diversos casos relatados pelas famílias avaliadas. Os critérios para determinação do diagnóstico clínico são o clássico LFS e suas variantes LFL Birch, Eeles e Chompret (Li et al. 1988; Birch et al. 1994; Eeles 1995; Frebourg et al. 2001) (Quadro 2).

Quadro 2. Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni.

Clássico Li e Fraumeni	<ul style="list-style-type: none"> • Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) E • Familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) E • Familiar de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.
Variante Birch	<ul style="list-style-type: none"> • Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou ADR antes dos 45 anos E • Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni *(sarcoma, câncer de mama, SNC, ADR ou leucemia) em qualquer idade E • Familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.
Eeles	<ul style="list-style-type: none"> • LFL-E1 presença de dois familiares de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático). • LFL-E2: sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo) câncer de mama <50 anos e/ou tumor SNC, leucemia, ADR, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático aos <60 anos ou sarcoma em qualquer idade.
Chompret	<ul style="list-style-type: none"> • Sarcoma, SNC, câncer de mama ou ADR antes dos 36 anos E <ul style="list-style-type: none"> a) Familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos OU b) Familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade OU • Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, SNC, câncer de mama ou ADR, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar OU • ADR em qualquer idade e independente da história familiar.
Chompret modificado	<ul style="list-style-type: none"> • Paciente-índice com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma de partes moles, osteosarcoma, câncer de mama pré-menopausal, SNC, ADR, leucemia e carcinoma brônquio-alveolar de pulmão) antes dos 46 anos E • Familiar de primeiro ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores OU • Paciente-índice com múltiplos tumores , sendo pelo menos dois do espectro LFS e o primeiro antes dos 46 anos OU • ADR em qualquer idade ou câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes BRCA1 ou 2

Recentemente o critério de Chompret foi revisto, sendo definido o critério de Chompret modificado (Bougeard et al. 2008). Os pesquisadores revisaram os critérios iniciais propostos pelo grupo, incluindo tumores de mama em mulheres antes dos 36 anos na ausência de mutações nos genes BRCA 1 e 2. Este critério serviu como base para a definição dos critérios que estão atualmente sendo elaborados pelo Grupo de Trabalho Internacional sobre a LFS, que se reuniu no Simpósio Internacional para a LFS em novembro de 2007 em Lyon, na França, com o intuito de melhor compreender a LFS e para definir critérios e estratégias de acompanhamento.

1.6.3 Espectro tumoral da LFS/LFL

O espectro tumoral inicialmente relacionado à LFS/LFL foi revisto após a descrição de diversos outros tipos de tumores ocorridos em famílias que receberam o diagnóstico da síndrome. Frebourg et al. (2001) demonstraram a ocorrência de melanoma, tumores de células germinativas, tumores de estômago e tumores de Wilms' nas famílias portadoras da síndrome. Nichols et al. (2001) avaliaram 738 tumores malignos provenientes de 45 indivíduos portadores da mutação em *TP53* e em seus familiares de primeiro grau, além de 140 casos relatados na literatura, e concluíram que os seis tumores inicialmente descritos como critérios típicos da LFS (mama, SPM, SO, SNC, leucemia e ADR) correspondiam a 77% dos tumores diagnosticados nas famílias portadoras das mutações germinativas no gene *TP53*.

Birch et al. (2001) realizaram um estudo no qual o espectro de tumores ocorrido em 28 famílias britânicas com diagnóstico da LFS/LFL foi comparado ao de registros de tumores da população do Reino Unido. Isto permitiu a identificação dos

tumores ligados de forma significativa à síndrome. Os tumores que ocorreram com frequência significativamente maior na síndrome foram o câncer de mama, SPM, SO, ADR, SNC, tumor de Wilms' e tumor Phyllodes maligno da mama. Até o ano de 2007, 899 tumores haviam sido descritos em mais de 24 sítios tumorais distintos em portadores de mutações germinativas do gene *TP53* (IARC *TP53* database, R12) (Petitjean et al. 2007b)(Figura 2).

FONTE: modificado de IARC, *TP53* database, versão R12, novembro de 2007.

Figura 2. Tumores associados com mutações na linhagem germinativa de *TP53*

1.6.4 Acompanhamento e rastreamento na LFS/LFL

A LFS é uma síndrome de difícil acompanhamento por apresentar um espectro tumoral amplo e diversificado (Varley et al. 1997a). Até o momento, existem poucas estratégias de rastreamento reconhecidamente eficazes. O

rastreamento de lesões em mama a partir de idade jovem é, no momento, a única estratégia recomendada no acompanhamento destes pacientes (*National Comprehensive Cancer Network - NCCN 2008*) (Quadro 3).

Quadro 3. Estratégias de rastreamento na LFS/LFL - NCCN.

Rastreamento	Adultos em Risco
Risco para câncer de mama	Educação para o auto-exame das mamas a partir dos 18 anos Exame clínico das mamas semestral a partir dos 20-25 anos Mamografia anual a partir de 20-25 anos Ressonância magnética das mamas anual realizado seis meses após da mamografia. Informar sobre cirurgia redutora de risco bilateral (individualizar a cada família) e AG sobre grau de proteção e possibilidades de reconstrução
Risco para câncer colorretal	Colonoscopia a cada 2 a 5 anos a partir dos 25 anos
Risco para outros tumores	Avaliação e exame dermatológico e neurológico anual
Tumores raros	Exame clínico com foco na detecção de tumores raros e novos tumores primários
Agrupamentos de tumores	Rastreamento direcionado aos tumores ocorridos nas famílias
	Crianças em risco
Tumores infantis	Informar pediatras sobre risco de tumores infantis

Como o câncer de mama atinge até 30% de todas as mulheres portadoras da síndrome, torna-se o principal alvo para estratégias de rastreamento de tumores na síndrome. Foi sugerido por Thull e Vogel (2004) que mulheres portadoras da mutação no gene *TP53* deveriam considerar a possibilidade da realização da cirurgia redutora de risco para as mamas, ou mastectomia profilática bilateral. Uma vez oferecido e iniciado o acompanhamento aos pacientes com diagnóstico da LFS/LFL, estes devem ser informados quanto à dificuldade do rastreamento. Deve ser

ressaltada a importância do acompanhamento clínico freqüente e especializado. Os pacientes devem ter conhecimento do amplo espectro tumoral da síndrome, assim como de sua expressividade variável, e saber como detectar possíveis sintomas relacionados a tumores, tais como emagrecimento repentino, hiperemia e prurido na região da mama ou sangramentos em mucosa gengival. O rastreamento baseado nos tumores mais freqüentemente apresentados pelas famílias deve ser preconizado, ou seja, em famílias com alto índice de câncer de estômago, o exame de endoscopia digestiva alta deve ser realizado em todos os indivíduos em risco, e lesões suspeitas devem ser acompanhadas por um gastroenterologista. Pacientes portadores da síndrome que sobreviveram à primeira neoplasia devem prosseguir o rastreamento devido ao a risco de desenvolvimento de novas lesões primárias (Hisada et al. 1998).

O maior desafio de todos os profissionais que acompanham pacientes portadores da síndrome é o acompanhamento de crianças. A ocorrência de tumores infantis está na essência da síndrome e faz parte dos critérios clássicos assim como dos outros critérios variantes. No entanto, são tumores que podem ocorrer em múltiplos sítios, como SNC, osso ou regiões de partes moles. O acompanhamento de crianças que são possíveis portadoras é controverso devido ao fato de não existir nenhum exame específico que venha reduzir a incidência ou mesmo levar ao diagnóstico precoce dos tumores relacionados à LFS/LFL na infância. A introdução de dosagens hormonais e por métodos de imagem para detecção precoce de ADR em crianças portadoras da mutação R337H no gene *TP53* foi proposta por Pereira (2006). Os pediatras que acompanham crianças que são portadoras da síndrome devem ser informados sobre o diagnóstico e risco, e o acompanhamento clínico deve ser freqüente (NCCN 2008). Visando o acompanhamento destes pacientes, David

Malkin da Universidade de Toronto vem desenvolvendo um protocolo de pesquisa no qual avalia anualmente as crianças portadoras da síndrome com ressonância magnética de corpo inteiro (Malkin 2008 - comunicação pessoal). Este é considerado um procedimento controverso, pois expõe as crianças a anestesia necessária na imobilização para a realização do exame em boas condições, além do alto custo que o inviabiliza na maior parte dos centros.

A multiplicidade de tumores observados na síndrome levou aos pesquisadores do Hospital Dana-Farber, nos Estados Unidos, a realizar um estudo avaliando a utilidade da tomografia computadorizada por emissão de pósitrons (PET-CT) em portadores assintomáticos de mutações germinativas no gene *TP53*, visando à detecção de tumores malignos em estágios iniciais (Digianni et al. 2008). Dentre 15 indivíduos acompanhados por dois anos, três (20%) desenvolveram um câncer, sendo verificados dois casos de tumores papilíferos de tireóide (estágios II e III) e um caso de adenocarcinoma de esôfago (estágio II). Frente aos resultados observados, os pesquisadores sugeriram que existe benefício referentes à detecção precoce porém o risco a exposição a radiação e custo devem ser reavaliados (Masciari 2007).

Tumores colorretais foram descritos na literatura como parte do espectro Li-Fraumeni, mas até recentemente eram considerados como tumores ocasionais e não faziam parte do grupo de tumores mais relacionados à LFS/LFL. No entanto, após estudo realizado por Wong et al. (2006), verificou-se que de 62 famílias portadoras da síndrome, 32 apresentavam ao menos um tumor gastrointestinal, representando 51% de todas as famílias portadoras da LFS/LFL. Os tumores colorretais foram 12,5% de todos os tumores referidos (8/62). Estes tumores ocorreram predominantemente em idade jovem, em média aos 33 anos, sendo que dentre os

tumores ocorridos, quatro deles foram detectados em indivíduos antes dos 21 anos (aos nove, 11, 15 e 20 anos). Desta forma, foi sugerida a inclusão de colonoscopia no programa de rastreamento de tumores em portadores da síndrome. Isto ocorreu na última revisão das estratégias de rastreamento propostas pelo NCCN realizada em fevereiro de 2008, sendo a colonoscopia incluída como um dos exames considerados necessários, devendo ser realizada inicialmente antes dos 25 anos e repetida a cada dois a cinco anos.

1.7 O gene supressor de tumor *TP53*– estrutura e função

1.7.1 Histórico

O *TP53* foi descrito há quase 30 anos, por dois grupos distintos de pesquisadores, liderados por David Lane, da Universidade de Dundee, no Reino Unido, e Arnold Levine, da Universidade de Princeton, nos Estados Unidos da América como um gene codificante de uma proteína capaz de ligar o antígeno T do vírus SV40 (Lane e Crawford 1979; Linzer e Levine 1979, May e May 1979) (Quadro 4). Foi considerado por muito tempo um oncogene devido à hiper-expressão de seu produto na maior parte dos tumores humanos. No final dos anos 80 verificou-se que esta propriedade devia-se a apenas algumas formas mutantes do gene, enquanto que o gene selvagem tinha a capacidade de suprimir a transformação de um tumor, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Finlay et al. 1989). Além disso, foi verificado que a proteína produzida pelo *TP53*, a p53, em sua forma selvagem, reprime a proliferação celular e a sua atividade funcional. Desta forma, foi classificado como gene pertencente à família dos anti-oncogenes ou genes supressores de tumor

(Levine et al. 1991). Inicialmente, os genes supressores de tumores foram descritos como sendo capazes de reprimir a proliferação a partir da inibição da expressão dos oncogenes (Den Otter et al. 1990). Dois anos mais tarde, camundongos “nocauteados” (Trp53) ou *knock-out*, portadores de mutações em um dos alelos do gene *TP53*, foram desenvolvidos em laboratório. Os camundongos apresentaram desenvolvimento físico normal, porém apresentaram tumores múltiplos em idade precoce demonstrando, a partir de um modelo animal, a importância da proteína p53 na etiologia dos tumores malignos (Donehower et al. 1992).

Quadro 2. Histórico dos 20 anos de descobrimento da p53.

1979	Descobrimto do gene <i>TP53</i>
1983	<i>TP53</i> é descrito como um oncogene
1985	Clonagem do gene <i>TP53</i> humano
1989	O gene em sua forma selvagem (<i>wild type</i>) é definido como supressor tumoral
1989	Perda de heterozigose e detecção de mutações no <i>TP53</i> no câncer
1990	A p53 é definida como fator de transcrição
1991	Participação da p53 na resposta celular ao dano ao DNA
1991	A p53 induz apoptose
1992	Camundongos <i>TP53</i> ^{-/-} desenvolvem tumores espontaneamente
1993	Mutações em <i>TP53</i> são associadas a pior prognostico em câncer de mama
1994	Estrutura cristalizada de p53 em complexo com DNA
1996	A p53 está induzida por hipóxia
1997	Papel do <i>MDM2</i> na regulação da estabilidade de p53 (em camundongos)
1999	Descrição de 10 000 mutações humanas em <i>TP53</i>
1999	Ação de p53 no reparo de DNA
2002	Expressão constitutiva de p53 acelera envelhecimento em camundongos
2002	Descoberta de N- terminal, variante truncado de p53
2003	Papel da p53 no remodelamento da cromatina
2004	Terapia alvo para o câncer - wt p53

FONTE: adaptado de Hainaut e Wiman (2004).

Em 1990, a LFS foi associada a mutações germinativas no gene *TP53* (OMIM #191170) (Malkin et al. 1990). O gene *TP53* foi escolhido como candidato por ser o gene mais frequentemente mutado na maior parte dos tumores malignos esporádicos. Estudos subsequentes demonstraram que mutações germinativas no gene *TP53* estavam presentes em grande parte das famílias com o perfil clínico da síndrome (Srivastava et al. 1990). Birch et al. (1994) analisaram 21 famílias, sendo que 12 preenchiam os critérios clássicos propostos por Li e Fraumeni, além de nove famílias que apresentavam características semelhantes à síndrome, mas que, no entanto, não preenchiam todos os pré-requisitos para estabelecimento do diagnóstico clínico de LFS. Das nove famílias que apresentavam perfil semelhante à LFS, sete apresentaram uma mutação germinativa no gene *TP53*.

Até o momento, 399 famílias com mutações germinativas em *TP53* foram descritas no mundo inteiro no banco de dados de mutações germinativas no gene *TP53* da Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (*International Agency for Research on Cancer* – IARC), órgão da Organização Mundial da Saúde (OMS) (IARC *TP53* database, R12) (Petitjean et al. 2007b). Aproximadamente 71% das famílias com LFS clássica, 22% das famílias com LFL Birch, 8% das famílias com LFL Eeles são portadoras de mutações germinativas na linhagem germinativa do gene *TP53* (Varley et al. 1997). Dados recentes mostram que 29% das famílias com LFL Chompret têm mutações germinativas no gene *TP53*. (Bougeard et al. 2008)

1.7.2 Características do gene *TP53*

O gene *TP53* (MIM #191170) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) e codifica uma fosfoproteína nuclear de massa molecular de 51 a 53 KDa.

O tamanho aproximado do *TP53* é de 20 kb. É composto por onze éxons, sendo o primeiro deles não codificante e apresenta um primeiro íntron longo (10 kb). A sequência codificante contém cinco domínios, cada um deles responsável por funções específicas (May e May 1999) (Figura 3). Esta estrutura básica demonstra o alto grau de conservação em vertebrados. Nos invertebrados, as sequências relacionadas ao *TP53* foram descritas em moluscos e em drosófilas, no entanto não foram descritas em leveduras (Borrensens et al. 1991).

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

Figura 3. O gene *TP53* e a proteína p53.

O domínio inicial (aminoácidos 1 a 62), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína *MDM2*. É seguido por um domínio rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97) e pela região central da p53 (aminoácidos 102 a 292), que abriga o domínio de ligação ao DNA. O domínio de ligação ao DNA é alvo de mais de 90% das mutações somáticas encontradas nos tumores humanos esporádicos e das mutações germinativas encontradas na LFS/LFL. O domínio de oligomerização (aminoácidos 323 a 356) é

fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros. O domínio final é o de regulação (aminoácidos 363 a 393).

Diversas variações na sequência do DNA do gene *TP53* foram descritas em estudos populacionais que não levam a alteração relacionada ao aumento de risco em indivíduos portadores. Estas alterações são consideradas polimorfismos. Até o momento, 36 polimorfismos foram descritos no gene *TP53* (IARC *TP53* database, R12) (Petitjean et al. 2007b). Estes polimorfismos foram identificados na população humana, com frequências alélicas que divergem entre as diferentes origens étnicas. As consequências funcionais dos polimorfismos intragênicos ainda não estão completamente elucidadas. Os mecanismos pelos quais esses polimorfismos poderiam afetar a função da proteína p53 incluem aumento da mutabilidade devido à alteração contextual da sequência do DNA, aumento de eventos de processamento gênico, ou *splicing*, e alteração da estabilidade transcricional e expressão tecido específica (Lozano et al. 1991; Mattick et al. 1994).

1.7.3 A família de genes relacionados ao *TP53*

Dois genes relacionados ao *TP53* foram identificados no cromossomo 1p36 (*TP73*, OMIM 601990) e no cromossomo 3p28 (*TP63*, OMIM 603273), que produzem as proteínas p73 e p63 respectivamente. Da mesma forma que o *TP53*, seus produtos são fatores de transcrição que se ligam a sequências específicas de DNA. Apresenta uma região N-Terminal, uma região central contendo o domínio de ligação ao DNA e uma região C-terminal que contém uma região de oligomerização

(Ying et al. 2005) (Figura 4). Em contraste com o *TP53*, estes dois genes têm funções predominantemente relacionadas à regulação do desenvolvimento e morfogênese, e reduzida ação de supressão tumoral. Logo, *TP53* pode ser considerado como uma versão especializada de um gene regulador do crescimento que responde ao estímulo do stress ao invés de responder aos estímulos do desenvolvimento (Courtois et al. 2004).

Figura 4. Interação entre p53, p63 e p73.

Estes três genes diferem quanto a seu padrão de expressão e função: enquanto o *TP53* é ubíquo, a expressão de *TP73* e de *TP63* é específica, dirigida a certos tecidos relacionados ao desenvolvimento e morfogênese, e é regulado por *splicing* alternativo que resulta na produção de suas diferentes isoformas com variações nas regiões N-e C- terminal. A inativação destes genes em camundongos resulta em diferentes fenótipos. A inativação do gene *TP53* em camundongos leva a um fenótipo letal, com defeitos no fechamento do tubo neural em 25% das fêmeas. No entanto não são verificadas outras alterações no desenvolvimento. Estes animais

apresentam, no entanto, alto risco para o desenvolvimento de múltiplos tumores malignos.

Camundongos com o gene *TP73* deficiente não têm risco aumentado para câncer, mas apresentam um padrão complexo de malformações epiteliais, neuro-sensoriais e inflamatórias. Malformações cranianas, ausência de broto mamário e próstata e alterações no epitélio escamoso podem ser verificadas em camundongos *TP63*-deficientes. Camundongos deficientes em p63 exibem diversos defeitos no desenvolvimento de órgãos epiteliais, de membros e de estruturas craniofaciais, falecendo logo após o nascimento. Apresentam membros malformados e truncados e não apresentam folículos pilosos, dentes, próstata e glândulas mamárias, lacrimais e salivares (Celi et al. 1999). Trabalhos recentes sugerem que o p63 seja essencial para a manutenção de uma população de células precursoras (células tronco) em vários tecidos epiteliais.

Nos humanos, mutações germinativas em *TP63* são associadas com diversas malformações congênitas, e síndromes genéticas específicas como a Síndrome de Ectrodactilia, Displasia Ectodérmica e Fendas Faciais EEC (Ectrodactyly, Ectodermal Dysplasia, and Facial Clefts, MIM 604292) a síndrome SHFM4 (Split-Hand Foot Malformation 4, MIM 605289), a Displasia Ectodérmica com Palato Fendido e a Síndrome Malformativa de Membros e Mamas (Limb-Mammary Syndrome) (LMS; MIM 603543). Mutações germinativas no gene *TP73* ocasionam a síndrome de ADULT, que envolve alterações Acro-Dermato-Ungo-lacrimais e em Dentes (ADULT; MIM 103285) e a Síndrome de Hay-Wells ou AEC (ankyloblepharon-ectodermal dysplasia-clefting, MIM 106260), que leva a Displasia Ectodérmica Congênita, Pálato Fendido e Alterações Congênitas em Pálpebras (Van

Bokhoven et al. 2001; Duijf et al. 2002; South et al. 2002; Van Bokhoven et al. 2002).

1.7.4 A proteína p53

A proteína p53 contém 393 aminoácidos (aa) em sua estrutura. Apresenta uma região central hidrofóbica, codificada pelos éxons 5 a 8 (aa 110-296), flanqueados por regiões hidrofílicas: uma região N-terminal ácida e uma C-terminal básica. A região N-terminal contém dois domínios complementares de ativação da transcrição, sendo que o principal se localiza nos aa 1 a 42 e o segundo, que está relacionado a diversos genes pró apoptóticos, ocorre os aa 55 a 75. A região central é constituída de um esqueleto de duas fitas em estrutura beta sustentando um grupo flexível de voltas e hélices estabilizadas pela ligação de um átomo de zinco. Estas voltas e hélices estabelecem contato direto com seqüências de DNA contendo repetições invertidas do motivo RRRC(A/T) (GAGCTAGCTC ou GGGCTTGCCC). A porção C-terminal final tem múltiplas funções regulatórias e exerce controle negativo sobre atividades de ligação ao DNA seqüências-específicas. A região C-terminal contém os principais sinais de localização nuclear e domínios de oligomerização (resíduos 325-366). A forma ativa da proteína é um tetrâmero, formado a partir da união de dois dímeros fundamentais. Tanto a região N- quanto C-terminal contém múltiplos sítios de fosforilação ativados por quinases envolvidas frente ao stress, incluindo os produtos dos genes *ATM*, *CHEK1/2*, *ATR*, *JUNK*, *PKC* ou *CDC2*.

1.7.5 A regulação da expressão

O gene *TP53* não contém a sequência convencional de *TATA box* e está sob o controle de diversos fatores de transcrição tais como Nf-kappaB, Sp1 e c-Jun. O transcrito de p53 tem 2,8kb. O códon de iniciação está localizado no éxon 2, mas existe um sítio alternativo de iniciação no códon 40, que leva à produção de uma proteína que perde a região N-terminal e que contém o domínio de ativação da transcrição, denominado DeltaNp53 (Courtois et al. 2002). Recentemente, foi identificado um transcrito que retém o íntron 2 por *splicing* alternativo (Ghosh et al. 2004). Este transcrito possibilita a síntese de Delta Np53, porém não codifica a proteína p53 na sua forma integral. Este mesmo modo de regulação foi identificado nos outros genes da família de *TP53*, *TP63* e *TP73*. Assim, a produção de Delta Np53 e a transcrição de isoformas, que são deficientes se comparadas à atividade da proteína integral, podem ser consideradas como uma característica comum à família de genes do *TP53*.

1.7.6 Regulação pós-traducional: sinalização de danos ao DNA

A proteína p53 está expressa na maioria das células e tecidos de forma latente. Devido a curta vida média, que dura de cinco a 20 minutos, a proteína não se acumula no núcleo, a menos que seja estabilizada em resposta ao estresse. O estresse pode ser um dano ao DNA, bloqueio da elongação do RNA, hipóxia, depleção de microtúbulos, ribonucleotídeos ou fatores de crescimento, modulação da adesão celular e alteração do metabolismo das poliaminas. O principal regulador da p53 é a

proteína *MDM2*, que se liga à região N-terminal da p53 (aa 17 a 29), formando o complexo p53/*MDM2*. Este complexo possibilita o redirecionamento da p53 do núcleo para o citoplasma, onde age como uma ubiquitina-ligase, possibilitando a degradação de p53 pelos proteassomos. O complexo p53/Mdm-2 é regulado por p14Arf (*Alternative Reading Frame*), uma proteína de 14 kD codificada por uma leitura alternativa da matriz de leitura aberta do gene *CDKN2A*, que também codifica o gene supressor de tumor *p16* (Stott et al. 1998). A extensão e conseqüências da ativação de p53 vão depender da intensidade dos sinais de indução e da sua origem. No caso da resposta a exposição à radiação ionizante, a ativação da p53 ocorrerá a partir da fosforilação de sua região N-terminal por quinases regulatórias do ciclo celular tais como Atm, o produto do gene *ATM* mutado, e Chk2, produto do gene *CHEK2*. A fosforilação levará à dissociação do complexo p53/Mdm-2 e logo à ligação a co-ativadores transcricionais tais como p300/CBP e pCAF, que acetilam p53 na região C-terminal. Estas modificações e as relacionadas à região C-terminal induzem mudanças conformacionais na proteína que a levam a uma forma ativa que apresenta alta afinidade a elementos específicos de resposta ao DNA e estabilização da p53 (Moll e Petrenko 2003).

1.7.7 A proteína p53 como fator fundamental no controle do ciclo celular, na apoptose e no reparo ao DNA

Uma vez ativada, a p53 exerce seus efeitos a partir de dois mecanismos principais: (a) controle transcricional a partir da ativação ou repressão de genes específicos, e (b) pela sua interação no funcionamento de outra proteína a partir da

formação de complexos. Mais de 50 genes foram descritos como envolvidos em elementos de resposta à p53. Eles incluem reguladores de pontos de checagem do ciclo celular em G1/S, G2 e durante a mitose. A ativação de p53 resulta na parada do ciclo celular em G1 e/ou G2/M, que vai possibilitar o reparo no ciclo celular, ou o encaminhamento da célula para a apoptose (Figura 5).

Figura 5. Ilustração esquemática das vias de ação da proteína p53.

A forma pela qual a célula define qual a resposta de p53 frente à agressão, ou seja, se ocorrerá a parada do ciclo celular ou direcionamento para apoptose, depende da natureza e amplitude do estresse ocorrido, assim como do tecido em que a célula se encontra e de seu nível de diferenciação celular. Na célula irradiada por raios UV, assim como no intestino submetido à radiação por raios gama, há ativação de p53

dependente do nível de diferenciação celular: ocorre de forma elevada em células com alto potencial proliferativo (células basais da pele e parte inferior das criptas do intestino), de forma moderada em células em vias de diferenciação (camada basal das vilosidades do intestino) e há uma menor estimulação no caso das células com alto grau de diferenciação (Wilson et al. 1998). Desta forma, as diferentes respostas possibilitam a neutralização de células que possuem alto risco de propagação de células com defeitos em seu DNA, enquanto que as células que são importantes para a manutenção da integridade do tecido permanecem vivas.

1.7.8 Mutações em *TP53* no câncer em humanos

O gene *TP53* é freqüentemente inativado por mutações de ponto do tipo *missense*, ou troca de sentido, que promovem alterações de aminoácidos de p53 (Olivier et al. 2003, Petitjean et al. 2007b). Este fato o diferencia da maior parte dos genes supressores de tumor envolvidos nas síndromes genéticas ligadas ao câncer, tais como *APC*, *RBI* ou *BRCA1*. Estes genes geralmente são inativados por deleções, que envolvem a perda de seqüências do gene de variados tamanhos (micro deleções até perdas cromossômicas), ou por mutações de ponto do tipo *nonsense*, ou perda de sentido, nas quais ocorre uma inserção de um códon de terminação ocasionando parada prematura da tradução (Hainaut e Hollstein 2000). Das mais de 25 mil mutações descritas até hoje no gene *TP53*, aproximadamente 75% são substituições de um par de bases e a maior parte ocorre em regiões exônicas localizadas no domínio de ligação ao DNA. Aproximadamente 30% das mutações de troca de sentido ocorrem em seis códons preferenciais (175, 245, 248, 249, 273 e

282), ou “*hot-spots*” (Figura 6). Outras mutações foram descritas em mais de 200 diferentes códonos. Não existem evidências de que o *TP53* seja localizado em uma região excessivamente suscetível a mutações. Assim, a alta frequência e distribuição de mutações neste gene sugere a aquisição de uma vantagem seletiva para a tumorigênese induzida pela mutação. Logo, mutações ocorridas na p53 dão a célula a possibilidade de continuar crescendo e se multiplicando, sendo esta uma vantagem seletiva para o crescimento. Isto ocorrerá porque frente à p53 mutada, células mutantes não sofrerão a ação da p53, dando origem a novos clones de células transformadas.

Figura 6. Mutações mais frequentes no gene *TP53*

A partir da hipótese formulada por Knudson em 1971, o gene *RB1* foi o protótipo dos genes supressores de tumores. Foi postulado que o retinoblastoma poderia apresentar-se de forma esporádica e germinativa e que seriam necessários dois eventos mutacionais para o desenvolvimento do tumor. Atualmente sabe-se que estas duas mutações, ou dois eventos descritos por Knudson, são referentes à perda de função dos dois alelos do gene supressor de tumor *RB1*. Estas mutações são inativadoras e criam dois alelos nulos (Weinberg 1990). Entretanto, no gene *TP53*,

certas mutações de troca de sentido têm efeito estabilizador e levam ao acúmulo da proteína mutante no núcleo da célula tumoral, mesmo na presença de um alelo selvagem remanescente. Esta especificidade permitiu que se desenvolvesse o uso da imunohistoquímica para a detecção da p53 mutante em células tumorais. É importante ressaltar que em uma parcela expressiva das mutações, como nas mutações do tipo perda de sentido, inserções e deleções, não há acúmulo de proteína mutante e há acúmulo de p53 selvagem no núcleo. Desta forma, conclui-se que a imunohistoquímica não é uma alternativa indicada para o rastreamento ou análise de mutações.

A principal função supressora do *TP53* é a perda de função. No entanto, determinados alelos mutantes freqüentemente produzem altos níveis de proteína mutante que acumula na célula. Esta proteína mutante liga-se a p53 selvagem produzida pelo alelo normal e, como a forma mutante é produzida de forma mais abundante que a forma selvagem, esta ligação inativa a atividade residual do alelo selvagem. Assim, não há necessidade de um segundo evento, ou segunda mutação, para inativar a sua função. Este fenômeno é denominado efeito dominante-negativo. (Srivastava et al. 1993) Existem ainda evidências de que os mutantes de p53 possam comportar-se como proteínas oncogênicas independentes. No entanto, o mecanismo de ganho de função ainda é pouco conhecido (Petitjean et al. 2007a)(Anexo 4).

1.7.9 R337H: mutação específica da população brasileira

O gene *TP53* apresenta alta penetrância e expressividade variada. Em estudo realizado recentemente foi possível determinar o padrão e prevalência de mutações germinativa no gene *TP53* e o perfil tumoral de 45 famílias brasileiras que

preenchem os critérios diagnósticos da LFS/LFL (Achatz et al. 2006). A alta prevalência da mesma mutação germinativa específica na região de *TP53* que codifica o domínio de oligomerização (no éxon 10) com a troca de uma arginina por uma histidina (R337H – CGC para CAC no códon 337) foi verificada nesta população. Esta mutação havia sido descrita em 1998 em apenas uma família na França e ocorre em uma região do gene em que poucas mutações germinativas foram descritas (IARC *TP53* Database R10) (Bougeard et al. 2001; Olivier et al., 2002). Sete famílias brasileiras nas quais a mutação R337H foi detectada estão atualmente em acompanhamento clínico, visando o rastreamento precoce de lesões possivelmente relacionadas à síndrome (NCCN 2008). Outras seis famílias brasileiras foram identificadas como portadoras de mutações germinativas no gene *TP53*, todas ocorridas no domínio de ligação ao DNA.

A apresentação clínica nas famílias brasileiras LFS/LFL demonstrou variações no espectro tumoral e na idade de acometimento dos tumores. No estudo brasileiro, verificou-se a ocorrência de tumores de papila duodenal, ou Ampola de Vater, em dois pacientes índices portadores de mutações típicas da síndrome. Este tumor nunca havia sido descrito como parte do espectro da LFS. A ocorrência de dois casos de câncer de tireóide e quatro casos de câncer renal em indivíduos pertencentes a famílias com a mutação também foi verificada. Estes tumores somente haviam sido descritos em portadores no relato inicial de Li e Fraumeni em 1969. A ocorrência de um espectro diferenciado nas famílias brasileiras pode ocorrer devido a fatores modificadores, genéticos e/ou ambientais, que podem alterar a manifestação da síndrome. A razão pela qual a mutação germinativa R337H ocorre em alta

freqüência na população brasileira ainda é desconhecida, mas foi indício da presença de efeito fundador comum a estas famílias.

Em 2001, Ribeiro et al. detectaram a troca de uma arginina por uma histidina no códon 337 do éxon 10 do *TP53* em 35 crianças com ADR, provenientes de 25 famílias da região da periferia de Curitiba, no Brasil. Os autores relataram não haver história familiar documentada de outros tumores e referiram não haver a existência de efeito fundador. A partir destes resultados, os autores propuseram que esta era uma mutação tumor-específica.

Para a determinação da existência de efeito fundador comum a todos os portadores desta alteração, ou seja, que todos têm o mesmo ancestral em comum, o mesmo grupo de pesquisadores realizou a análise de *loci* polimórficos no braço curto do cromossomo 17. No entanto, esta análise foi limitada, sendo incluído apenas dois *loci* intragênico. A partir dos resultados obtidos, os autores propuseram que a ocorrência freqüente desta mutação no estado do Paraná não estava associada a efeito fundador e podia ser considerada uma mutação tumor específica.

Em um estudo realizado no estado de São Paulo, Latronico et al. (2001) verificaram a presença da mutação R337H em 77,8% das crianças (14/18) e em 13,5% (5/37) dos adultos que apresentavam ADR esporádicos, na ausência de história familiar significativa de câncer. O mesmo grupo (Pinto et al. 2004) verificou a provável presença de um ancestral comum a estas famílias a partir da análise de dois marcadores polimórficos intragênicos em 16 crianças e 6 adultos que apresentaram ADR e que eram portadores da mutação germinativa R337H no gene *TP53*. Os pesquisadores verificaram fortes evidências de que havia segregação entre os marcadores polimórficos e a mutação germinativa R337H, indicando que esta

mutação de originou de um único ancestral e sugerindo a existência de efeito fundador no grupo estudado ao contrário do citado no estudo realizado em Curitiba por Ribeiro et al. (2001).

Estudos subseqüentes realizados pelo grupo de Curitiba reavaliaram a ocorrência de outros tipos de tumores ocorridos nos membros das famílias, que inicialmente tinham sido recrutadas a partir da ocorrência de ADR em crianças. A ocorrência de diversos tumores foi verificada em membros das famílias, no entanto a hipótese da mutação R337H predispor apenas a tumores ADR foi mantida pelos autores (Figueredo et al. 2006). A avaliação de trios (criança portadora, mãe e pai assintomáticos) e em alguns casos também de seus avôs e avós foi realizada. Em todos os casos, foi confirmada a existência da mutação em pelo menos um dos pais e avôs. Assim, confirmou-se de que dentre todas as crianças portadoras, não havia nenhum caso de mutação *de novo* neste códon, ou seja, que tivesse ocorrido pela primeira vez na família.

Recentemente, o grupo liderado por Figueiredo iniciou um estudo populacional visando a avaliação da ocorrência do mutante R337H em todos os recém nascidos (RN) do estado de Curitiba. Dados referentes ao primeiro ano do estudo foram publicados na forma de dissertação por Piovezan em 2006, indicando que a mutação foi identificada em 64 RNs (64/30098), gerando uma prevalência média de 2,12/1000. A prevalência foi estimada com maior precisão em sete regionais de saúde do estado de Curitiba (1,52 a 3,9/1000).

1.7.10 Propriedades bioquímicas e biológicas do R337H

A ocorrência de um fenótipo único relacionando a mutação R337H ao ADR descrita por Ribeiro et al. (2001) levou investigadores norte americanos à análise *in vitro* da proteína mutante R337H em busca de características bioquímicas e biológicas que explicariam o efeito tumor específico.

Inicialmente, é importante ressaltar que a mutação ocorre em um domínio estrutural bem definido, composto por uma alfa-hélice que é determinante na oligomerização da proteína. A p53 liga-se ao DNA na forma de tetrâmero; cada tetrâmero é formado por um dímero de dímeros, nos quais as proteínas se ligam entre si com alta afinidade (McClure e Lee 1998). O contato das alfa-hélices de dois monômeros adjacentes é fundamental para manter a estabilidade do oligômero e, por consequência, para a alta afinidade na ligação de p53 a elementos de resposta e indução da supressão tumoral a partir da regulação transcricional. O resíduo R337 é responsável por um destes contatos (Figura 7). O radical NH₂ da cadeia lateral da arginina doa um próton ao resíduo D352 da hélice alfa de um monômero de p53 adjacente, formando uma ponte de hidrogênio estável (Figura 7A). A troca de uma arginina por uma histidina não altera este contato, pois esta também contém radicais NH₂ livres. Assim, a histidina permanece capaz de doar um átomo de hidrogênio a D352 em condições fisiológicas (Figura 7B). No entanto, a histidina tem um pK_a inferior à arginina e, em condições de pH aumentado (pH8,3), ocorre sua desprotonação e assim torna-se indisponível para a formação de uma ponte de hidrogênio. Como consequência, o oligômero tende a se desfazer, neutralizando a capacidade da proteína ligar-se ao DNA (Di Giammarino et al. 2002). Os

pesquisadores utilizaram proteínas recombinantes correspondentes ao domínio de oligomerização e analisaram o efeito do pH sobre esta ligação *in vitro*. Estudos com proteínas transfectadas em linhagens celulares demonstraram que a proteína era inativada no caso de aumento de pH (Figura 7C).

FONTE: Adaptado de Di Giammarino et al. (2002) Hainaut (2002).

Figura 7. Mutação R337H no gene *TP53*.

7A. Resíduo R337- radical NH₂ da cadeia lateral da arginina.

7B. Troca de uma arginina por uma histidina no resíduo R337.

7C. Troca de uma arginina por uma histidina no resíduo R337 com alteração de pH.

Logo, o R337H é um exemplo único de um mutante que é dependente de características bioquímicas, sendo inativado frente ao aumento de pH. Esta observação serviu de base para a hipótese do efeito tecido específico do mutante R337H. Sua atividade pode ser interrompida em um determinado tecido dependendo de alterações bioquímicas locais, e logo, predispondo a tumores exclusivamente em

sítios nos quais este efeito possa ocorrer. Sabe-se que pequenas alterações de pH intracelular ocorrem durante a apoptose. A ocorrência de apoptose ocorre na glândula adrenal como forma de eliminação das células devido à intensa remodelação estrutural ocorrida no último trimestre da vida fetal. DiGiammarino et al. (2002) postularam que o leve aumento no pH em células apoptóticas pode inativar o R337H, levando em conta que a apoptose é fundamental no remodelamento da glândula adrenal, o grupo propôs que células que contivessem R337H sobreviveriam a este processo, gerando um *pool*, ou grupo, de células com vantagens proliferativas e tendência a transformação maligna.

No entanto, esta hipótese apresenta algumas divergências. Primeiro não fica claro o porquê de este evento ocorrer exclusivamente em células adrenocorticais e não ocorrer, por exemplo, no timo, glândula que sofre intensa remodelação perinatal. Em segundo lugar, não existe comprovação de que a p53 tenha um papel no remodelamento apoptótico da glândula adrenal. Em camundongos *TP53*-deficientes, ou nulos, sabe-se que a morfogênese da glândula adrenal permanece intacta (Donehower et al.2005). Mais um fator deve ser levado em conta: devido à ausência da apoptose, esperar-se-ia que a glândula adrenal de portadores de R337H fosse maior em tamanho, porém isto nunca foi demonstrado em humanos nem em modelos animais.

1.8 Características do padrão de mutações em famílias brasileiras LFS/LFL

No trabalho desenvolvido por Ribeiro et al. um dos elementos principais não foi avaliado corretamente: o padrão de mutações em famílias brasileiras. Em 2007,

nós descrevemos a primeira caracterização sistemática das famílias brasileiras com diagnóstico molecular da síndrome de LFS/LFL (Achatz et al. 2007).

Mutações germinativas no gene *TP53* foram detectadas em 13 das 45 famílias avaliadas pelo método de seqüenciamento de toda a região codificadora do gene *TP53*. Foram detectadas seis mutações R337H, três mutações germinativas previamente descritas (duas G245S e uma R213Q) e três mutações germinativas novas (V173M, V197M e G244D). R337H se localiza no domínio de oligomerização de p53, enquanto outras mutações se localizam predominantemente em domínios de ligação de DNA (Achatz et al. 2007). Foi demonstrado em experimentos de transativação de levedura que todas essas mutações representam perda de função (Kato et al. 2003). É de grande interesse notar que entre as 45 famílias brasileiras com o diagnóstico clínico da síndrome LFS/LFL inicialmente avaliadas, 32 não tiveram mutações no gene *TP53* detectadas pelo seqüenciamento de todas as regiões codificantes (éxons 2-11 e junções de *splicing*), sendo classificadas como portadoras de seqüências codificantes do gene *TP53 wild-type*. Das 11 famílias que preenchem os critérios para LFS/LFL, apenas uma apresentava uma mutação germinativa, enquanto que o esperado seria que aproximadamente 82% das famílias apresentassem a alteração no *TP53* reconhecida (Olivier et al. 2002).

Estas observações sugerem que a população brasileira portadora da LFS/LFL apresenta um padrão distinto de mutações em relação ao observado nas populações da Europa e da América do Norte, com a predominância de mutação R337H entre as famílias LFS. Deve-se ressaltar que tanto nas populações européias, norte-americanas como na brasileira há predominância de mutações troca de sentido.

Todas as mutações descritas até o momento estão depositadas no banco de dados de mutações em *TP53* (IARC *TP53* database, R12) (Petitjean et al. 2007b).

Frente a estas observações, é importante a realização de estudos que possibilitem a avaliação dos fatores genéticos envolvidos na modulação e penetrância de mutações germinativas no gene *TP53*. Este grupo de famílias brasileiras LFS/LFL representou 6 % de todas as famílias com detecção de mutações no gene *TP53* e 15% de todas as famílias já descritas na literatura como portadoras da síndrome. A presença de uma mutação de baixa penetrância, R337H, e sua existência na população brasileira em alta prevalência pode possibilitar a identificação de importantes modificadores genéticos.

1.9 Modificadores genéticos de mutações no gene *TP53*: *MDM2* e polimorfismos intragênicos do gene *TP53*

1.9.1 *MDM2*: efeito modificador a partir do principal regulador de *TP53*

O gene *MDM2* codifica a principal proteína (*mdm2*) envolvida na regulação da estabilidade e atividade da p53. Acredita-se que a ação de *MDM2* atenua a via de supressão tumoral de p53 e acelere a formação de tumores em idade precoce em portadores de mutações germinativas no gene *TP53* (Bond et al. 2004). Ele se liga ao fator de transcrição Sp1 e leva ao aumento da ativação transcricional do *MDM2* (Arva et al. 2005). Desta forma, a indução de níveis aumentados da proteína *mdm2* desestabiliza a proteína p53 e reduz sua capacidade de suprimir o crescimento celular.

A presença do polimorfismo 309 T-G na região promotora do gene *MDM2* foi descrita como um dos principais fatores de modificação de risco em mutações

germinativas no gene *TP53* (Adesina et al. 1994; Bougeard et al. 2006; Menin et al. 2006; Zawlik et al. 2008). A presença do alelo G deste polimorfismo foi associada à ocorrência de câncer de cólon esporádico e de tumores em idade mais precoce nos portadores de mutações germinativas no gene *TP53* (Carvajal et al. 2005; Alouzi et al. 2007).

Diversos fatores modificadores da penetrância de mutações no gene *TP53* foram descritos. Tanto mutações somáticas e germinativas em genes distintos como polimorfismos podem ser importantes reguladores da via da p53. Devido ao grande número de genes envolvidos na regulação de atividades da p53, há um amplo espectro de polimorfismos e mutações ocorridos nestes genes que podem estar envolvidos na penetrância gene *TP53* mutado, levando a diferenças individuais que podem dar origem aos diferentes fenótipos tumorais observados na síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes

1.9.2 Polimorfismos intragênicos no gene *TP53*

O gene *TP53* é um gene altamente polimórfico. Além dos 36 polimorfismos descritos no IARC *TP53* database, mais de 100 SNPs foram identificados no gene *TP53* e descritos em bancos de dados do genoma humano. Muitos destes polimorfismos são comuns à população geral. Três polimorfismos são de grande interesse, sendo dois deles intrônicos e um exônico. No íntron 2, na localização 11827 (rs1642785), ocorre um polimorfismo que consiste na troca de G por C (PIN2). No íntron 3, (rs17878362) ocorre um polimorfismo que consiste na duplicação de 16 pares de base ricas em CG (PIN3) (Petijean et al. 2007a) (Anexo 4). O polimorfismo

exônico mais estudado no gene *TP53* consiste na troca de uma arginina por uma prolina no códon 72 do éxon 4 (PEX4, rs1042522) (Pleasant e Hansen 1994; Lazar et al. 1993; Beckman et al. 1994; Petijean et al. 2007a). O polimorfismo ocorrido no resíduo Arg72 é um polimorfismo não silencioso e resulta na troca de uma arginina por uma histidina no domínio juncional rico em prolina, que liga o domínio de transativação N-terminal da proteína ao domínio de ligação ao DNA (rs1042522). O polimorfismo R72P foi alvo de diversos estudos na literatura e demonstra estar associado à ocorrência de diversos tumores esporádicos, assim como ao decréscimo de algumas das atividades de p53 *in vitro* (Sul et al. 2005; Bergamaschi et al. 2003; Xu et al. 2005). O alelo R é mais comum na população ocidental com frequências alélicas variando de 0,6 e 0,8. A prevalência do alelo P tem predominância nas populações indígenas do hemisfério sul e em populações que tem a sua origem no Equador (NCBI SNPs database, 2008). Existem atualmente diversas evidências de que este polimorfismo tenha um impacto funcional e de que possa estar envolvido na susceptibilidade para o desenvolvimento de tumores, agindo como um modificador de risco.

Em estudos experimentais recentes realizados por Virginie Marcel, no Laboratório de Oncogênese Molecular do IARC, sob a orientação do Dr. Pierre Hainaut, demonstrou-se que a ocorrência do polimorfismo PIN3 altera a estrutura *G-quartet* (ou G-quadruplex) que regula o processamento do mRNA de p53, alterando as taxas de síntese de diferentes isoformas da proteína p53 (Marcel et al. 2008, manuscrito em preparação) (Anexo 9). Recentemente, a busca pela interação da duplicação de 16 pares de base no íntron 3 (PIN3) foi investigada em câncer de mama esporádico e familiar e verificou-se que a presença da duplicação associada ao

polimorfismo do códon 72 é um fator preditivo na suscetibilidade ao câncer de mama (Costa et al. 2008). Frente a estas informações, pode-se sugerir que o impacto de uma mutação germinativa no gene *TP53* pode ser diferente de acordo com o haplótipo presente, assim como a partir do haplótipo verificado no alelo selvagem.

Até o momento, estudos realizados nas regiões sudeste e sul do país demonstram o alto número de famílias apresentando tumores característicos da síndrome e que preenchem os critérios clássicos e mais abrangentes da LFS/LFL. Esta situação sugere a presença de alelos que podem conferir a modificação do risco, levando ao aumento do risco dos pacientes e de suas famílias frente a combinações de haplótipos específicos. Estes efeitos podem agir de forma sinérgica na presença de certos alelos mutantes de *TP53* alelos, como o R337H, podendo estar relacionados à ocorrência de efeito fundador nestas regiões. A identificação destes fatores poderá levar a definição do padrão de risco e possibilitar o estabelecimento de protocolos de acompanhamento específicos para a o genótipo encontrado e AG nos membros destas famílias.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O objetivo principal deste projeto é descrever os padrões de herança de famílias brasileiras portadoras de LFS/LFL e identificar os mecanismos genéticos responsáveis pela alta prevalência da síndrome em famílias provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil. Para tanto, avaliamos 91 famílias brasileiras portadoras da síndrome e analisamos os haplótipos dos polimorfismos de *TP53* (PIN2, PIN3 e PEX4) e *MDM2* (309T-G) em indivíduos portadores da síndrome e em seus familiares, atendidos no Departamento de Oncogenética do HACC, São Paulo e no Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPOA).

2.2 Objetivos específicos

- 1 Avaliação do impacto dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 do gene *TP53* e do SNP309 do gene *MDM2* no padrão e idade de acometimento dos tumores detectados nestas famílias.
- 2 Avaliação da presença de efeito fundador entre as famílias portadoras da mutação R337H a partir da determinação do haplótipo do alelo portador da mutação.
- 3 Determinação da prevalência, origem e disseminação do R337H no Brasil.

- 4 Proposta de estratégias de identificação, informação, manejo clínico e de acompanhamento de famílias brasileiras portadoras da mutação R337H no gene *TP53*.

3 PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Seleção de famílias e pacientes

3.1.1 Recrutamento da série 1 LFS/LFL

Inicialmente 45 pacientes índice não relacionados foram incluídos, todos com o diagnóstico clínico de LFS/LFL pelos diferentes critérios da síndrome clássica (LFS) (LI et al. 1988) ou variante, de Birch et al. (1994) e de Eeles (1995) (LFL-Birch ou LFL-Eeles). Estes pacientes foram submetidos ao rastreamento prévio da mutação no gene *TP53*, em projeto aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antonio Prudente, em 30.09.2003, sob o número 531/03 (Anexo 1). Os pacientes foram atendidos entre os anos de 1999 e 2004 no Departamento de Oncogenética do HACC, São Paulo, no Serviço de Genética Médica do HCPOA, e na Divisão de Genética Médica do INCA, Rio de Janeiro. Realizamos a detecção da mutação germinativa no gene *TP53* no Grupo de Carcinogênese Molecular (Molecular Carcinogenesis Cluster – MOC), IARC, Lyon, França, sob a orientação do Dr. Pierre Hainaut, diretor do laboratório.

Todos os 45 pacientes-índice envolvidos no projeto de mestrado, referidos aqui como Série LFS/LFL-1, foram incluídos neste estudo após a reconvocação dos pacientes e a assinatura do TCLE (Anexo 2). As amostras foram avaliadas para o polimorfismo no gene *MDM2*.

Os familiares provenientes destas famílias que quiseram participar foram incluídos após a assinatura do TCLE. Cento e dois familiares foram avaliados para os polimorfismos do gene *TP53* (PIN2, PIN3 e PIN4) e *MDM2* (SNP309). Todos os familiares nos quais havia sido detectada mutação no gene *TP53* no paciente-índice foram avaliadas para a presença da mutação pontual. Dentre os familiares avaliados, 57 eram provenientes da mesma família portadora da mutação R337H (família Y12).

3.1.2 Recrutamento da série 2 LFS/LFL

Vinte famílias que receberam diagnóstico clínico da LFS/LFL, provenientes do sudeste do Brasil (dos estados de São Paulo e Minas Gerais) e recrutadas no Departamento de Oncogenética do HACC no período de março de 2005 a janeiro de 2007, foram incluídas (Série 2 LFS/LFL). Vinte e seis novas famílias com diagnóstico clínico de LFL provenientes do Serviço de Genética Médica do HCPOA no mesmo período foram incluídas. Três familiares optaram por participar, totalizando 29 pacientes incluídos (Serie 2 POA LFS/LFL). Todos assinaram o TCLE e foram analisados para mutações germinativas e polimorfismos no gene *TP53*, além do polimorfismo SNP309 do gene *MDM2*.

Um total de 91 pacientes-índice foram incluídos neste estudo e de 119 familiares em risco, finalizando uma amostra de 210 pacientes (Quadro 5). Todos foram avaliados clinicamente e receberam aconselhamento pré-teste antes de ser realizada a coleta de sangue para a realização do teste genético. Todos os indivíduos que demonstraram voluntariedade em participar do estudo assinaram o TCLE e uma cópia foi entregue a cada participante do estudo. O aconselhamento genético foi

realizado pelas equipes de aconselhamento genético dos Departamentos de Oncogenética nos quais os pacientes foram recrutados (Hospital do Câncer A. C. Camargo e Hospital de Clínicas de Porto Alegre). Todos os supervisores do procedimento de aconselhamento genético eram médicos geneticistas clínicos devidamente treinados especificamente em oncogenética e diretamente envolvidos neste projeto. O teste preditivo não foi oferecido para menores de 18 anos.

Quadro 5. Pacientes com diagnóstico de LFS/LFL incluídos no projeto

Série (ano ao diagnóstico)	Pacientes	Familiares em risco	Total
Série 1 LFS/LFL (1999 a 2004)	45	116	151
Série 2 LFS/LFL (2005 a 2007)	20	-	20
Série 2 LFL/POA	26	3	29
Total	91	119	210

Os heredogramas das famílias avaliadas foram atualizados na ficha clínica de cada paciente e registrados eletronicamente com o auxílio do programa *Progeny Lab7* (Progeny Genetics).

Uma amostra de 300 controles provenientes de Porto Alegre foi incluída. A amostra era composta por mulheres não selecionadas para história familiar de câncer, provenientes de um estudo populacional conduzido na região, o Núcleo Mama Porto Alegre (NMPA).

3.2 Extração de DNA

Amostras de 20 mL de sangue periférico foram coletadas de maneira convencional em tubos contendo EDTA e estocadas a 4°C. A separação dos

linfócitos ocorreu em um período inferior a cinco dias após a coleta e foi realizada conforme o método descrito por English e Andersen (1974). O sangue foi transferido para tubos Falcon de 50mL. O DNA foi extraído conforme o método de fenol-cloroformio/álcool isoamílico (Miller et al. 1988). De acordo com o protocolo, as amostras foram centrifugadas (10 minutos a 2.000 rpm, temperatura ambiente) e o halo linfocitário ou *buffy coat* foi aspirado (com pipeta Pasteur) e transferidas para um tubo Falcon de 15 mL. Foi realizada lavagem com 10 mL de PBS 1X seguida de centrifugação (15 minutos a 2.000 rpm) e descarte do sobrenadante. Dois *pellets* de linfócitos foram separados e um deles foi ressuspendido em 1,5 mL de PBS 1X, e estocado a -70°C.

O outro pellet foi centrifugado em tubo Falcon de 15 mL por 15 minutos a 2.000 rpm. Ao pellet, foi acrescido 2 mL de tampão TES (Tris HCl pH 8.0 10 mM, EDTA 50 mM, SDS 0,5%) e 20 µl de Proteinase K (20 mg/mL; Concentração final = 200 µg/mL). A amostra foi incubada a 55°C por 12 horas e, no caso de digestão incompleta, foram acrescentados 5 a 10 µl de Proteinase K e novamente incubado a 55°C por mais algumas horas até a digestão total. Foram adicionados 2 mL de fenol equilibrado (pH 8.0), seguidos de agitação durante 5 minutos (agitador mecânico). Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 3000 rpm, a 4°C. O sobrenadante foi separado (utilizando pipeta Pasteur estéril de plástico) e colocado em tubo plástico contendo 2 mL de clorofórmio-álcool isoamílico. Os tubos contendo as amostras foram agitados por 5 minutos e centrifugados por mais 15 minutos a 3000 rpm. Neste momento foi repetida a extração por clorofórmio-álcool isoamílico e coletado o sobrenadante para um tubo corex estéril. Foi adicionado 1/10 volume de acetato de sódio 3M e acrescentado 2,5X (do volume da amostra) de

etanol absoluto gelado. Os tubos foram vedados com (Parafilm®) e incubados por 1 hora a -70°C . Ao término, as amostras foram balanceadas com etanol absoluto e centrifugadas por 30 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado. As amostras foram lavadas com etanol 70% e centrifugadas durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* seco naturalmente. O DNA extraído foi eluído e ressuspensionado em uma solução de TE 1X, para um volume final de 300 μL e incubadas a 65°C durante 30 minutos para desativar DNAses.

Após a extração, as amostras de DNA foram quantificadas (*Nanodrop* – *Thermo Scientific*) e armazenadas a 4°C . No caso das amostras provenientes de outros estados do Brasil, o DNA foi extraído no centro de origem. As amostras levaram um período máximo de sete dias entre o envio e o seu recebimento e, quando recebidas foram imediatamente armazenadas a -20°C .

3.3 Identificação das mutações no gene *TP53*

Todos os 46 novos pacientes índice incluídos foram rastreados para a identificação de mutações germinativas no gene *TP53*. As etapas de identificação das mutações e comparação com o banco de dados de mutações em *TP53* foram realizadas na Unidade de Carcinogênese Molecular do IARC, em Lyon, França. As amostras de DNA foram amplificadas por PCR (*Polimerase Chain Reaction*) e os éxons codificantes 2 a 11 do gene *TP53* foram analisados. Os éxons foram amplificados a partir da utilização de oligonucleotídeos intrônicos específicos (Quadro 6), a partir de 50 ng de DNA genômico, na presença da enzima *Taq Platinum DNA polymerase* (*Invitrogen*). As condições da reação de PCR foram: 1,5

mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs; 1,2 µM de cada oligonucleotídeo; 1,25 U de *Taq Platinum DNA polymerase (Invitrogen)*; 2,5 µL de tampão de reação para *Taq Platinum* 10X (concentração final 1X) e água em quantidade suficiente para 25µL.

Quadro 6 - Sequência de oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para DHPLC e seqüenciamento.

	Oligonucleotídeo direto	Oligonucleotídeo reverso	Fragmento (pb)
Éxon 2-3	p558: 5'-ccaggtgacccagggttga-3'	p228:5'-agcatcaaatcatccattgc-3'	428
Éxon 4	p326:5'-tgaggacctggtcctctgac-3'	p327:5'-agaggaatcccaaagttcca-3'	412
Éxon 5-6	P236:5'-tgttcaactgtgcccctgact-3'	p256:5'-cggagggccactgacaacca-3'	488
Éxon 7	p333:5'-cttgccacagggtctcccaa-3'	p313:5'-aggggtcagcggcaagcaga-3'	237
Éxon 8-9	p314:5'-ttgggagtagatggagcct-3'	p315:5'-acttgataagaggtccaag-3'	372
Éxon 10	p10li:5'-caattgtaactgaaccatc-3'	p563:5'-cttccaacctaggaaggca-3'	191
Éxon 11	p564:5'-atctctcctccctgcttctg-3'	pE11Ri:5'-aggctgtcagtggggaacaa-3'	145

Para todos os éxons a reação de amplificação foi realizada utilizando-se a estratégia de diminuição gradativa de temperatura, ou *touchdown*, iniciada a partir de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida por 21 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 63°C por 45 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Nesta etapa, a temperatura de anelamento foi reduzida em 0,5°C a cada 3 ciclos. Após esses 21 ciclos, seguiram-se 30 ciclos adicionais de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, anelamento a 60°C por 45 segundos e uma etapa final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Para o rastreamento de alterações na seqüência de DNA, os produtos de PCR contendo as regiões codificantes compreendidas entre os éxons 4 e 9 foram analisadas por um sistema de cromatografia líquida de desnaturação de alta performance (*Denaturing High Performance Liquid Chromatography* - DHPLC)

como descrito por Le Calvez et al. (2005). Em cada análise de DHPLC foi usado como controle o DNA de linhagens celulares tumorais (controles positivos) (Quadro 7) e o DNA de linfócitos de indivíduos sem câncer (controles negativos).

Quadro 7. Descrição de linhagens celulares com diferentes mutações no gene *TP53* usadas como controles positivos no DHPLC.

Linhagem celular	Origem	Éxon mutado	Códon	Nucleotídeo	Troca de aa
Hs578T	Câncer de mama	5	157	<u>G</u> TC- <u>T</u> TC	Val→Phe
T47D	Câncer de mama	6	194	<u>C</u> TT- <u>T</u> TT	Leu→Phe
TE11	Câncer de esôfago	7	237	AT <u>G</u> -AT <u>I</u>	Met→Ile
TE6	Câncer de esôfago	7	248	<u>C</u> GG- <u>C</u> AG	Arg→Gln
TE1	Câncer de esôfago	8	272	<u>G</u> TG- <u>A</u> TG	Val→Met
MDA-MB-231	Câncer de mama	8	280	<u>A</u> GA- <u>A</u> AA	Arg→Lys

Os fragmentos que apresentaram suspeita de alteração na análise por DHPLC foram re-extraídos, submetidos à nova reação de PCR e analisados por seqüenciamento automatizado em ambas as direções, direta e reversa. A reação de amplificação para o seqüenciamento foi realizada utilizando-se 5 pmol de oligonucleotídeo direto ou reverso para cada éxon e o kit *BigDye 1.1* (*Applied Biosystems*) conforme especificações do fabricante. O kit utilizado baseia-se no uso da metodologia do seqüenciamento com dideoxinucleotídeos marcados com fluorescência, acoplado a PCR com apenas um oligonucleotídeo. O produto desta reação foi analisado no aparelho de seqüenciamento automático *ABI Prism 3100* (*Applied Biosystems*). As seqüências obtidas foram analisadas mediante comparação com a seqüência normal do gene descrita no *GenBank* sob o número [EF101869](#).

A reação de seqüenciamento iniciou-se com etapa de desnaturação inicial a 95°C por 1 minuto, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 18 segundos, anelamento a uma temperatura de 58°C por 12 segundos e extensão a 60°C por 4

minutos. É realizada então a precipitação na qual se adiciona 40 µL de isopropanol 65% às amostras, sendo a mistura mantida por 15 minutos a temperatura ambiente, sem o contato com a luz. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm e o sobrenadante foi descartado. Adicionou-se 190µL de etanol 70% às amostras, que foram novamente misturadas e centrifugadas por 20 minutos a 13.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e as amostras foram secas em estufa a 50°C.

Os éxons 2, 3, 10 e 11 foram analisados por seqüenciamento direto, por não estarem disponíveis controles positivos (com alterações nestas regiões) para a comparação na análise por DHPLC. Todas as mutações encontradas foram confirmadas por uma nova reação de seqüenciamento.

3.4 Identificação de rearrajos no gene *TP53* pelo método de MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification)

A análise de rearranjos gênicos (deleções e duplicações) no gene *TP53* foi realizada em 13 pacientes da Série 1, nos quais mutações germinativas não haviam sido detectadas nos éxons 2-11. A técnica foi feita a partir da utilização do kit *SALSA MLPA® kit P056 TP53 DNA Detection/ Quantification (MRC-Holland)*. A primeira etapa consiste na desnaturação e hibridização da sonda *SALSA MLPA*. Foram utilizados 100 ng de DNA em TE para 5 µl. Foi aquecido por 5 minutos a 98°C e em seguida resfriado a 25°C antes de ser aberto o termociclador. Foram adicionados 1,5 µl de sonda *SALSA* e 1,5 µl de tampão *MLPA* em cada tubo e misturado com cuidado. A segunda etapa consiste na reação de ligação.

Com o termociclador a 54°C, foram adicionados 32 µl de mix Ligase-65 a cada amostra (mix Ligase-65: 3 µl de tampão A de Ligase-65 + 3 µl de tampão B de Ligase-65 + 25 µl de água, seguido da adição de 1µl de Ligase-65). A terceira etapa consiste na reação de PCR, a qual foi realizada em novos tubos, utilizando mix composto por 4µl de tampão SALSA PCR + 26 µl de água e 10 µl da reação de ligação (descrita acima). Na temperatura de 60°C, foi adicionado 10 µl do mix da polimerase (2 µl de SALSA PCR-oligonucleotídeos + 2 µl de tampão de diluição da enzima SALSA + 5,5 µl de água. Por fim, foi adicionado 0,5 µl de SALSA polimerase).

As condições de PCR incluíram 35 ciclos: 30 segundos a 95°C, 60 segundos a 72°C e uma etapa final de 20 minutos de incubação a 72°C. Após a reação de PCR, foi realizada a separação por eletroforese dos produtos amplificados e os fragmentos foram analisados no seqüenciador *ABI-Prism 3700 DNA Analyser* (Applied Biosystems, Torrence, CA, USA). Os fragmentos foram analisados pelo *Genescan software* (Applied Biosystems, Torrence, CA, USA).

3.5 Identificação dos haplótipos dos polimorfismos PIN2, PIN3 E PEX 4 no gene *TP53*

A análise dos polimorfismos de *TP53* PIN2, PIN3 e PEX4 nos 119 familiares incluídos neste estudo e que não foram submetidos ao seqüenciamento da região codificante do gene *TP53* foram realizadas pelo método de ARMs PCR (*Amplification Refractory Mutation Screening PCR*). A seqüência de interesse compreendida entre o polimorfismo localizado no íntron 2 (11827, rs1642785) e o

Quadro 9. Oligonucleotídeos para os polimorfismos PIN2 e PEX4.

F1: 5' aagggcagggccaccaccccg 3' → PIN2 = G
F2: 5' aagggcagggccaccacccc 3' → PIN2 = C
R1: 5' tgctggtgcaggggccacgg 3' → PEX4 = C (P)
R2: 5' tgctggtgcaggggccacgc 3' → PEX4 = G (A)

Para a reação do ARMS-PCR foram realizadas quatro reações simultâneas com as diferentes combinações de oligonucleotídeos (F1 + R1; F1 + R2; F2 + R1 e F2+ R2) para definir o status de PIN2 e PEX4. Apenas as reações nas quais ocorre o anelamento com o oligonucleotídeo correspondente irão amplificar e duas bandas serão visualizadas no gel. As condições utilizadas para a amplificação encontram-se descritas no quadro 10. Os produtos da reação de PCR foram analisados em um gel de agarose 3% (Figura 8), possibilitando a visualização da presença (ou não) da duplicação de 16 pares de bases no PIN3 pela diferença no padrão de migração ou diferença do tamanho da banda.

Figura 8. ARMs PCR para determinação dos haplótipos PIN2, PEX3 e PEX4.

Quadro 10. Condições e reagentes empregados na ARMs PCR para determinação dos haplótipos dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4.

Reagentes	Quantidade n=1	351pb
DNA	19,1	
H ₂ O	2,5	114,6
Tampão 10X	0,4	15
MgCL ₂ (50mM)	0,5	2,4
dNTP (B1)	0,5	3
Oligonucleotídeo F1 ou F2 (10µM)	0,5	3
Oligonucleotídeo R1 ou R2 (10µM)	0,5	3
Taq <i>Platinum DNA polymerase</i>	0,5	3
Volume final	25	24µl
Reação: 94°C 2' - 94°C 30''; 72°C 1'30''(*35) - 72°C 5'		

3.6 Identificação do SNP309 (rs2279744) do gene *MDM2*

A técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*), ou reação em cadeia da polimerase associada à análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição de DNA foi empregada na avaliação da frequência do SNP309 no gene *MDM2*, como descrito por Alhopuro et al. em 2005, utilizando a enzima de restrição *MspA1I*. Foi utilizado um volume de reação de 50 µl com 15 pmol de *MDM2F* (5' GTCTCCGCGGGAGTTCA 3') e *MDM2R* (5' Biotin – GACTACGCGCAGCGT TCAC 3'), 0.2 mM dNTPs, 1.5 mM MgCl₂, 1X Buffer II (*Applied Biosystems*), 1U *AmpliTaq Gold* (*Applied Biosystems*) e 10 ng de DNA genômico. As condições de PCR foram 94°C por 7 min; 50 ciclos com desnaturação a 94°C por 30s, anelamento a 60°C por 30s e extensão a 72°C por 30s; seguidos de um ciclo final de 1 ciclo a 72°C por 7 min. A digestão foi realizada em um volume de 50 µl de reação usando a endonuclease de restrição *MspA1I* (*New*

England Biolabs, Beverly, MA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos da restrição foram visualizados em gel de agarose a 4% sob luz UV.

3.7 Análise estatística

Para as análises estatísticas comparamos a frequência dos 3 polimorfismos em dois diferentes grupos: casos e controles. O teste utilizado foi Qui-quadrado, que é um teste utilizado para medir o grau de discrepância entre um conjunto de frequências observadas e o conjunto de frequências esperadas, segundo uma determinada hipótese, assim é um teste que não compara os valores dos itens, mas sim a sua frequência. Nos demais testes, em que analisamos a idade média nos grupos selvagem, ou *wild type* (WT), e mutante conforme os polimorfismos presentes, assim como o número de casos de câncer conforme os diferentes polimorfismos presentes, utilizamos o *teste t não pareado*. É uma variação do teste t de Student e é utilizado para comparar grupos quando os valores individuais não estão pareados ou não são complementares. É utilizado para testar a hipótese de que a média de duas populações as quais correspondem a amostras aleatórias (não pareadas) é igual, assim o utilizamos em situações nas quais era necessário, por exemplo, a comparação das médias de idade ao diagnóstico de câncer nos diferentes grupos. Essa mesma análise foi utilizada para comparar o número de casos de câncer por paciente nos diferentes grupos formados. Todos os testes foram realizados com auxílio do *software GraphPad InStat 3*.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização clínica e molecular das famílias LFS/LFL avaliadas e seus familiares

4.1.1 Definição do perfil brasileiro das famílias LFS/LFL e

A síndrome de Li-Fraumeni é considerada como rara. Em 2004, apenas 281 famílias haviam sido diagnosticadas como portadoras de mutações germinativas no gene *TP53* e depositadas no banco de dados que contém as mutações germinativas no gene *TP53* descritas na literatura (IARC *TP53* Database R8) (Olivier et al. 2002). Dentre 45 famílias brasileiras que preenchem os critérios para LFS/LFL departamento de Oncogenética do HACC, no HCPOA e no INCA, detectamos inicialmente 13 mutações germinativas no gene *TP53*. O mutante R337H foi encontrado em 46,2% (6/13) de todas as famílias avaliadas. As famílias brasileiras portadoras de mutações em que corresponderam a 4,7% da totalidade de famílias LFS/LFL com mutações germinativas no gene *TP53* (IARC *TP53* Database R12) (Petitjean et al. 2007b).

4.1.2 Investigação aprofundada em uma das famílias portadoras da mutação R337H – recrutamento e avaliação clínica e molecular de membros de uma mesma família

Buscando uma melhor compreensão da alta ocorrência e penetrância do R337H na população brasileira, avaliamos 57 indivíduos provenientes da mesma

família Y12. O heredograma completo desta família foi realizado com base nas informações referidas pelos familiares (Figura 9). Todos foram submetidos ao AG pré-teste, assinatura do TCLE e detecção de mutação no códon 337. Foram detectados 19 indivíduos positivos e 38 negativos para R337H.

Legenda: O paciente-índice está indicado por uma seta. Amarelo: pacientes portadores do R337H. Preto: paciente afetado por tumor maligno. Primeira informação abaixo do símbolo: idade atual. Segunda informação: idade de acometimento do tumor e tipo. Última informação: resultado teste molecular R337H.

Figura 9. Transmissão de R337H e padrão de tumores nos membros da família Y12.

4.1.3 Pesquisa de mutações germinativas no gene *TP53* em novas família LFS/LFL e recrutamento de familiares para avaliação clínica e molecular

Um total de 46 novas famílias foram incluídas. Encaminhamentos provenientes de hospitais nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Rio de Janeiro levaram à inclusão de 25 novas famílias com diagnóstico clínico da LFS/LFL (Série 2 LFS/LFL) e 26 com diagnóstico da LFL pelos critérios de Eeles provenientes de Porto Alegre foram incluídas (Série 2 LFL/POA).

Cinquenta e nove familiares provenientes de famílias previamente detectadas com mutações em *TP53* (Série 1 LFS/LFL) e três familiares da Série 2 LFL/POA foram incluídos. Com isso, o número total de famílias incluídas neste estudo foi de 91 (sendo 46 novas) e o número total de familiares foi de 119, totalizando 210 indivíduos LFS/LFL.

Mutações germinativas no gene *TP53* foram detectadas em cinco pacientes-índice LFS/LFL, representando 20% (5/25) dos pacientes avaliados. Dentre os 26 pacientes-índice provenientes de Porto Alegre avaliadas, nenhum teve a mutação detectada. As mutações encontradas foram T125T (ACG>ACA), S241Y (TCC>TAC), uma mutação em sítio de *splicing* no íntron 8 IVS8+1G>A e dois novos casos de mutações no R337H(CGC > CAC). Todas as mutações encontradas são mutações patogênicas e já foram descritas previamente (IARC *TP53* database, R12) (Kato et al. 2003; Petitjean et al. 2007) (Tabela 1).

Tabela 1. Perfil de mutações em famílias LFS/LFL brasileiras.

Mutações germinativas em TP53	Famílias (n=91) (%)	Familiares (n=119)(%)
Troca de Bases (n=18)		n (familiares testados)
T125T (ACG>ACA)	1	2 (3)
V173M (GTG>ATG)	1	2 (2)
V197M (GTG >ATG)	1	2 (5)
R213Q (CGA>CAA)	1	0 (0)
S241Y (TCC>TAC)	1	0 (0)
G244D (GGC>GAC)	1	0 (0)
G245S (GGC>AGC)	2	0 (0)
Íntron 6 IVS6+1G>T	1	0 (0)
Íntron 8 IVS8+1G>A	1	0 (0)
R337H(CGC > CAC)	8	23 (57)
Tipo de Troca (n=18)		
<i>Missense</i>	16	29
Sítio de <i>splicing</i>	2	-

4.1.4 Detecção de rearranjos pelo método de MLPA em famílias sem mutações

A técnica de MLPA foi empregada visando detectar rearranjos (deleções ou inserções) em famílias nas quais mutações germinativas não foram detectadas pela técnica de seqüenciamento. Em um momento inicial, uma amostra de 13 famílias de um grupo de 32 famílias (Série 1 L S/LFL) nas quais não foram detectadas alterações na seqüência pelo método de DHPLC e seqüenciamento no projeto de mestrado foi selecionada.

A seleção foi feita com o intuito da realização de um projeto-piloto no qual uma nova técnica seria testada. Os pacientes foram selecionados com base nas características clínicas. Nesta amostra foram incluídas 10 famílias com diagnóstico clássico da LFS e três famílias nas quais o paciente-índice era portador de múltiplos

tumores primários. Duas famílias nas quais os pacientes-índice eram portadores de múltiplos tumores primários e sem história familiar típica da síndrome tiveram deleções detectadas. O paciente Y20 apresentou deleção dos éxons 5 a 11 e o paciente Y47 apresentou deleção no éxon 4 (Tabela 2).

Tabela 2. Perfil de rearranjos em famílias LFS/LFL brasileiras.

	Famílias (n=13) (%)
Deleções (n=2)	2 (2,2%)
Deleção éxon 4	1
Deleção éxon 5 a 11	1

Para confirmar tal deleção, as amostras foram enviadas ao laboratório do Dr. Thierry Frebourg, em Rouen, na França, para confirmação das deleções em *TP53* encontradas pelo método adaptado do PCR quantitativo (*quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments* - QMPSF)(Bougeard et al. 2003). As deleções foram confirmadas no paciente Y20, nos éxons 5 a 11, bem como a existência de um rearranjo no paciente Y47, que inclui o éxon 4 e parte do éxon 8. Assim, foi verificada a ocorrência de deleções em 15,4% dos pacientes LFS/LFL não portadores de mutação (2/13), o que é similar ao referido por Bougeard et al. (2003).

O paciente-índice Y20 tem diagnóstico de múltiplos tumores primários, sendo tumor de Wilms' aos 6 meses de idade, leiomiosarcoma cutâneo aos 5 anos, astrocitoma pilocítico aos 15 anos, osteosarcoma em fêmur aos 18 anos, além de 20 leiomiosarcomas cutâneos entre os 8 e 18 anos. A história familiar era caracterizada pela ocorrência de câncer de mama masculino aos 73 anos e câncer de próstata aos 77 anos no avô paterno, além de uma tia avó paterna com câncer de mama aos 60 anos.

O paciente-índice Y47 também apresentou múltiplos tumores primários, sendo linfoma aos 11 anos, SPM aos 18 anos, dois carcinomas basocelulares de pele aos 33 e 34 anos e um carcinoma gástrico difuso aos 39 anos. A história familiar do paciente incluía apenas a presença de câncer de mama na mãe aos 62 anos.

Assim, a partir deste estudo, verificou-se a presença de mutações pontuais e rearranjos no gene *TP53* em 22% (20/91) das famílias brasileiras com LFS/LFL (Tabela 3). Após a realização dos testes genéticos, o resultado foi fornecido a cada paciente em nova consulta de aconselhamento genético, na qual foi discutido o significado do resultado para o paciente e seus familiares. O manejo foi oferecido a todos os indivíduos e aos seus familiares em risco.

Tabela 3. Perfil de mutações e rearranjos encontrados em famílias brasileiras com LFS/LFL.

	Famílias (%)	Familiares (%)
Mutações ou rearranjos em <i>TP53</i>	n=91	n=119
Presente	20 (22,0%)	29 (24,4%)
Ausente	71 (78,0%)	90 (75,6%)

É importante ressaltar que apenas 13 amostras foram submetidas à busca de rearranjos pelo MLPA por se tratar de um estudo piloto. Desta forma, a técnica deverá ser empregada nas 59 outras famílias nas quais a mutação não foi detectada para verificarmos a existência de outras famílias portadoras de deleções no gene *TP53*.

4.1.5 Avaliação do padrão tumoral em famílias LFS/LFL: risco aumentado para câncer de estômago e colorretal de manifestação precoce

A reavaliação do padrão tumoral e idade de acometimento de tumores nas 45 famílias inicialmente avaliadas (Série 1 LFS/LFL) foi conduzida (Anexo 5). Em estudo conduzido por Wong et al. (2007), foi sugerido que câncer colorretal e de estômago ocorreriam em frequência aumentada e em idade precoce em portadores da síndrome. Para avaliar a frequência em nossa população, analisamos a ocorrência de câncer nas famílias LFS/LFL. Os dados foram atualizados através de entrevista estruturada e averiguada usando registros hospitalares e foram incluídos todos os casos de tumores que ocorreram nos pacientes-índice e familiares (1º a 4º grau) (n=338) (Tabela 4). No total, 158 tumores (46,7%) foram confirmados por relatórios histopatológicos, registros médicos ou certidões de óbito. A amostra inclui 119 tumores detectados em pacientes de 45 famílias LFS/LFL, nas quais o paciente-índice tinha uma mutação germinativa em *TP53* e os 219 tumores de famílias nas quais não foram detectadas mutações em *TP53*.

Em concordância com Birch et al. (2001), câncer de mama, SPM e SNC foram os três diagnósticos mais comuns. A associação mais forte com *TP53* foi observada para ADR (6,7%) e câncer renal (3,4%), diagnosticados apenas em portadores de mutações germinativas de *TP53*. Câncer de estômago (6,7%) e CCR (5,9%) foram o quarto e o sexto tipo de tumor mais frequente. Estes dados diferem do banco de dados do IARC, no qual estes tumores ocorrem em décimo e décimo primeiro tumor respectivamente.

Tabela 4. Espectro e idade média ao diagnóstico de tumores em 45 famílias brasileiras com diagnóstico clínico de LFS/LFL

Tumores	Casos com mutação germinativa em <i>TP53</i>		Casos sem mutação germinativa em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média	n (%)	Idade média
Total (338)	119 (35.2%)		219 (64.8%)	
Mama*	33 (27.7%)	43,5	39 (17.8%)	44,9
SNC*	13 (10.9%)	19	13 (5.9%)	32
SPM*	10 (8.4%)	30,1	27 (12.3%)	31,8
Gástrico*	8 (6.7%)	55,6	22 (10.0%)	51,6
Adrenocortical	8 (6.7%)	14,7	0	N/A
Colorretal*	7 (5.9%)	32,4	14 (6.4%)	51,6
Pulmão*	7 (5.9%)	55,9	8 (3.7%)	46,6
Próstata*	4 (3.4%)	64,5	12 (3,5%)	72
Renal	4 (3.4%)	20,7	0	N/A
Esofago*	3 (2,5%)	53	6 (2,7%)	68,3
Cabeça e pescoço*	3 (2,5%)	54,5	6 (2,7%)	48,8
Fígado*	3 (2,5%)	39	4 (1.8%)	60,5
Papila duodenal	2 (1.7%)	49,5	0	N/A
Tireoide	2 (1.7%)	41,5	4 (1,8%)	58
Leucemia/ Linfoma*	2 (1.7%)	45	19(8.6%)	33,2
Trato genital feminino*	2 (1.7%)	59,7	11 (3,2%)	54,2
Pele não-melanoma*	1 (0.8%)	58	10 (2,9%)	48,7
Sarcoma ósseo*	1 (0.8%)	N/A	8 (3.6%)	17,3
Melanoma	1 (0.8%)	80	6 (2,7%)	47
Pâncreas*	1 (0.8%)	58	5(2.3%)	47,5
Bexiga*	0	N/A	3 (1.4%)	54
Wilms'	0	N/A	1(0.4%)	1
Ósseo	1 (0.8%)	21	0	N/A
Mola hidatiforme	1 (0,4%)	23	0	N/A
Origem indeterminada	3 (2,5%)	53	0	N/A

Legenda: N/A: não se aplica; * a idade ao diagnóstico não pode ser detectada em 1 a 3 tumores no grupo avaliado logo não foi incluído na média. SNC: Sistema Nervoso Central; SPM: Sarcoma de Partes Moles.

Câncer de estômago e CCR foram frequentes em famílias sem mutações germinativas, correspondendo ao 3º (10%) e 4º (6,4%) de todos os diagnósticos. No total, 21 casos de CCR foram diagnosticados em 15 das 45 famílias (33,3%), incluindo 5/13 (38%) das famílias com e 10/32 (31%) das famílias sem mutações detectadas em *TP53*. A idade média de manifestação dos CCR em famílias com mutações foi precoce 32,4 anos comparado as famílias sem mutação (51,6 anos) (Valor de $p=0.011$, teste t de Student). Dois terços de todos os CCR (12/19) ocorreram entre familiares de 1º e 2º graus.

Para câncer de estômago, 25 casos foram diagnosticados em 16 das 45 famílias (35,5%), incluindo 6/13 (46,2%) das famílias com e 10/32 (31,3%) sem mutações germinativas em *TP53*. Desses tumores, a grande maioria (exceto dois) ocorreram em familiares de primeiro ou segundo grau. No entanto, em contraste com CCR, não houve diferença significativa na idade de manifestação das famílias com ou sem mutações (55,6 anos, variação 22-62 em famílias com mutação e 51,6 anos, variação 21-70 em famílias sem mutação).

4.2 Origem e disseminação da mutação germinativa R337H e alta frequência de predisposição a câncer na população do sul e sudeste do Brasil: evidência de efeito fundador

Devido à migração e seleção durante a história, o efeito do fundador é comum em humanos. Tais efeitos são rapidamente diluídos por misturas populacionais, mas podem persistir frente ao isolamento geográfico e/ou cultural. A verificação da mutação R337H, comum a 44,4% (8/18) das famílias LFS/LFL brasileiras portadoras

de mutações pontuais, levantou a hipótese de esta tratar-se de uma mutação fundadora. Para tanto, investigamos a existência de um ancestral comum a todas famílias R337H que possa ter sido o primeiro portador da mutação e a disseminado nas populações do sul e sudeste brasileiro (Anexo 6).

Para caracterizar os haplótipos de *TP53*, 29 SNPs no *locus TP53* com frequência alélica >4% foram selecionados de um total de 183 SNPs, identificados por seqüenciamento direto dos 24178 pb de DNA genômico, cobrindo o gene *TP53* inteiro (incluindo o promotor e o UTR 3') em 48 indivíduos não-aparentados e brasileiros de etnia heterogênea (Garritano et al., em preparação). A definição dos haplótipos foi realizada pela pesquisadora Sonia Garritano, sob a supervisão do Dr. Sean Tavtijejan, chefe do grupo de Susceptibilidade Genética ao Câncer (Genetic Cancer Suceptibility) da Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer - *International Agency for Research on Cancer* (IARC - WHO), Lyon, França.

Foram genotipados 12 indivíduos pertencentes a oito famílias brasileiras R337H aparentemente não-aparentadas, sendo um duo R337H composto pela mãe e filha e um trio R337H composto pela mãe, filha e filho, além de 90 caucasianos da coleção de amostras *HapMap* do repositório *Coriell* (<http://www.hapmap.org>), totalizando 206 cromossomos. A técnica de genotipagem utilizada pelos pesquisadores que colaboraram neste estudo foi o método de *High Resolution Melting* (HRM), que consiste na realização de PCR na presença do corante de ligação ao DNA (*DNA binding dye* - *LC Green®*) e identificação das amostras portadoras de uma curva aberrante que indica a variação da seqüência (Liew et al. 2004). A intensidade de fluorescência pode indicar diferenças mínimas na curva (*melting curve*) quando monitorada adequadamente utilizando o *software*

LightScanner. (Figura 10) (Ensaio realizado pela pesquisadora Sonia Garritano, nos laboratórios do Dr. Sean Tavtigean e Dr. Pierre Hainaut)

Legenda: TT em cinza, GG em vermelho e TG em azul.

Figura 10. Genotipagem do SNP RS9903378.

Esse painel denso de SNPs (composto em média, de um a cada 833 pares de base) identificou 56 haplótipos diferentes, somente 3 deles com frequência acima de 0,1. Seis outros haplótipos tinham frequências entre 0,1 e 0,015, enquanto 47 haplótipos raros tinham, em conjunto, uma frequência de 0,28 (Tabela 5). A haplotipagem de 12 portadores de R337H evidenciaram a presença do mesmo haplótipo, o haplótipo 3, em todos os indivíduos. No grupo dos caucasianos do *HapMap*, a frequência do haplótipo 3 foi 0,077.

Tabela 5. Haplótipos mais frequentes em 90 caucasianos (*HapMap DNA sample set*), 8 portadores da mutação R33H no gene *TP53* não aparentados, um trio e um duo mãe e filha.

Marcadores#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
Hap. ID																														total	Frequencia
1	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	C	C	A	63	0.31
2	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	T	T	C	A	29	0.14
3	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	C	T	A	26	0.13
4	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	C	T	C	C	T	A	C	T	A	A	G	C	C	T	A	10	0.049
5	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	C	C	C	A	8	0.039
6	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	A	C	A	A	C	C	G	C	T	G	A	A	T	T	C	A	4	0.019
7	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	T	T	C	A	3	0.015
8	C	C	A	T	T	G	A	G	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	A	G	G	C	C	C	A	3	0.015
9	G	C	A	T	T	T	A	A	A	C	G	T	G	G	G	A	C	G	C	G	C	T	G	G	G	C	T	C	A	3	0.015
+47 outros haplótipos raros																													56	0.28	

Legenda: # Lista de marcadores utilizados: rs2287499, rs17551157, rs17883353, rs17882227, rs17885845, rs9903378, rs17881035, rs11656607, rs5819163, rs2078486, rs1642782, rs12944939, rs8079544, rs1642785, rs17878362, rs17883323, rs1042522, rs1794287, rs1625895, rs12947788, rs12949655, rs1641548, rs1641549, rs6503048, rs17880560, rs1614984, rs9894946, rs17886760

Negrito: alelo mais comum; Amarelo (realce): haplótipo 3.

Para determinar a frequência na população do sul do Brasil, nós analisamos o SNP 28 (rs9894946, que detecta os haplótipos 3 e 4) e SNP 19 (rs1794287, que diferencia entre os haplótipos 3 e 4) de 95 indivíduos assintomáticos e sem história previa de neoplasias, que participavam de um programa de detecção de câncer de mama na área de Porto Alegre.(Palmero et al. 2008) Nesse grupo, o haplótipo 3 foi detectado em uma frequência de 0,088. Portanto, o aumento de representação do haplótipo 3 em portadores de R337H (100%) foi evidente. A probabilidade de que os pacientes-índice R337H das outras sete famílias brasileiras não aparentadas também sejam portadores de ao menos um haplótipo 3 seria extremamente baixo ($3,8 \times 10^{-6}$).

Somado aos resultados obtidos com a análise dos 29 TAG SNPs, há o fato de que previamente, apenas uma família havia sido descrita como portadora do R337H no banco de dados para mutações germinativas de *TP53* do IARC. Realizamos a haplotipagem do DNA do paciente descrito em 2001 por Bougeard et al. para verificação da presença do efeito fundador. A haplotipagem revelou identidade com o haplótipo 3, confirmando o mesmo ancestral comum as outras famílias R337H. A família descrita era de origem brasileira e morava na Europa.

As análises de heredogramas mostraram que R337H segrega com o haplótipo 3. O desequilíbrio de ligação entre o R337H e o SNP rs9894946 foi demonstrado através de PCR alelo-específico e seqüenciamento (Figura 11). Adicionalmente, o seqüenciamento completo do *locus TP53* em dois portadores não aparentados não mostrou nenhuma diferença. Portanto, o R337H está presente exclusivamente no haplótipo 3, reforçando a idéia do efeito do fundador.

Figura 11. PCR alelo-específico, seqüenciamento e desequilíbrio de ligação entre o R337H e o SNP rs9894946.

Para traçar a possível origem do haplótipo 3, nós genotipamos séries de africanos e asiáticos (90 amostras de cada) da coleção *HapMap*, totalizando 360 cromossomos. O haplótipo comum "1" foi observado principalmente entre caucasianos e asiáticos, mas foi raro entre africanos (apenas 3 de 180 cromossomos). O haplótipo 3 não foi detectado entre asiáticos e africanos, apenas em caucasianos. Essa observação reforça que o haplótipo 3 é um haplótipo caucasiano derivado do haplótipo 1 pela substituição de um único nucleotídeo em rs9894946. Não se sabe se R337H surgiu antes ou depois da introdução deste haplótipo no Brasil.

4.3 Penetrância do R337H e risco para o desenvolvimento de tumores

Para determinar a penetrância e risco de tumores específicos associados com R337H, nós analisamos os casos de câncer acumulados com a idade em portadores R337H e portadores obrigatórios identificados em famílias brasileiras. A Figura 12 mostra que a penetrância aumenta da infância até a idade de 10-15 anos até 15%, fica então estável até 30 anos de idade e tem um crescimento constante até atingir 80% aos 70 anos. Na LFS, a penetrância é aproximadamente 50% e 90% aos 30 e 60 anos de idade, respectivamente. Portanto, R337H parece conferir um risco menor de câncer na infância que a maioria das outras mutações germinativas, apesar de o risco cumulativo ao longa vida permanecer na mesma faixa (Bougeard et al. 2008).

Legenda: percentagem do número total de portadores afetados. Cada ponto corresponde à idade ao diagnóstico de tumores primários não-relacionados.

Figura 12. Incidência cumulativa dos casos de câncer em portadores R337H.

A Figura 13 mostra a ocorrência com a idade dos principais tipos de tumores diagnosticados nessas famílias. O câncer típico na infância foi o ADR (10,8 anos; variação 1-36 anos). Mais de metade dos casos de tumores renais (não Wilm's) e de SNC ocorreram em idade jovem, e os casos remanescentes após 30 anos. Câncer de mama foi o câncer mais comum, ocorrendo entre 24 e 64 anos (média: 43,7). Em contraste com tumores encontrados em outras mutações em TP53, os SPM ocorrem em idade tardia (média: 41,8; variação 2-59 anos).

Figura 13. Ocorrência de tumores e idade de acometimento nas famílias R337H.

Portanto, o fenótipo de câncer associado com R337H inclui vários tipos de cânceres do espectro Li-Fraumeni, com penetrância relativamente baixa antes dos 20 anos, mas com um risco no tempo total de vida comparável à LFS clássica.

4.4 Prevalência e distribuição do R337H na população do sul e sudeste brasileiro

Frente à verificação do efeito fundador nas famílias portadoras do R337H, investigamos a frequência do mutante em um grupo de 750 mulheres assintomáticas, não selecionadas para história familiar de câncer, com 40 a 69 anos de idade e participantes do programa de rastreamento mamográfico junto ao NMPOA (Anexo 7). DNA genômico obtido de sangue periférico das pacientes foram analisadas exclusivamente quanto à presença da alteração R337H no éxon 10 de *TP53*.

Das 750 mulheres analisadas, duas eram heterozigotas para R337H. Análise do heredograma das pacientes revelou que pertenciam à mesma família, embora aparentadas em quarto grau (Figura 14). A investigação do R337H em outros familiares demonstrou a presença da mesma alteração na mãe e irmã da paciente, previamente diagnosticada com câncer de mama aos 36 anos. Outros casos de câncer relatados nessa família incluíam dois tumores de cabeça e pescoço (aos 50 e 30 anos), dois casos de carcinoma de estômago, um caso de câncer de pulmão e um caso de câncer de pâncreas. Após a comunicação do resultado deste estudo aos familiares e início do rastreamento, uma criança de três meses foi diagnosticada com ADR, confirmando o diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni-*like* pelos critérios de Eeles 1 e Chompret. Atualmente a família está recebendo acompanhamento multidisciplinar e foi incluída em programas de rastreamento de diversos tumores.

Legenda: A seta indica as duas pacientes-índice portadoras da mutação R337H
Figura 14. Heredograma da família NMPOA.

4.5 Rastreamento de tumores nas famílias LFS/LFL brasileiras

Através do rastreamento das famílias LFS/LFL, foram detectados oito cânceres nos pacientes em rastreamento. Os pacientes foram acompanhados desde junho de 2005 até junho de 2008, sendo que apenas os 45 pacientes do estudo inicial foram acompanhados desde o início. Dentre os oito tumores detectados, seis ocorreram em famílias R337H. Os tumores encontrados foram quatro tumores de tireóide, dois cânceres de mama, um caso de ADR e um caso de meduloblastoma, sendo os dois últimos ocorridos em crianças. Todos os pacientes que apresentaram câncer foram imediatamente submetidos ao tratamento das lesões detectadas.

Três casos de carcinoma papilífero de tireóide foram detectados precocemente a partir de ultrassonografia de tireóide em pacientes R337H aos 29, 47 e 58 anos. Um tumor papilífero de tireóide foi detectado aos 32 anos em uma portadora de mutação germinativa no códon 197. Uma paciente regularmente em rastreamento detectou um

carcinoma “*in situ*” da mama aos 32 anos em uma paciente portadora da mutação no códon 213 e outra paciente, portadora do R337H, que evitou o rastreamento apesar das sucessivas tentativas de contato de nossa equipe, teve um diagnóstico de um carcinoma ductal invasivo GIII aos 37 anos.

O tumor ADR ocorreu em uma criança de três meses da família NMPOA de Porto Alegre portadora da mutação R337H (Figura 14). A criança foi trazida ao serviço de Genética Médica para avaliação, apresentando hirsutismo, aumento de genitália externa e fascies Cushingóide. Foi realizada a ressonância magnética de abdômem e detectada uma massa de 4,5 cm. Foi realizada a cirurgia, e a análise anatomopatológica da peça demonstrou um carcinoma de adrenocortical.

A filha de uma das pacientes-índice portadora do R337H, proveniente do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, recebeu o diagnóstico de meduloblastoma aos oito anos de idade. A criança estava em acompanhamento com o pediatra, porém não era submetida a nenhum rastreamento sistemático como previsto nas diretrizes do NCCN.

Nenhum novo caso de câncer renal foi detectado, no entanto cistos renais de dimensões variadas foram detectados em cinco pacientes. Uma paciente de 31 anos, portadora da mutação no códon 213, cujo irmão e a mãe apresentaram câncer renal, foi detectada com lesões císticas renais de até 40 milímetros. A paciente foi encaminhada ao serviço de cirurgia pélvica, onde prossegue o acompanhamento semestral dos cistos.

Em quatro pacientes portadores submetidos à colonoscopia entre 2007 e 2008, foram detectados pólipos adenomatosos com atipias, a maior parte delas de baixo grau. No entanto, em dois pacientes de 29 e 35 anos, foram verificados pólipos adenomatosos com atipia de grau moderado e alto grau respectivamente. Estes pólipos

podem ser considerados como lesões de alto potencial maligno e a retirada dos mesmos pode ser considerada como uma prevenção de tumores de cólon.

4.6 Modificadores genéticos de penetrância: haplótipos do gene *TP53* e *MDM2*

4.6.1 Suceptibilidade ao câncer ligada aos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 de *TP53*

4.6.1.1 Determinação dos polimorfismos na população brasileira

Para determinarmos o impacto dos polimorfismos na susceptibilidade ao câncer em famílias LFS/LFL, avaliamos em 300 controles assintomáticos do sul do país a frequência dos três polimorfismos da região N-terminal do gene *TP53*, PIN2, PIN3 e PEX4. As frequências alélicas de PIN2, PIN3 e PEX4 estão representadas na Tabela 6, onde estão comparadas às frequências das populações Caucasiana e Africana, descritas no banco de dados de SNPs do NCBI (SNPdatabase NCBI 2008).

Tabela 6. Frequência alélica dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 nas diferentes populações.

Polimorfismo	Alelo (Frequência)		Alelo (Frequência)		Alelo (Frequência)	
	CONTROLES (este estudo)		CAUCASIANOS*		AFRICANOS*	
	Maior	Menor	Maior	Menor	Maior	Menor
PIN2 <i>TP53</i>	G (0,74)	C(0,26)	G (0,72)	C(0,28)	G (0,46)	C (0,54)
PIN3 <i>TP53</i>	N (0,86)	D (0,14)	N (0, 93)**	D (0,07)**	NA	NA
PEX4 <i>TP53</i>	G (0,72)	C (0,28)	G (0,73)	C (0,27)	G (0,29)	C (0,71)

Legenda: *SNPdatabase NCBI 2008; **LASAR et al. 1993. População avaliada: norte-americana.

A frequência alélica menor (FAM) destes polimorfismos na população controle brasileira foi respectivamente 0,26 para o alelo C do PIN2, 0,14 para o alelo duplicado D do PIN3 e 0,28 para o alelo C do PEX4. Para PIN2 e PEX4, a distribuição é comparável às populações de referência do NCBI caucasianas e hispânicas, porém distintas da população africana. Para o PIN3, a única população de referência disponível no NCBI é a norte-americana, de origem étnica não determinada, que apresenta a FAM de 0,06. A publicação que descreveu originalmente a duplicação do íntron 3 (PIN3) demonstrou a prevalência do heterozigoto N/D de 28% (Lazar et al. 1993). Em estudo epidemiológico conduzido por Wu et al. (2002) as FAM foram descritas como 0,10 em caucasianos, 0,06 em norte-americanos e 0,18 em mexicanos. Logo, nossos resultados demonstram que a população brasileira do sul e sudeste apresenta um perfil semelhante à população caucasiana, pelo menos nas amostras estudadas.

4.6.1.2 Associação entre os polimorfismos na população avaliada como referência

A estratégia de determinação dos haplótipos ARMS foi utilizada para avaliar a associação entre os três polimorfismos nos 300 indivíduos avaliada como referência. A Tabela 7 demonstra as combinações entre os três polimorfismos e a distribuição dos haplótipos.

Tabela 7. Haplótipos dos polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 em controles da população brasileira.

PIN2	PIN3	PEX4	n	%
G	N	G	418	69.7
C	D	C	74	12.3
C	N	C	72	12.0
G	N	C	19	3.2
G	D	G	7	1.2
C	N	G	5	0.8
G	D	C	3	0.5
C	D	G	2	0.3
Total			600	100

O haplótipo mais freqüente foi o caracterizado pela combinação dos alelos mais freqüentes, GNG, composto por G no PIN2, pelo alelo não duplicado PIN3 N e pela presença de G no PEX4, representando 69,7% de todos os haplótipos. A ocorrência dos haplótipos que apresentam freqüências alélicas menores de PIN2 (C) e PEX4 (C) é de 12,3% e 12,0% respectivamente. A ocorrência dos outros haplótipos é rara, sendo a maior freqüência dentre estes haplótipos de 3,2%.

É interessante notar que entre os controles avaliados, os haplótipos demonstram 95,2% (571/600) de concordância entre alelos mais freqüentes e menos freqüentes de PIN2 e PEX4, ou seja, toda vez que o alelo mais freqüente G está presente em PIN2, verifica-se o alelo mais freqüente G em PEX4 e cada vez que o alelo menos freqüente C está presente em PIN2, o alelo menos freqüente C também está presente em PEX4, evidenciando um forte desequilíbrio de ligação entre esses dois polimorfismos. Para as combinações PIN2 e PIN3 a concordância foi de 85,5% (513/600) e 83,3% (500/600) para as combinações de PIN3/PEX4. O expressivo desequilíbrio de ligação entre PIN2 e PEX4 demonstra que os polimorfismos descritos estão fortemente ligados e que desta forma torna-se impossível distinguir

qual a contribuição de cada polimorfismo isoladamente. Desequilíbrio de ligação significa que estes marcadores não são distribuídos ao acaso entre a população, como seria o esperado, e que se desenvolveram em conjunto ao longo da evolução. Assim, nas análises seguintes, consideramos apenas PIN3 e PEX4, sendo o PEX4 considerado como equivalente aos resultados obtidos pelo PIN2.

4.6.1.3 Determinação dos polimorfismos em famílias LFS/LFL

Em seguida, avaliamos a distribuição dos polimorfismos em indivíduos afetados por algum tipo de câncer, com o diagnóstico clínico da LFS/LFL, independente de serem ou não portadores de mutações no gene *TP53*. Um total de 109 indivíduos LFS/LFL foi analisado, dentre eles os 91 pacientes-índice afetados e 18 familiares afetados por câncer. Apenas um familiar de cada paciente-índice foi incluído na análise para evitar viés relacionado à seleção dos pacientes, o que poderia ocorrer frente à inclusão de muitos pacientes provenientes de uma mesma família, como é o exemplo da família Y12.

Os resultados referentes ao polimorfismo PIN2 estão apresentados na tabela 8. O genótipo GG foi o mais freqüente no PIN2, encontrado em 50,9% dos casos e em 55,3% dos controles (população-referência). O genótipo GC esteve presente em 43,5% dos casos e CC em 5,6% dos casos. As diferenças encontradas entre os pacientes-índice LFS/LFL e seus familiares não demonstraram significância estatística quando comparados aos controles da população.

Tabela 8. Distribuição do polimorfismo PIN2 em indivíduos afetados (pacientes-índice e familiares) com o diagnóstico clínico da LFS/LFL

Genótipo PIN2 <i>TP53</i>	Casos n (%)	Controles n (%)
GG	55 (50,9)	166 (55,3)
GC	47 (43,5)	112(37,3)
CC	6 (5,6)	22 (7,3)
Total	108	300 (100)

Legenda: uma das amostras sem DNA.

Teste do qui-quadrado: $p=0,64$

O genótipo NN foi o mais frequentemente verificado no PIN3, encontrado em 69,7% dos casos e em 74,0% dos controles (Tabela 9). O genótipo ND esteve presente em 30,3% dos casos e a presença de dois alelos duplicados (DD) não foi verificada entre os mesmos. As diferenças encontradas entre os pacientes-índice LFS/LFL e seus familiares não demonstraram significância estatística quando comparados aos controles da população.

Tabela 9. Distribuição do polimorfismo PIN3 em indivíduos afetados (pacientes-índice e familiares) com o diagnóstico clínico da LFS/LFL

Genótipo PIN3 <i>TP53</i>	Casos n (%)	Controles n (%)
NN	76 (69,7)	222 (74,0)
ND	33 (30,3)	70 (23,3)
DD	-	8 (2,7)
Total	109	300 (100)

Teste do qui-quadrado: $p=0,19$

Em relação ao PEX4, o genótipo GG foi o mais freqüente, tendo sido verificado em 52,3% dos casos e em 52,7% dos controles (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição do polimorfismo PEX4 em indivíduos afetados com o diagnóstico clínico da LFS/LFL.

Genótipo PEX4 <i>TP53</i>	Casos n (%)	Controles n (%)
GG	57 (52,3)	158 (52,7)
GC	46 (42,2)	114(38)
CC	6 (5,5)	28 (9,3)
Total	109	300 (100)

Teste do qui quadrado: $p=0,39$

O genótipo GC esteve presente em 42,2% dos casos e CC em 5,5% dos casos. As diferenças encontradas entre os pacientes-índice LFS/LFL e seus familiares não demonstraram significância estatística quando comparados aos controles da população. Não foi verificado nenhum caso de homozigotos para PIN3 D/D, sugerindo uma possível seleção contra PIN3D/D e risco para câncer familiar. No entanto, como na população a presença de D/D é baixa (2,7%), a ausência de PIN3D/D pode ser devida ao tamanho da amostra de nossa população de casos LFS/LFL.

4.6.1.4 Impacto dos polimorfismos na idade de acometimento dos tumores

Para determinarmos se os polimorfismos podem interferir na idade de aparecimento dos tumores, agindo como modificadores de mutações germinativas em *TP53*, comparamos a distribuição de polimorfismos entre membros da família portadores ou não de mutações em *TP53*. Foram selecionados 86 dos 109 indivíduos afetados LFS/LFL que tinham comprovante histopatológico do câncer e da idade de acometimento do tumor.

A tabela 11 mostra a distribuição dos genótipos para PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL. Os resultados demonstram que em pacientes com mutações em *TP53* em homozigose para os alelos não duplicados (N/N) de PIN3, a idade de acometimento dos tumores foi menor se comparados aos pacientes que apresentavam um alelo duplicado (N/D). A diferença entre os portadores dos alelos N/N e N/D foi de 17,1 anos, sendo esta uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.01$). Como demonstrado na tabela 11, nenhum caso de D/D homozigoto foi verificado entre os indivíduos testados.

Tabela 11. Distribuição dos genótipos para PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL e idade média de aparecimento de tumores.

PIN3 <i>TP53</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n(%)	Idade média (SD)
NN	60 (69.8)	40.7 (18.8)	16 (69.6)	29.9 (14.5)
ND	26 (30.2)	43.1 (15.4)	7 (30.4)	47 (9.2)
DD	-	-	-	-
ND+DD	26 (30.2)	43.1 (15.4)	7 (30.4)	47 (9.2)
Total	86		23	
Valor de p*		0.56		0.01

*Teste t não-pareado

A mesma análise foi realizada para o PEX4 (Tabela 12). Não foi verificada nenhuma diferença significativa relacionada à idade de acometimento em indivíduos que não eram portadores de mutações em *TP53*.

Tabela 12. Distribuição dos genótipos para PEX4 em indivíduos afetados LFS/LFL e idade média de aparecimento de tumores.

PEX4 <i>TP53</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n(%)	Idade média (SD)
GG	43 (50,0)	40,7 (20,1))	14 (60,9)	31,9 (16,3)
GC	37 (43,0)	42,5 (16,2)	9 (39,1)	40 (12,7)
CC	6 (7,0)	40,3 (9,2)	-	-
GC+CC	43 (50,0)	42,2 (15,3)	9 (39,1)	40 (12,7)
Total	86		23	
Valor de p*		0,89/0,70		0,22

*Teste t não-pareado

Em portadores de mutações em *TP53*, pacientes homozigotos G/G apresentaram tumores em média 8,1 anos mais cedo do que pacientes portadores de um ou dois alelos C. No entanto, esta diferença não apresentou significância estatística.

Verifica-se desequilíbrio de ligação entre PIN3 e PEX4/PEX2. Por este fato e devido à diferença relacionada à idade ser exclusiva para PIN3, pode-se concluir que o aceleração no aparecimento dos tumores ocorreu essencialmente devido ao genótipo do PIN3 N/N. Estes resultados demonstram que o polimorfismo PIN3 é um forte modificador do efeito da mutação germinativa em *TP53*, e o mesmo não apresenta impacto na ausência de mutação.

4.6.1.5 Efeito de PIN3 no risco de câncer e idade de acometimento

Para avaliarmos o efeito de PIN3 sobre o risco para câncer e sobre a idade de acometimento de tumores em pacientes LFS/LFL (portadores ou não de mutações em *TP53*), analisamos a ocorrência de câncer em relação à idade em portadores de

mutações em *TP53* (Figura 15A) e em pacientes nos quais não foram detectadas mutações (Figura 15B).

Figura 15A. Ocorrência de câncer em portadores de mutação no gene *TP53* em relação ao genótipo de *PIN3 TP53*.

Figura 15 B. Ocorrência de câncer em pacientes sem a mutação detectada no gene *TP53* em relação ao genótipo de *PIN3 TP53*.

Na figura 15A, foram avaliados os pacientes-índice R337H e familiares de 1º e 2º grau afetados e/ou portadores obrigatórios da mutação R337H (n=15) e comparados a casos de portadores de outras mutações e familiares de 1º e 2º grau afetados e/ou portadores obrigatórios (n=21), todos afetados por pelo menos um câncer. Para a análise da figura 15B, levamos em consideração todos os casos de pacientes com diagnóstico clínico e sem mutação detectada no gene *TP53* e familiares de 1º e 2º grau portadores de tumor (n=101).

As figuras 15 A e B evidenciam que a diferença de idade de acometimento entre os genótipos PIN3 N/N e N/D é consistente ao longo da vida. É surpreendente notar que somente portadores de alelos não duplicados N/N apresentaram tumores durante a infância. Em portadores N/D o único caso ocorrido antes dos 20 anos foi o caso de um tumor adrenocortical em uma criança de um ano, portadora da mutação T125T ACG>ACA e proveniente da família Y79. Atualmente a paciente tem 37 anos e não apresentou recidiva e nem desenvolveu outro tumor primário.

O risco de tumores na infância em portadores da duplicação em PIN3 é menor. Estes resultados indicam que apesar do risco da ocorrência de tumores em idade precoce existir em homozigotos N/D portadores, portadores N/N tem maior suscetibilidade para tumores infantis do espectro LFS/LFL. A diferença na ocorrência de tumores em relação à idade foi a mesma, tanto em portadores de mutações R337H como em portadores de outras mutações, sugerindo que o efeito modificador de PIN3 é independente de propriedades específicas dos diferentes tipos de mutação. Em indivíduos sem mutações em *TP53* não foram verificadas diferenças na idade de acometimento dos tumores relacionada à idade e a duplicação do PIN3.

4.6.1.6 Impacto de PIN3 na idade de acometimento de acordo com o tipo tumoral

A indicação da existência de um retardamento de 17,1 anos no aparecimento de tumores em pacientes que são portadores do genótipo PIN3 N/D se comparados aos que não são portadores da duplicação, demonstrado na figura 15A, nos levou a busca de efeitos semelhantes em todos os tumores relacionados à LFS, não só aqueles ocorridos na infância.

Assim, analisamos o impacto de PIN3 na idade de acometimento do câncer de mama, um dos tumores mais freqüentemente presentes em mulheres portadoras de LFS/LFL (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto na idade de acometimento do câncer de mama.

PIN3 <i>TP53</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n(%)	Idade média (SD)
NN	25 (64,1)	46,4 (11,3)	8 (80,0)	33,6 (9,9)
ND	14 (35,9)	46,4 (10,3)	2 (20,0)	50,0 (15,5)
DD	-	-	-	-
ND+DD	14 (35,9)	46,4 (10,3)	2 (20,0)	50,0 (15,5)
Total	39		8	
Valor de p*		0,98		0,09

*Teste t não-pareado

No câncer de mama a média da diferença de idade de acometimento entre portadores de mutação e PIN3 N/N e N/D foi 16,4 anos (33,6 anos em pacientes sem a duplicação e 50 anos nos que tem a duplicação), muito semelhante à diferença encontrada quando são analisados outros tipos de tumor. Os tumores de mama

ocorrem em idade mais precoce, no entanto persiste a sua ocorrência tardiamente. No entanto, apesar de ser uma diferença grande, não foi considerada estatisticamente significativa ($p=0,09$), provavelmente devido ao número de tumores de mama estudados.

Em seguida, analisamos o impacto de PIN3 na idade de acometimento de SPM, um dos tumores mais freqüentemente presentes em crianças e adolescentes portadores de LFS/LFL (Tabela 14). Para SPM, a diferença observada foi ainda maior. Uma diferença de 30 anos foi verificada (20,2 comparado a 50,5 anos), sendo este valor estatisticamente significativo ($p=0.01$).

Tabela 14. Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto na idade de acometimento de sarcomas de partes moles (SPM).

PIN3 <i>TP53</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n(%)	Idade média (SD)
NN	13 (72,2)	29,9 (17,8)	4 (50,0)	20,2 (15,6)
ND	5(27,8)	40,6 (12,1)	4 (50,0)	50,5 (5,3)
DD	-	-	-	-
ND+DD	5 (27,8)	40,6 (12,1)	4 (50,0)	50,5 (5,3)
Total	18		8	
Valor de p*		0,24		0,01

*Teste t não-pareado

A partir das análises dos pacientes que não apresentam mutações em *TP53*, o mesmo efeito não pôde ser verificado. No entanto, uma diferença de 10,7 anos foi verificada entre a idade ao diagnóstico de SPM, sendo 29,9 anos em PIN3 N/N homozigotos *versus* 40,6 em N/D heterozigotos. Estas diferenças indicam que o PIN3 pode ter efeito modificador em portadores de mutação germinativa do *TP53*. A

realização de estudos envolvendo um número maior de pacientes LFS/LFL para a avaliação de PIN3 irá comprovar esta associação.

4.6.1.7 Impacto do polimorfismo PIN3 no número de cânceres

A presença da duplicação no íntron 3, PIN3 D, tem efeito protetor na idade de acometimento de tumores e esta pode ter ação contra os efeitos devastadores provenientes de mutações germinativas no gene *TP53*. Assim, decidimos avaliar se os alelos PIN3 D também apresentam algum impacto no número de tumores que um paciente desenvolve ao longo da vida. A tabela 15 compara a média de tumores ocorridos por pacientes diagnosticados com mutações no gene *TP53* em relação ao genótipo PIN3.

Tabela 15. Distribuição dos genótipos de PIN3 em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto no número de cânceres desenvolvidos por cada paciente.

PIN3 <i>TP53</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Número de tumores (SD)	n(%)	Número de tumores (SD)
NN	60 (69,8)	1,7 (1,2)	16 (69,6)	1,9 (1,3)
ND	26 (30,2)	1,1 (0,4)	7 (30,4)	2,0 (1,4)
DD	-	-	-	-
ND+DD	26 (30,2)	1,1 (0,4)	7 (30,4)	2,0 (1,4)
Total	86		23	
Valor de p*		0,03		0,92

*Teste t não-pareado

Apenas pacientes não portadores de mutações apresentaram resultados estatisticamente significativos. Estes pacientes apresentaram tendência a desenvolver

um menor numero de cânceres (em média um por paciente) em portadores do PIN3 D, enquanto que em homozigotos PIN3 N/N apresentaram 1,7 tumores por paciente.

4.6.2 Efeito do SNP 309 do gene *MDM2* no risco de câncer e idade de acometimento

Analizamos o SNP309 do promotor de *MDM2* nos pacientes-índice e familiares afetados LFS/LFL para avaliarmos se há efeito modificador, tanto em portadores de mutações germinativas de *TP53* como naqueles em que a mutação não foi detectada. Para verificar esta hipótese em nossos pacientes, analisamos a média de idade ao diagnostico de câncer e relacionamos aos genótipos de *MDM2* SNP309 (Tabela 16).

Tabela 16. Distribuição dos genótipos do SNP 309 do gene *MDM2* em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto na idade ao diagnostico de câncer.

SNP309 <i>MDM2</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n(%)	Idade média (SD)
TT	15 (33,3)	39,7 (19,8)	11 (57,9)	38,7 (16,8)
TG	19 (42,2)	36,4 (18,2)	8(42,1)	30,1 (15,7)
GG	11 (24,4)	45,8 (13,4)	-	-
TG+GG	30 (66,7)	39,9 (17,0)	8 (42,1)	30,1 (15,7)
Total	45		19	
Valor de p*	0,37/0,98		0,27	

*Teste t não-pareado

Não foram verificadas diferenças estatisticamente significativas em não portadores de mutações em *TP53*. Em portadores de mutações, nenhum dos pacientes

apresentava o alelo G/G, apesar de este alelo estar presente em 2,4% dos pacientes que não eram portadores da mutação. Além disso, a proporção de heterozigotos G/T era idêntica em portadores de mutações e em não portadores, sugerindo assim que a ausência de G/G homozigotos não é devido a uma menor representação do alelo G em famílias com mutações. Esta observação é sugestiva de uma incompatibilidade no desenvolvimento entre o genótipo *MDM2* SNP309 G/G e a presença de uma mutação germinativa em *TP53*.

Portadores do genótipo T/T desenvolveram câncer em uma idade média de 38,7 anos, comparado a 30,1 anos em portadores do alelo G. A diferença de 8,6 anos é semelhante a relatada nos outros estudos (Bond et al. 2004, Frebourg et al. 2006). No entanto, provavelmente devido ao número limitado de tumores neste estudo, o efeito não apresentou significância estatística ($p=0.27$). A figura 16 compara a ocorrência de tumores relacionado à idade em portadores e não-portadores de mutações em *TP53* de acordo com o genótipo *MDM2*. O efeito de *MDM2* não foi constante ao longo da vida. Foi verificada uma maior diferença no início da vida e uma tendência para o encontro das curvas de ocorrência de tumores para cada genótipo de unirem-se entres as idades de 40 a 45 anos. Podemos deduzir a partir desta informação que o efeito de *MDM2* seria mais pronunciado, ou mesmo restrito, para cânceres que ocorrem em idade mais precoce, como o SPM.

Figura 16. Ocorrência de câncer relacionado à idade em portadores e não-portadores de mutação no gene *TP53* em relação ao genótipo do SNP 309 do gene *MDM2*.

A tabela 17 compara a idade ao diagnóstico de câncer de mama e SPM em portadores e não-portadores de mutações no gene *TP53* relacionando com o genótipo de *MDM2* SNP309.

O *MDM2* SNP309 não demonstrou efeito sobre a idade ao diagnóstico do câncer de mama, que ocorreu em média 42,2 anos em homozigotos T/T, comparado a 38,2 anos em portadores do alelo G com mutação em *TP53*.

Tabela 17. Distribuição dos genótipos do SNP 309 do gene *MDM2* em indivíduos afetados LFS/LFL, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto na idade de acometimento pelo câncer de mama.

SNP309 <i>MDM2</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n (%)	Idade média (SD)
TT	8 (57,1)	48,7 (16,3)	4 (44,4)	42,2 (14,4)
TG	4 (28,6)	42,2 (7,3)	5 (55,6)	38,8 (5,2)
GG	2 (14,3)	46,0 (2,8)	-	-
TG+GG	6 (42,9)	43,5 (6,1)	5 (55,6)	38,8 (5,2)
Total	14		9	
Valor de p*	0,74/0,47		0,63	

*Teste t não-pareado

Em contraste, uma diferença significativa foi detectada para SPM, com a média de diagnóstico de 45 anos em homozigotos T/T comparado a 9,5 anos em portadores do alelo G (diferença de 35,5 anos, $p=0.02$) (Tabela 18).

Tabela 18. Distribuição dos genótipos do SNP309 do gene *MDM2* em indivíduos LFS/LFL afetados, com e sem mutação no gene *TP53*, e impacto na idade de acometimento pelo SPM.

SNP309 <i>MDM2</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n (%)	Idade média (SD)
TT	4 (28,6)	39,0 (25,6)	5 (71,4)	45,0 (13,1)
TG	6 (42,9)	31,7 (12,0)	2 (28,6)	9,5 (12,0)
GG	4 (28,6)	45,2 (14,4)	-	-
TG+GG	10 (71,4)	37,1 (14,1)	2 (28,6)	9,5 (12,0)
Total	14		7	
Valor de p*	0,49/0,86		0,02	

*Teste t não-pareado

4.6.3 Efeitos combinados dos diferentes polimorfismos

4.6.3.1 Associações entre PIN3 e PEX4

Como os polimorfismos PIN3 e PEX4/PIN2 podem ocorrer em diferentes combinações, que definem haplótipos de *TP53* diferentes, analisamos os efeitos combinados de PIN3 e PEX4 como modificadores em portadores de mutações e em não-portadores. Na análise não avaliamos em relação ao PIN2 especificamente por este ser considerado equivalente ao PEX4. Os resultados demonstram significância estatística entre as diferentes combinações de genótipos em portadores de mutações em *TP53* (Tabela 19).

Tabela 19. Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e PEX4, em portadores e em não-portadores de mutações em *TP53*, e idade de acometimento de tumores.

Genótipos PIN3xMDM2	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n (%)	Idade média (SD)
NN x GG	40 (46,5)	41,0 (20,8)	13 (56,5)	29,8 (14,7)
NN x (GC+CC)	20 (23,3)	40,2 (14,3)	3 (13,0)	30,3 (16,7)
ND x GG	3 (3,5)	37,3 (2,1)	1 (4,3)	60,0 (0,0)
ND x (GC+CC)	23 (26,7)	43,9(16,2)	6 (26,1)	44,8 (7,8)
ND x (GG+ GC+CC)	-	-	7 (30,4)	47,0(9,2)
Total	86		23	
Valor de p*	0,87			-/0,04

*Teste t não-pareado (combinado/não combinado)

A idade média ao diagnóstico foi a mesma que em homozigotos PIN3 N/N independente do status de PEX4 status (29,8 anos para PEX4 G/G homozigotos comparado a 30,3 anos em portadores de ao menos um alelo C). A idade aumentou

para 45 anos em PIN3 N/D, sem diferença devido ao genótipo de PEX4. Logo, a diferença foi exclusivamente relacionada ao efeito de PIN3, sem efeito adicional de PEX4, e exatamente os mesmos efeitos relacionados ao PIN2.

Analisando a interação entre PIN3 e PEX4 na idade de ocorrência de SPM encontramos uma diferença significativa de 30,3 anos ($p=0,01$), sendo mais precoce nos indivíduos que não são portadores da duplicação (Tabela 20). O mesmo pode ser verificado na ausência da associação com PEX4, demonstrando que isto ocorreu devido à ação exclusiva de PIN3.

Tabela 20. Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e PEX4, em portadores e em não-portadores de mutações em *TP53*, e idade de acometimento de SPM.

Genótipos PIN3xPEX4	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n (%)	Idade média (SD)
NN x GG	8 (42,1)	29 (20,5)	3 (37,5)	21,0 (19,1)
NN x (GC+CC)	6 (31,6)	35,8 (16,9)	1 (12,5)	18,0 (0,0)
NN x (GG+GC+CC)	-	-	4 (50,0)	20,2 (15,6)
ND x GG	1 (5,3)	39,0	-	-
ND x (GC+CC)	4 (21,1)	41,0 (13,8)	4 (50,0)	50,5 (5,3)
ND x (GG+ GC+CC)	5 (26,3)	40,6 (12,0)	-	-
Total	19		8	
Valor de p*	-/0,51			-/0,01

*Teste t não-pareado

4.6.3.2 Associações entre PIN3 e *MDM2*

Analisamos o efeito combinado dos genótipos de PIN3 e *MDM2* SNP309 (Tabela 21). O efeito na idade ao diagnóstico para portadores de mutação em *TP53* demonstrou significância estatística ($p=0,04$). No entanto, não houve evidência de efeito cumulativo dos dois polimorfismos. A idade média ao diagnóstico foi a mesma

em PIN3 N/N homozigotos que eram portadores tanto dos genótipos de *MDM2* SNP309 T/T quanto G/T, sugerindo que o efeito do alelo *MDM2* SNP309 T não modera o impacto de PIN3.

Tabela 21. Efeitos combinados dos genótipos de PIN3 e *MDM2* SNP309, em portadores e em não portadores de mutações em *TP53*, e idade de acometimento de tumores.

Genótipos PIN3x <i>MDM2</i>	Ausência de mutação em <i>TP53</i>		Mutação detectada em <i>TP53</i>	
	n (%)	Idade média (SD)	n (%)	Idade média (SD)
NN x TT	12 (26,7)	37,1 (19,7)	5 (27,8)	24,6 (16,6)
NN x (TG+GG)	22 (48,9)	42,2 (15,7)	6 (33,3)	26,7 (16,6)
ND x TT	3 (6,7)	50,3 (19,5)	6 (33,3)	49,0 (8,2)
ND x (TG+GG)	8 (17,8)	33,5 (19,8)	1 (5,6)	35,0 (0,0)
ND x (TT+TG+GG)	11 (24,4)	38,1 (20,4)	7 (38,9)	47,0 (9,2)
Total	45		18	
Valor de p*	0,44/0,69		-/ 0,03	

Logo, apesar dos efeitos modificadores em mutações germinativas no gene *TP53* distintos relacionados à idade de acometimento dos tumores, os polimorfismos de PIN3 e *MDM2* SNP309 não apresentam efeitos cumulativos, sugerindo efeito epistático, ou seja, um efeito dominante do polimorfismo PIN3 sobre o *MDM2*. Este efeito não pode ser avaliado estatisticamente devido à pequena representação de alguns genótipos presentes nas séries de pacientes atualmente analisadas.

5 DISCUSSÃO

5.1 Caracterização clínica e populacional da LFS/LFL no Brasil

Este estudo foi desenhado visando a melhor compreensão e identificação dos mecanismos genéticos responsáveis pela alta prevalência da LFS/LFL em famílias provenientes das regiões sul e sudeste do Brasil. Visamos também à melhor compreensão da LFS/LFL no país, de forma a possibilitar um manejo adequado dos portadores.

Em famílias nas quais a mutação no gene *TP53* foi detectada, notamos que portadores da mesma mutação podem desenvolver tumores em idades variadas, ocorrendo para alguns na infância enquanto que para outros o acometimento é tardio. Isto já havia sido verificado em famílias LFS/LFL avaliadas previamente (Olivier et al. 2003). Para a melhor compreensão da origem das diferenças encontradas, mostrou-se importante a avaliação de possíveis modificadores que pudessem interagir com mutações no *TP53*, como os polimorfismos intragênicos PIN2, PIN3 e PEX4, além de efeitos sinérgicos com outros genes, como o *MDM2*, principal regulador de *TP53*.

5.1.1 Padrão tumoral: espectro tumoral e alta frequência de câncer colorretal e de estômago nas famílias brasileiras LFS/LFL

Reavaliação as famílias LFS/LFL do projeto inicial quanto ao espectro tumoral e idade de acometimento. Estas famílias já tinham sido bem caracterizadas molecularmente e eram regularmente submetidas ao rastreamento. As famílias recrutadas na segunda fase não foram incluídas, pois estavam em avaliação.

O padrão de tumores observado demonstrou um perfil semelhante ao previamente descrito na LFS/LFL (Hartley et al. 1989; Varley et al. 1997). No entanto, verificamos que CCR e câncer de estômago são mais comuns nas famílias brasileiras que o esperado, presentes em 79% (10/13) das famílias LFS/LFL com mutação em *TP53* e 69% (22/32) em famílias sem mutação identificada. No entanto, apenas os tumores colorretais ocorreram em idade mais jovem (idade média: 32,4 anos) do que o observado na população. Os tumores de estômago ocorreram predominantemente após os 50 anos, dados que sugerem a possibilidade destes tumores serem fenocópias. Em estudo realizado por Wong et al. (2006), também verificou-se a alta incidência de tumores gastro-intestinais, presentes em 51% de todas as famílias portadoras da LFS/LFL (32/62) avaliadas. Essas observações têm duas implicações. A primeira questão que surge refere-se aos cânceres de estômago e CCR e se os mesmos devem ser considerados como parte do padrão de tumores de LFS/LFL. Segundo, as observações falam a favor da introdução de avaliação por endoscopia e colonoscopia no seguimento das famílias LFS/LFL.

Baseado nesses resultados, nós defendemos a introdução de avaliação para CCR e câncer de estômago no manejo clínico de indivíduos de famílias LFS/LFL, dependendo da população ou contexto familiar. Fazemos então as seguintes recomendações: (1) CCR de manifestação precoce deve ser incluído nos cânceres característicos do espectro LFS/LFL, e teste para *TP53* deve ser considerado a linha subsequente de análise, após avaliação de genes de reparo de DNA sempre que os critérios para a síndrome de Lynch ou HNPCC forem preenchidos; (2) Investigação por colonoscopia a cada dois anos deve ser considerada no manejo clínico dos indivíduos pertencentes a famílias LFS/LFL. A investigação deve ser iniciada a partir dos 25 anos, como proposto por Wong et al. (2006), ou cinco a 10 anos antes do caso

de CCR de manifestação mais precoce na família, o que for mais cedo. Esta investigação deve ser oferecida tanto para famílias com quanto sem mutações em *TP53*; (3) A endoscopia digestiva alta deve ser considerada caso a caso, especialmente na presença de história familiar de câncer de estômago e/ou em populações com alta incidência de CCR (como é o caso do Brasil). Dependendo do contexto, pode ser feita a cada dois a cinco anos, começando ao menos 10 anos antes do câncer de estômago mais precoce na família, ou aos 40 anos em famílias sem história de câncer de estômago.

5.1.2 Incidência estimada, excesso de risco e manejo

Existe pouca informação disponível sobre a incidência de cânceres e o excesso de risco em pacientes portadores da LFS/LFL e em suas famílias. O único estudo baseado em amostra populacional foi realizado no Reino Unido por Birch et al. em 2001. Neste estudo foi feita uma comparação da incidência de tumores em um grupo de 28 famílias inglesas com o diagnóstico de LFS/LFL e a incidência na população britânica, a partir do Registro de Câncer do Reino Unido (RCRU). Os achados demonstraram que sete tipos de tumor estão fortemente associados com mutações germinativas no *TP53* (mama, cérebro, sarcoma de tecidos moles, osteosarcoma, tumor de Wilms', ADR, tumor Phyllodes maligno). Um dos aspectos mais importantes abordados foi a ocorrência de tumores que são tão frequentes na população, tais como cânceres de pulmão, cabeça e pescoço, esôfago e gástricos, quanto nas famílias LFS/LFL. A ocorrência de CCR, apesar de mais frequente do que o observado na população, não foi estatisticamente significativos ($p=0,0096$). Este fato demonstra que mutações germinativas aumentam o risco para tumores específicos

à síndrome, porém não para todos os cânceres. Esta avaliação possibilitou abordar uma dúvida freqüente sobre a origem destes tumores nas famílias LFS/LFL – se estes tumores são originados a partir da mutação no *TP53* ou se são apenas fenocópias. No entanto, o número de famílias envolvidas neste estudo era pequeno (28) e apenas dois dos 148 tumores avaliados eram CCR. De forma semelhante, a alta ocorrência de CCR e câncer de estômago nas famílias brasileiras incluídas neste estudo levantaram a questão de se os tumores ocorridos nas famílias LFS/LFL eram apenas fenocópias ou tumores relacionados à mutação germinativa no *TP53*.

CCR é um câncer freqüente na população do sul e sudeste do Brasil, representando nas populações masculinas e femininas o terceiro e quarto câncer mais comum, respectivamente, com incidência de 13 a cada 100 000 homens e 15 a cada 100 000 mulheres (INCA 2008). A associação específica dos tumores ocorridos nas famílias LFS/LFL é evidenciada pela idade de manifestação significativamente mais precoce em portadores de mutações em *TP53* (32,4 anos em portadores e 51,6 em não-portadores de mutação). Essa associação não parece estar restrita a famílias brasileiras: análises no banco de dados de mutações germinativas em *TP53* do IARC (Petitjean et al. 2007) mostram que mutações herdadas em *TP53* estão associadas com a manifestação precoce de CCR, com uma diferença de idade entre portadores e não-portadores semelhante à observada em nosso estudo. O estudo de Wong et al. (2006) relata a alta prevalência de CCR em 397 pacientes norte-americanos jovens com LFS, ocorrendo várias décadas antes do observado na população em geral. Tanto nossos resultados como os de Wong (2006) sugerem que CCR é um diagnóstico comum em famílias LFS/LFL e que esta manifestação é acelerada em portadores de mutações em *TP53*. Nossos resultados substanciam a noção de que o risco de CCR esteja associado especificamente à herança de mutações germinativas em *TP53*.

Câncer de estômago também é freqüente no Brasil, com incidências de 15 casos a cada 100 000 homens e oito a cada 100 000 mulheres (INCA 2008). Na série brasileira aqui apresentada, o câncer de estômago foi diagnosticado em 46,2% das famílias com mutações, comparado com 31,3% nas famílias sem mutações. No entanto, a idade de manifestação foi semelhante nos dois grupos e na população brasileira, indicando que a presença de mutação não parece acelerar a ocorrência de câncer de estômago. Portanto, a relação do impacto biológico de mutações herdadas em *TP53* e câncer de estômago ainda precisa ser determinada.

A questão de se as mutações em *TP53* especificamente predis põem a CCR e/ou câncer de estômago é complexa e ainda não pode ser respondida de maneira definitiva. Tal julgamento requer análise extensiva da incidência de tumores em famílias LFS/LFL comparada à incidência na população geral correspondente. Estudos comparando o número de casos de CCR e cânceres de estômago ocorridos entre as famílias LFS/LFL e os casos esperados na população brasileira iriam esclarecer esta questão.

O rastreamento da maioria dos cânceres relacionados à LFS/LFL é de difícil acompanhamento no contexto de programas de monitoração. A disponibilidade de métodos eficientes para a detecção precoce de câncer é um fator decisivo no acompanhamento de indivíduos pertencentes a famílias com predisposição hereditária a câncer. Em indivíduos com predisposição a CCR, a colonoscopia se mostrou um método confiável para a detecção precoce, levando a uma cura eficaz de lesões precursoras do câncer (Lieberman et al. 2008) . A atualização mais recente da NCCN recomenda colonoscopia como parte do seguimento na LFS/LFL. Apesar de trabalhos anteriores terem mostrado um aumento de risco de câncer de estômago nas famílias com LFS/LFL, não há no momento recomendações específicas para introduzir

endoscopia digestiva alta como parte do rastreamento da síndrome. Frente ao fato de que a endoscopia é eficiente para detecção de precoce câncer de estômago do tipo intestinal, reforça-se a necessidade de sua instauração nos programas de monitoração para indivíduos com risco alto e deve propiciar meios para diagnóstico precoce em famílias LFS/LFL.

5.1.3 Panorama atual da LFS/LFL no mundo e no Brasil: contribuição do nosso estudo

Até o momento, 399 mutações germinativas no gene *TP53* foram descritas no mundo (IARC *TP53* Database R12) (Petitjean et al. 2007) (Figura 17).

Figura 17: Panorama atual de portadores de mutações germinativas no gene *TP53*.

É interessante notar que 89,7% (87/97) das mutações descritas no país até o momento ocorreram no códon 337 do éxon 10 (IARC *TP53* Database R12) (Petitjean et al. 2007). Desta forma, pode-se inferir que 21,8% de todas as mutações germinativas no gene *TP53* descritas até o momento no mundo ocorrem no domínio

de oligomerização, diferindo das mutações somáticas comumente descritas no gene *TP53*.

5.1.4 A família Y12 e o desafio do aconselhamento genético

Durante o aconselhamento pós-teste, realizado para a divulgação do resultado do teste molecular, foi oferecida a possibilidade de realização do teste preditivo em familiares. Um dos pacientes portadores da mutação R337H, o paciente Y12, demonstrou grande interesse em incluir seus familiares. Nos deslocamos até a cidade de origem da família Y12, a 73 km de distância da capital de São Paulo, e realizamos o AG a 82 membros da família, sendo que 57 membros optaram por participar da pesquisa. O grupo foi orientado sobre as características da síndrome, os riscos, o modo de herança, além dos benefícios e dificuldades que teste genético apresentaria. Foi realizada a leitura em voz alta do TCLE e coleta do sangue pela equipe presente, composta por dois médicos geneticista, um geneticista molecular, uma enfermeira e uma psicóloga.

A partir da experiência vivida com a família Y12, pudemos aprofundar-nos na história da família e obtivemos informações dos familiares sobre suas origens. Foi relatada a existência de um ancestral tropeiro na família. Associamos esta informação ao fato dos tropeiros serem mercadores que faziam a rota de São Paulo em direção ao sul do país. Assim, pudemos propor a hipótese histórica do envolvimento dos tropeiros na disseminação do R337H no sul e sudeste do país.

5.2 R337H e a presença da mutação fundadora em uma população aberta

5.2.1 R337H: efeito fundador evidente em população de origem caucasiana

O estudo conduzido por Ribeiro et al. em 2001 demonstrou a presença da mutação R337H em crianças com ADR em famílias sem relato de história de câncer. Estudos posteriores demonstraram a alta ocorrência da mesma mutação em famílias brasileiras que preenchiam os critérios de LFS/LFL (Achatz et al. 2007). O estudo conduzido por Ribeiro era limitado em dois aspectos: (1) continha pouca informação relacionada à história familiar das crianças incluídas e (2) apresentava informações insuficientes relacionadas às variações genômicas no cromossomo 17p nas crianças portadoras da mutação R337H, sendo avaliados apenas 4 *loci* no braço curto do cromossomo 17 e incluindo apenas dois na sequência do gene *TP53*. Os resultados apresentados demonstravam heterogeneidade nos *loci* avaliados, sugerindo desta forma que o R337H seria originário de alelos diferentes e independentes. Em contraste usando dois *loci* intragênico hipervariáveis, Pinto et al. (2004) sugeriram que a ocorrência do efeito do fundador era estatisticamente provável.

Para avaliarmos essa questão nas famílias com diagnóstico da mutação R337H no gene *TP53*, optamos pela estratégia de um seqüenciamento em larga escala para analisar a distribuição dos polimorfismos ao longo de todo o gene *TP53*. A parte técnica do ensaio foi realizada pela pesquisadora Sonia Garritano no Laboratório de Oncogênese Molecular do Dr. Pierre Hainaut, no IARC, França. Inicialmente, um grupo de 48 controles brasileiros, da região de São Paulo e sem câncer foram avaliados. A sequência codificante inteira do gene *TP53* foi avaliada, incluindo as regiões flaqueadoras não-transcritas. Este seqüenciamento incluiu 183

polimorfismos ou SNPs. Num segundo momento foi realizada a avaliação em um grupo controle brasileiro, pois os dados fornecidos nos bancos de polimorfismos ou em informações existentes no *HapMap* para populações específicas dificilmente refletiria a variedade étnica de nossa população. O grupo controle foi composto por pacientes provenientes de Porto Alegre, que tem uma população heterogênea proveniente de várias regiões e que reflete a heterogeneidade genética encontrada na população brasileira. Nossa intenção era diferenciar o R337H de SNPs que pudessem ser específicos a população brasileira e que não houvesse sido descritos previamente.

Baseado nesta série de 183 polimorfismos, um grupo de 29 TAG SNPs que compreendem todo o gene *TP53* gene (incluindo o promotor, 24179 bp) foi escolhido, aqueles que apresentavam uma frequência alélica mínima de 0,04. Este grupo de polimorfismos permite a identificação de 56 diferentes haplótipos, sendo nove destes frequentes na população controle brasileira.

Genotipamos doze indivíduos provenientes de oito famílias aparentemente não-relacionadas e portadores da mutação R337H para os 29 Tag SNPs, objetivando avaliar se todos apresentavam o mesmo haplótipo. Os resultados revelaram que todos os indivíduos portavam o haplótipo H3.

O H3 é o terceiro haplótipo mais frequente na população em teste, com uma frequência de 0,077. O H3 difere do haplótipo mais frequente da população em geral, o H1, pela variação C>T no rs9894946, localizado na região extra-gênica 3' não traduzida do gene *TP53*. Esta região não foi avaliada pelos marcadores polimórficos escolhidos por Ribeiro em 2001 ou Pinto em 2004.

Como todos os outros SNPs eram idênticos entre H3/H1 e havia apenas a variação C>T no rs9894946, decidimos realizar um PCR alelo-específico e posterior ao sequenciamento. Isto foi possível, pois a distância entre o R337H e o SNP28 era

pequena e possibilitou demonstrarmos que o R337H está presente somente no haplótipo que apresenta o genótipo T (e não o C) no SNP28. Assim, pudemos confirmar a existência de um efeito fundador entre estes nove indivíduos avaliados, pois as chances de uma aquisição independente da mutação R337H no mesmo haplótipo pouco freqüente são insignificantes ($3,8 \times 10^{-6}$).

Outras análises realizadas nos grupos de populações do *HapMap*, incluindo caucasianos, africanos de origem Yoruba e asiáticos de origem chinesa Han demonstraram que o haplótipo H3 é tipicamente caucasiano e que foi originado a pelo menos 10 000 anos, após a separação dos caucasianos dos ramos africanos e asiáticos.

5.2.2 Origem da R337H: hipótese histórica e a rota dos tropeiros

No Brasil, a presença da mutação germinativa do códon 337 (c.1010 G>A, nucleotídeo genômico 17588) foi detectada em indivíduos relatados como não-aparentados. A ancestralidade comum destes indivíduos foi confirmada com a determinação da presença do mesmo haplótipo H3. Após o relato da família Y12, decidimos buscar na história do Brasil uma possível explicação para a disseminação desta mutação.

As famílias R337H no Brasil se distribuem principalmente ao longo do eixo da rodovia entre as cidades de São Paulo e Porto Alegre, separadas por mais de 1.200 Km; esta rodovia é historicamente conhecida como a principal rota usada pelos mercadores de origem portuguesa nos séculos XVIII e XIX (Figura 18).

Figura 18: Distribuição geográfica das famílias R337H e rota histórica dos tropeiros.

A ocorrência de uma mutação fundadora na população etnicamente heterogênea do sudeste e sul do Brasil é sugestiva de que circunstâncias históricas e demográficas específicas tiveram um papel na disseminação da mutação. O desenvolvimento de assentamentos no sul do Brasil ocorreu entre os séculos XVII e XIX, ao largo do eixo da rodovia conhecida como “Estrada dos Tropeiros” (Del Priori e Venâncio 2006; Kaiser 2006).

Tropeiros eram mercadores itinerantes principalmente de origem portuguesa, que operavam como grupos organizados que partiam de São Paulo e seguiam até Porto Alegre, retornando em seguida para São Paulo, em expedições que duravam entre seis meses a um ano. Portanto, nós sugerimos que o R337H possa ter se espalhado na área no período de abertura da Estrada dos Tropeiros e formação de muitas cidades e vilarejos. O antepassado fundador era possivelmente de origem portuguesa. De fato, apenas uma única portadora da mutação R337H foi identificada fora do Brasil, na França (Bougéard et al. 2001). A paciente era uma criança brasileira

de oito anos, com ADR. Após haplotipagem do seu DNA foi identificado o mesmo haplótipo 3 brasileiro. No entanto, após a busca ativa nos três principais centros portugueses de Oncogenética, nenhum caso de LFS/LFL foi relatado como portador da R337H.

A área de distribuição da R337H é o sul e o sudeste, regiões mais populosas do Brasil, com mais de 105 milhões de habitantes. Desta forma, esse alelo está possivelmente presente em 300 000 indivíduos. O R337H representa uma situação única na qual a mutação fundadora persistiu em uma população grande e heterogênea graças às suas características moleculares e penetrância condicional, e não em decorrência da segregação cultural ou geográfica.

5.2.3 Paradoxo da persistência de uma mutação deletéria em uma população aberta

Como existe a ocorrência tardia dos tumores devido ao fator protetor do PIN3, essa população pode sobreviver e deixar descendentes, diferente das outras famílias LFS nas quais verificamos uma antecipação na idade de acometimento de tumores e com isso as famílias só duram poucas gerações.

Recentemente, nós determinamos a prevalência de R337H em 750 mulheres saudáveis que participavam de um programa de triagem de câncer de mama na área de Porto Alegre. R337H foi detectada em duas participantes, sugerindo uma frequência alélica de 0,0015. As duas portadoras relataram uma história familiar de câncer em familiares e ao realizarmos o heredograma de ambas verificamos que se tratava de parentes distantes da mesma família (Palmero et al. 2008). A frequência estimada da LFS/LFL na população geral é aproximadamente 1 a cada 5.000, com mutações em

TP53 espalhadas por 100 códons, apenas poucas delas representando mais de 5% de todas as mutações (Lalloo et al. 2003). Portanto, a frequência alélica de R337H na população do Sul do Brasil é cerca de 15 vezes mais alta que qualquer outra mutação isolada em *TP53* associada com a LFS. Desta forma, a possível presença de até 300 000 indivíduos o torna um dos alelos mais frequentes de predisposição de câncer, similar às três mutações fundadoras Ashkenazi em *BRCA1* e *BRCA2* (ROA et al. 1996).

A existência de efeito fundador já foi descrita em algumas síndromes hereditárias. Nas SPHC, o exemplo mais representativo é o da população Ashkenazim, que apresenta três mutações fundadoras, sendo duas no gene *BRCA1* e uma no gene *BRCA2*, que estão presentes em até 2,5% desta população. Frente a população mundial, estima-se que até 100 000 indivíduos são portadores e têm um risco de até 85% para o desenvolvimento de câncer de mama e de até 60% para câncer de ovário (Tonin et al. 1995; Roa et al. 1996). A ocorrência de uma mutação fundadora no gene *CDH1* (E-Caderina) foi encontrada em famílias provenientes de Newfoundland, na Columbia Britânica, e com diagnóstico clínico da síndrome do câncer gástrico hereditário difuso (Kaurah et al. 2007). Estes exemplos correspondem a populações caracterizadas pelo isolamento geográfico ou sociocultural. Nestas populações, a persistência da transmissão de uma mutação deletéria é facilitada pelas sucessivas gerações as quais apresentam elevado grau de endocruzamento. A mesma situação não se aplica a população do sul e sudeste brasileiro, que é uma população miscigenada e originária de diversos povos que imigraram da Europa, Ásia e África em diferentes momentos.

Duas explicações podem ser propostas para explicar a razão da persistência do R337H no país. Inicialmente a mutação pode ter sido introduzida em uma época na

qual a colonização estava sendo realizada pelos europeus e a população ainda estava estabelecendo-se e era pequena. Os tropeiros partiam em longas viagens, que chegavam a durar mais de seis meses, e paravam a cada 30 km para passar a noite. Assim, existe a possibilidade que ao longo da rota percorrida, o indivíduo no qual a mutação se originou possa ter deixado herdeiros da mutação. Neste caso, a mutação poderia ter-se propagado a um número grande de descendentes que em poucas gerações se disseminaria por toda região.

A outra hipótese, já abordada previamente, propõe que a persistência e a transmissão da mutação possam ter sido facilitadas pelo fato de que a penetrância em adultos jovens é de apenas 15 a 20%, permitindo que os portadores chegassem à idade de reprodução saudáveis e livres do câncer.

A mutação germinativa R337H pode ainda ter uma propriedade biológica que confira uma vantagem seletiva aos portadores. Já foram descritos exemplos de variantes genéticas deletérios que levam a vantagens seletivas em contextos específicos, como o verificado na anemia falciforme e a mutação no gene da metaglobina que causa anemia severa em portadores homozigotos. No entanto, em heterozigotos, a mutação pode ser altamente protetora em relação à malária. Desta forma, em regiões endêmicas da malária, até 40% da população é portadora de um dos alelos mutados (Wambua et al. 2006). No presente, a existência de vantagem seletiva a partir da mutação R337H ainda é apenas especulativa.

5.2.4 Desafios no manejo das famílias R337H da população do sul e sudeste brasileiro

A natureza condicional de R337H é compatível com a variedade de padrões familiares de tumor, desde o espectro limitado (como aquelas apenas com ADR na infância), até um espectro mais amplo típico de LFS/LFL em certas famílias. Essas variações dificultam a determinação do risco individual de câncer em portadores de R337H, e constituem um desafio para aconselhamento e monitoração. Estudos sobre modificadores genéticos e outros determinantes de risco são necessários para se estabelecer o acompanhamento apropriado e flexível, e as estratégias de manejo clínico. Devido ao número limitado de famílias LFS/LFL e a variedade de tumores ocorridos na síndrome, torna-se difícil definir a melhor conduta a ser tomada e as famílias devem ser acompanhadas caso a caso. O acompanhamento destes pacientes em longo prazo trará respostas sobre o manejo das famílias.

5.3 Padrão tumoral em portadores R337H

5.3.1 Aspectos clínicos e risco de câncer em portadores R337H: muito além dos tumores adrenocorticais

A multiplicidade de tumores relacionados à mutação germinativa R337H na LFS/LFL foi demonstrada em 2007 pelo trabalho realizado em nosso grupo (Achatz et al. 2007). Diferentemente do que havia sido descrito por Ribeiro et al. em 2001, tumores adrenocorticais são apenas um dos tumores descritos na síndrome. O impacto desta informação é muito grande para portadores desta alteração, pois demonstra que

portadores estão suscetíveis não só ao ADR infantil, mas a vários outros tumores que podem desenvolver-se ao longo da vida. Além disso, portadores estão ainda suscetíveis ao desenvolvimento de múltiplos tumores primários, o que quer dizer que mesmo as crianças que apresentaram ADR na infância têm risco para o desenvolvimento de outros tumores ainda na infância, na adolescência ou idade adulta.

O acompanhamento das famílias portadoras da mutação R337H mostrou-nos que estes pacientes devem ser acompanhados e rastreados semestralmente para tumores. Foram detectados tumores a partir do rastreamento por métodos de imagem. Um tumor foi diagnosticado em um portador de mutação no domínio de ligação ao DNA. Três casos de carcinoma papilífero de tireóide foram detectados precocemente a partir de ultrassonografia de tireóide seguida de punção aspirativa do nódulo detectado. Dois casos de câncer de mama foram detectados em portadoras: um deles foi um carcinoma ductal “*in situ*” aos 32 anos, que, por ter sido detectado precocemente, apresentou bom prognóstico. Um carcinoma ductal invasivo grau 3 foi detectado em uma portadora assintomática da família Y27 de 37 anos. A paciente não aderiu ao rastreamento e retornou ao nosso serviço dois anos após o diagnóstico molecular da mutação R337H, apresentando em tumor de oito centímetros de diâmetro em mama E, com a presença de dois linfonodos palpáveis, endurecidos e imóveis em axila esquerda.

Este exemplo ilustra alguns aspectos relacionados às dificuldades encontradas no aconselhamento genético para portadores da mutação R337H. Primeiramente, a penetrância da mutação R337H chega a 80% até os 70 anos, como demonstrado na Figura 15, e a ocorrência de tumores pode ser na idade adulta, sendo assim necessário o rastreamento de todos os portadores independente da idade. Em seguida, é

importante notar que apesar da paciente ter sido submetida ao aconselhamento genético pré e pós-teste e ter demonstrado compreensão sobre o risco, não aderiu ao acompanhamento e rastreamento. Assim, é de suma importância a compreensão do impacto que representa o recebimento do resultado positivo para uma mutação que leva ao alto risco para o desenvolvimento de tumores. Estes pacientes devem preferencialmente ser acompanhados por psicólogos que proporcionem o apoio necessário além do aconselhamento. O aconselhamento é um processo contínuo e a periodicidade deste acompanhamento é fundamental. Este fato, associado ao relacionamento e vínculo de confiança que os pacientes desenvolvem com a equipe multidisciplinar que faz o acompanhamento, levam a maior chance de sucesso no rastreamento necessário frente à síndrome.

5.3.2 Aspectos moleculares e propriedades bioquímicas do R337H

Estudos bioquímicos mostraram que a mutação R337H se localiza em uma alfa-hélice crítica para a estabilidade de dímeros da proteína p53 (Digiammarino et al. 2002). A arginina 337 tem um papel na doação da ligação de hidrogênio (para D352) que estabiliza a dimerização. A substituição da Arginina por Histidina nessa posição resulta em sensibilidade ao pH para doação da ligação de hidrogênio, correlacionando com o estado de protonação da Histidina. Uma pequena mudança no pH dentro da faixa fisiológica de 7,5 para 8,0 leva ao desdobramento do dímero, prevenindo por conseguinte uma ligação de DNA de alta afinidade e, presumivelmente, a atividade de transcrição da p53. Apesar de fatores que regulam a dinâmica da dimerização da p53 e sua dependência do pH ainda serem desconhecidos, esta característica molecular poderia explicar o caráter condicional de R337H. A inativação completa de R337H

poderia necessitar co-fatores, tais como genes modificadores ou mudanças no ambiente intracelular, que poderiam impactar a estabilidade do dímero da p53. Portanto, R337H representa um paradigma para uma mutação com penetrância condicional. Esse conceito explicaria porque, no heredograma apresentado na Figura 13, alguns indivíduos com mutação não desenvolveram câncer, incluindo um paciente que aos 93 anos permanece assintomático, enquanto o paciente-índice desenvolveu várias lesões primárias.

5.3.2.1 Hipótese sobre o espectro tumoral apresentado nas famílias R337H

O códon 337 pertence a uma região do gene *TP53* que codifica o domínio de oligomerização. Menos de 2% de todas as mutações em *TP53* descritas até 2004 ocorreram neste domínio, tanto germinativas como somáticas. Existem evidências funcionais de que a mutação R337H é patogênica e que leve ao fenótipo LFS/LFL (Kato et al. 2003; Varley et al. 2001). Desde a identificação inicial deste mutante em 2001 por Ribeiro et al., o R337H atraiu muito interesse, principalmente de pesquisadores da área da biologia estrutural e entre os bioquímicos.

Os primeiros experimentos realizados pelo grupo de Ribeiro em culturas de células mostraram que o p.337 da proteína p53 se comportava como “*wild-type*”, ou seja, tinha sua função preservada. Em 2003, Digiammarino et al. desenvolveram um ensaio para avaliar o efeito mutagênico desta proteína 337H. Os estudos conduzidos foram exclusivamente estruturais e bioquímicos, indicando que R337H formava oligômeros somente se houvesse condições de pH específicas.

Em pH 7, a proteína se comportaria como “*wild-type*” p53 e formaria pontes de hidrogênio adequadas entre dois monômeros de p53. Em pH 8, a Histidina que

substitui a Arginina no p.R337H fica parcialmente desprotonada e isso impossibilita a doação de próton necessária para a formação da ponte de hidrogênio com o resíduo D352 no outro monômero (Figura 7A) Assim, o dímero de moléculas de p53 não poderia manter-se estruturalmente, impedindo a formação do tetrâmero. Apesar da proteína R337H permanecer idêntica à proteína “*wild-type*”, com os domínios de ligação ao DNA e de transativação intactos, ficaria impossível a formação do tetrâmero que é a conformação que possibilita a p53 ter afinidade ao DNA e agir como fator de transcrição.

Desde a sua descoberta, acreditava-se que p.R337H pudesse ser pH-dependente *in vivo*, com atividade biológica ou inativo conforme as alterações de pH intra-celular. Assim, a partir do estudo de Ribeiro, poderia-se concluir que p.R337H perderia a sua atividade apenas em células e tecidos nos quais ocorresse alterações no pH que chegassem ao pH 8 ou mais, enquanto que nas outras permaneceria com a sua função preservada.

No entanto, pouco se sabe sobre as alterações de pH em células. Alguns fatos são conhecidos, como o aumento de pH celular durante a apoptose, quando a célula pode aumentar seu pH até 8,5 ou mais. Digiammarino et al. (2003) sugeriram que tais trocas poderiam contribuir para o desligamento da função de p.R337H e assim diminuindo a apoptose. Este fato resultaria na manutenção de *pools* de células anormais que teriam sido eliminadas caso a p53 estivesse intacta durante o remodelamento do órgão. A supra-renal, ou glândula adrenocortical, é um órgão no qual ocorre remodelamento perinatal a partir de apoptose e a persistência deste *pool* de células anormais predisporia ao aumento de risco para ADR precoce.

Atualmente, faltam dados experimentais *in vivo* que confirmem esta hipótese. Não existe evidências que p.R337H previna apoptose de forma pH-dependente. Além

disso, não há evidência de que indivíduos portadores de mutação R337H no gene *TP53* tenham uma glândula adrenocortical maior ou com a presença de massas. Não existe sequer uma prova direta de que o pH seja efetivamente o gatilho biológico da inativação da proteína p.R337H. Estudos experimentais mais aprofundados utilizando linhagens celulares são necessários para a descrição das condições nas quais a p.R337H muda da sua forma ativa para inativa. Em particular, seria de grande interesse a determinação da magnitude da resposta supressora de p53 induzida por este mutante após diferentes formas de estresse genotóxico.

A atividade de condicional da p.R337H pode fornecer a base para a compreensão da tendência apresentada por este mutante de aumentar o risco para alguns tumores característicos da LFS. A atividade variável da p.R337H seria possível de ser compreendida se o risco para todos os outros cânceres do espectro LFS fosse diminuído, como ocorre quando há mutações na região de “*hotspot*”. No entanto não é o que verificamos nas famílias brasileiras que apresentam um espectro tumoral semelhante ao de outras mutações germinativas em *TP53* (Achatz et al. 2007). Além disso, há uma maior incidência de câncer de tireóide e renal nas famílias brasileiras portadoras da p. R337H, demonstrando que em certos tecidos este mutante possa ter um efeito mais pronunciado do que as mutações no “*hotspot*” de *TP53*. Este é um aspecto que ainda não foi suficientemente bem estudado ou compreendido e que poderia ser abordado a partir do desenvolvimento de um modelo animal ou cultura celular que ajudaria a resolver este paradoxo.

5.3.2.2 O conceito de penetrância condicional do mutante R337H

O estudo das famílias brasileiras com a mutação R337H demonstrou uma grande variedade de tumores apresentados pelos portadores. Dentro de uma mesma família, foram detectados indivíduos que eram portadores assintomáticos e que permaneceram sem a manifestação de tumores até uma idade avançada (Figura 13). Em uma mesma família foram detectados dois pacientes portadores do mutante R337H que aos 93 e aos 77 anos continuam assintomáticos, enquanto outros apresentaram tumores em diversas idades. Este fato indica que a mutação R337H isoladamente não confere um risco semelhante aos outros mutantes do gene *TP53*, pois nesta família não se verificou a penetrância esperada de 90% até os 60 anos. Outros fatores pessoais devem ser críticos no desenvolvimento de câncer nos portadores. Entre os possíveis fatores envolvidos, podem-se considerar fatores genéticos e epigenéticos. Modificadores epigenéticos são mais difíceis de avaliar, pois incluem a interação com o ambiente (estilo de vida, dieta e fatores ambientais) assim como fatores psicológicos que modulariam a atividade da proteína R337H.

Buscamos abordar esta questão através da análise de possíveis modificadores genéticos, os polimorfismos PIN2, PIN3 e PEX4 de *TP53* e do SNP 309 de *MDM2*. Estes dados serão discutidos na próxima sessão. Buscamos ainda modificações relacionadas a dois polimorfismos mais frequentes do gene *AKT*, porém após a avaliação inicial, nenhum resultado mostrou ser estatisticamente significativo.

Desta forma, uma série de fatores “condicionais” pode ser necessária para que o mutante R337H exerça sua função deletéria aumentando efetivamente o risco para o câncer. Este conceito pode ser nomeado como “penetrância condicional”. O termo penetrância parcial é bastante conhecido e comumente utilizado para definir mutações

que podem não resultar no mesmo fenótipo apesar de terem o mesmo genótipo. Além disso, na penetrância parcial pode-se verificar um fenótipo leve devido à inativação muitas vezes parcial da proteína. A mutação condicional difere da parcial pelo fato de que o fenótipo pode diferir inteiramente de uma família portadora para outra, mesmo frente à mesma mutação. O mutante condicional vai reter certo grau de atividade que irá diferir conforme os fatores condicionais e não de acordo com a própria mutação. Assim, estudos futuros serão necessários para determinar as condições que irão modular a penetrância de R337H. A monitoração destas condições é fundamental para a predição dos fatores de risco individuais e familiares envolvidos. É importante notar que, no caso de condições epigenéticas, a detecção destes fatores pode fornecer a possibilidade da identificação precoce dos mesmos e identificação do risco antes mesmo do diagnóstico precoce de lesões malignas.

5.4 Impacto populacional do mutante R337H: consequências para a saúde pública brasileira

5.4.1 Possível contribuição para o risco geral de câncer nas regiões sul e sudeste do Brasil

Frente à prevalência estimada do R337H na população do sul e sudeste brasileiro neste estudo, pode-se considerar que portadores desta mutação são freqüentes na população geral, chegando a até 0,3% da população desta região (Piovesan 2006, Palmero et al. 2008) Considerando uma população total de aproximadamente 100 000 000 nas regiões sul e sudeste brasileiro, podem existir até 300 000 portadores nesta população. O alto número de portadores na população indica

que o R337H pode ser um fator determinante na ocorrência de câncer nesta área. Assim, pacientes que aparentemente não tem história familiar de câncer e que são diagnosticados com câncer esporádico podem, na verdade, ser portadores do R337H.

A ausência de história familiar pode ser devido à insuficiência de informação dos familiares ou mesmo falta de documentação dos tumores existentes na família. A experiência que tivemos acompanhando as 91 famílias LFS/LFL mostrou que apenas a minoria consegue expor na primeira consulta detalhes sobre os cânceres ocorridos nas famílias. Normalmente são indivíduos que tiveram tumores em idade atípica ou que já apresentaram múltiplos tumores e por este motivo foram encaminhados à avaliação oncogenética. Uma pequena parcela dos pacientes assintomáticos vem referindo os múltiplos casos de câncer ocorridos na família.

A alta ocorrência de ADR na população de sul e sudeste leva a suspeita de que o R337H eleve mais o risco para determinados tumores do que para outros. As estimativas sugerem que a incidência de ADR devido ao R337H possa chegar a 0,2-0,3/100 000/ano. Como a ocorrência no estado do Paraná é desta magnitude, pode-se inferir que possivelmente todos ADR ocorridos neste estado tenham ocorrido em portadores do R337H.

5.4.2 R337H: um caso para triagem neonatal?

Estudos preliminares sobre a mutação R337H em *TP53* demonstraram aumento de risco específico para ADR, afetando crianças a partir dos 12 meses, com uma penetrância de até 10% aos 12 anos (Ribeiro et al. 2001; Figueiredo et al. 2006). No entanto, a averiguação mais criteriosa de famílias com essa mutação mostrou que o risco de câncer é muito mais amplo e engloba o espectro completo de tumores

associados com a LFS (Figueiredo et al. 2006). A alta frequência de portadores da mutação R337H de *TP53* é compatível com aquela observada em portadores de mutações germinativas *BRCA1* e *BRCA2* em indivíduos não Ashkenazi (1:300-1:600) e com a mutação comum K304E no gene *MCAD*, associado à deficiência de acil-CoA desidrogenase de cadeia média (1:100-1:200). O teste para essa última foi introduzido recentemente em programas de triagem neonatal da Austrália, Alemanha, Estados Unidos e Reino Unido. A alta prevalência populacional dessa mutação no sul do Brasil levou, em 2005, à implantação de triagem neonatal sistemática no estado brasileiro do Paraná (Piovesan 2006).

Triagem genética neonatal tem implicações clínicas, éticas e sociais importantes (Anexo 8). Em 1968, Wilson e Jungner formularam um número de critérios claros para o estabelecimento de uma estrutura para o desenvolvimento de programas de triagem neonatal. Frente às evidências médicas e científicas disponíveis atualmente no alelo mutante R337H de *TP53*, observamos que vários desses critérios são preenchidos. Primeiramente, câncer é um problema de saúde significativa que é tratável e, frequentemente, curável, se detectado em estágio inicial. Segundo, de acordo com estimativas atuais, a mutação R337H está presente em uma fração significativa da população do sul do Brasil. Estudos pilotos de prevalência nos estados do Rio Grande do Sul e Paraná detectaram frequências na faixa de 0,3% em ambos estados. No entanto, a prevalência fora dessas áreas, e também sua variação entre comunidades e grupos étnicos, não é conhecida. Terceiro, o teste é relativamente fácil de realizar (avaliação da mudança de um único nucleotídeo no códon 337), usando uma amostra mínima de sangue e procedimentos que não causam desconforto significativo para os recém-nascidos e famílias. Quarto, os benefícios de curar câncer naqueles indivíduos que desenvolvem ADR devido a um diagnóstico precoce são

enormes quando comparados com os custos de triagem. Com base em estimativas atuais de penetrância relacionada à idade, a ocorrência de câncer em idade precoce devido a R337H pode representar 5 a 10% de todos os cânceres em crianças e jovens adultos na população, e até 1-5% de todos os cânceres antes dos 70 anos.

Em contraste, também fica claro que vários critérios não são atingidos, não apenas devido ao conhecimento insuficiente sobre a história natural da doença, mas também à natureza do teste, que identifica uma mutação de predisposição a câncer, mas não detecta de fato a fase pré-clínica da doença. Primeiramente, estudos em famílias portadoras da mutação R337H com propensão a câncer mostram que o risco individual de câncer é extremamente variável e portadores adultos não-afetados por câncer foram identificados. Há evidência de que características genéticas diferentes agem como modificadores de penetrância, incluindo o SNP309 *MDM2* e os polimorfismos no gene *TP53*, como o PIN3. Portanto, o conhecimento atual é insuficiente para afirmar com precisão o risco individual de câncer baseado unicamente na detecção da mutação R337H. Na ausência desse conhecimento, e em vista das evidências existentes, indivíduos que portam a mutação devem ser acompanhados durante toda a vida para um risco significativo de cânceres múltiplos. A identificação da mutação por si só não pode ser diretamente correlacionada com uma fase pré-clínica.

5.4.3 Perspectivas futuras no manejo do alto impacto populacional do R337H

Indivíduos positivos para mutação devem ser encaminhados para acompanhamento médico com protocolos específicos para detectar câncer em estágio inicial. No entanto, a faixa e amplitude dos protocolos aplicáveis em indivíduos Li-

Fraumeni ainda são discutíveis. Normas de conduta atuais são baseadas em acompanhamento clínico anual com exames de imagem (mamografia, colonoscopia) quando apropriado. Um estudo recente mostra que a visualização do corpo inteiro por Tomografia de Emissão Pósitron (*PET-CT*) em portadores de mutações germinativas de *TP53* (que não R337H) pode detectar lesões cancerígenas incipientes, pré-clínicas (Masciari et al. 2008). No entanto, no caso da mutação R337H, não há no momento informação disponível para determinar quais são os enfoques e o método apropriados para monitoração e acompanhamento custo-efetivo em portadores. Além disso, a dose radiativa relacionada à realização do exame é grande e apesar de corresponder ao aceitável para a população, pode ser demasiada para LFS/LFL devido ao risco relacionado à exposição. Uma triagem neonatal poderia estar associada ao risco psicológico e social considerável nos indivíduos “selecionados” e em suas famílias, uma vez que o impacto e conseqüências precisos de um resultado positivo ainda não estão bem definidos. As normas de conduta atuais na LFS/LFL não recomendam testar recém-nascidos ou crianças. Não há um procedimento claro para controlar o uso e disseminação da informação dos resultados da triagem, ou tampouco para fornecer uma estrutura de aconselhamento de quando o resultado da triagem será informado aos indivíduos e qual será o conteúdo da informação referente ao risco cumulativo de câncer ao longo da vida. O conhecimento de portar uma mutação deletéria em *TP53* pode ter um impacto psicológico profundo, como também efeitos negativos na integração social. A implantação de um teste em programas de triagem neonatal obrigatórios deveria começar com a demonstração da validade clínica (o teste identifica corretamente risco de doença futura) e utilidade clínica (uma normalização de intervenções eficazes na redução do risco e/ou melhora na saúde daqueles com resultados positivos) do teste.

Nós concluímos que, no presente contexto de conhecimento científico, a mutação R337H não preenche os critérios apropriados para triagem neonatal de massa fora da avaliação abrangente de risco de câncer familiar, e que programas de triagem e aconselhamento baseados exclusivamente no risco de ADR na infância são insuficientes, dado o amplo espectro potencial de cânceres adultos associados com a mutação.

É de grande importância o aumento na atenção, informação e treino da comunidade médica para identificar melhor as famílias com alto risco de câncer, e encaminhá-las para programas estruturados de avaliação de risco de câncer, para uma determinação detalhada dos padrões de câncer hereditário. Devida à alta prevalência da mutação R337H, a disponibilização do teste aos demais membros da família deve ser considerado como uma alternativa. Finalmente, testes genéticos preditivos em recém-nascidos e/ou crianças em famílias R337H já diagnosticadas poderiam ser considerada caso a caso. No entanto, aconselhamento e monitoração deveriam levar em consideração o conhecimento atual sobre a idade e a penetrância da mutação conforme o tipo tumoral, que varia de diagnóstico de casos únicos a famílias com o espectro completo de Li-Fraumeni, e também as limitações e habilidades de predizer, nos portadores, quem desenvolverá câncer e quando. Permanece essencial concentrar esforços na determinação do risco de câncer associados com a presença de R337H, e de identificar modificadores de sua penetrância.

5.5 Revisão da definição e diagnóstico clínico da LFS/LFL: Consórcio Internacional da LFS, IARC, Lyon.

5.5.1 LFS/LFL: um diagnóstico clínico ou molecular?

Nos 45 anos após a descrição inicial da LFS, de 1969 até 2005, apenas 280 famílias foram descritas e registradas no mundo inteiro. Nos três anos seguintes, entre 2005 e 2008, 119 novas famílias foram descritas com diagnóstico clínico e/ou molecular da LFS/LFL. Este aumento no registro das famílias deve-se a dois fatores principais: (1) grande número de famílias brasileiras incluídas após o início deste estudo; (2) maior número de famílias diagnosticadas devido ao maior conhecimento da síndrome por parte dos médicos e consciência de que se trata de uma síndrome sub-diagnosticada.

Uma das maiores dificuldades encontradas por parte dos médicos é a dificuldade no diagnóstico acurado da síndrome. Frente aos diversos critérios diagnósticos existentes, várias perguntas surgem: (1) qual é o melhor critério a ser utilizado? (2) devem-se utilizar todos os diferentes critérios? (3) como aplicá-los corretamente em famílias pequenas, mas com tumores típicos?

Frente a essas questões, o Dr. Pierre Hainaut propôs a 14 especialistas a realização de um Simpósio Internacional sobre a LFS, em novembro de 2007, para informação e atualização da população científica sobre o estado atual da LFS/LFL no mundo. No simpósio os diferentes grupos que trabalham com a LFS/LFL, provenientes das universidades de Harvard e Cornell nos Estados Unidos, Universidade de Toronto no Canadá, da Universidade de Rouen, França, da Universidade de Manchester, na Inglaterra, universidade da Malásia, na Malásia, da

Universidade Federal de Porto Alegre e do Hospital A.C. Camargo no Brasil. Os grupos puderam expor os trabalhos mais recentes executados pelos seus grupos. Nosso grupo apresentou a presença do efeito fundador recentemente descrito, além da alta prevalência do mutante R337H na população do sul e sudeste do país. O simpósio foi seguido de um grupo de trabalho, no qual foram discutidas questões relacionadas ao diagnóstico e manejo da síndrome e medidas a serem tomadas para a difusão do conhecimento da síndrome no mundo. Um documento contendo estas informações está sendo redigido em forma de artigo científico e será enviado para publicação em breve.

5.5.2 Revisão da definição LFS/LFL: *Lyon Consensus Criteria*

Durante o consórcio, várias medidas relacionadas ao manejo da síndrome foram discutidas. Uma das principais decisões tomadas foi a de que o critério de maior sensibilidade era o critério modificado de Chompret e que este deveria ser definido como o principal critério a ser utilizado no diagnóstico da síndrome. No entanto, algumas considerações foram feitas e adaptações foram necessárias frente às diferentes experiências dos pesquisadores presentes. O relato de diferentes grupos indicou a alta incidência de dois tipos de tumores raros na população: rabdomiosarcomas embrionários em crianças e carcinomas de plexo coróide. A revisão do critério modificado de Chompret foi realizada com o intuito de detectar o maior número de famílias que possam ter o alto risco para o desenvolvimento de tumores característico das mutações germinativas no gene *TP53* (Frebourg et al. 2008). As alterações propostas pelo consórcio incluíram um novo item, no qual pacientes com rabdomiosarcoma embrionário ou carcinoma de plexo coróide antes

dos cinco anos de idade devem ser considerados como pacientes com diagnóstico clínico da LFS e que são elegíveis para o teste molecular. Estes tumores foram incluídos frente à alta prevalência em portadores da síndrome e a relativa raridade na população mundial.

5.6 Modificadores de mutações no *TP53*: impacto dos polimorfismos genéticos como modificadores de penetrância

Nosso estudo avaliou três polimorfismos intragênicos de *TP53*, localizados em uma porção pequena do gene entre o íntron 2 e o éxon 4. A análise demonstrou que um deles, PIN3, teve impacto modificador em mutações germinativas no gene *TP53*.

5.6.1 PIN3: regulador fundamental na idade de acometimento

PIN3 apresentou impacto modificador e este resultado foi observado nas diferentes mutações germinativas detectadas nas famílias brasileiras, independente da sua localização. No entanto, o efeito foi mais pronunciado em relação à idade de acometimento dos tumores, sendo verificado em todos os tumores do espectro LFS. Indivíduos portadores do polimorfismo em um dos alelos, a partir da duplicação de 16 pares de base nesta região, desenvolvem tumores 17,1 anos mais tarde do que aqueles que não têm a duplicação, sendo este resultado estatisticamente significativo. Assim, em portadores da mutação com a duplicação presente, verifica-se quase que exclusivamente tumores na idade adulta (Figura 15A). A presença do polimorfismo em indivíduos não portadores da mutação em *TP53* e com diagnóstico clínico da síndrome não influencia a idade de aparecimento de tumores (Figura 15B). Este pode

ser considerado como efeito modificador importante, já que PIN3 não tem efeito em não portadores de mutação em *TP53*.

No entanto, é importante que esses dados sejam verificados em um número maior de portadores de mutações germinativas no gene *TP53* para confirmar esta associação. Estudos que analisem grupos maiores de cada tipo de tumor em portadores e em não portadores de mutações germinativas em *TP53* podem determinar a real implicação deste modificador. Nossos resultados sugerem que estudos realizados sobre PEX4 deveriam ser revisitados e os efeitos de PIN3 avaliados nos diferentes grupos, pois este pode ser responsável por parte dos resultados obtidos que demonstram efeito modificador de risco para o PEX4, no códon 72 do gene *TP53*.

Os resultados deste estudo sugerem que a ocorrência do alelo selvagem (não-duplicado) no mesmo alelo em que a mutação está presente é fundamental. Neste estudo, todos os alelos mutantes eram portadores do genótipo PIN3 N. Esta pode ser uma explicação de porque não encontramos casos PIN3 D/D homozigotos na população brasileira portadora de mutações germinativas em *TP53*.

O polimorfismo PIN3 está localizado no íntron 3, um dos menores íntrons do gene *TP53*, que fica na região do gene envolvida com a produção da porção N-terminal da proteína p53. O polimorfismo consiste na repetição de 16 pares de base, seqüência essa rica em bases G-C. Estudos recentes mostraram que esse polimorfismo tem papel regulatório importante no processamento do mRNA de *TP53* e na produção da proteína p53. A estrutura de 16 pb se dobra em uma estrutura terciária de pré-mRNA, formando um G-quadruplex, ou quarteto G. Em estudo recente conduzido no laboratório do Dr. Pierre Hainaut (IARC), foi verificado que a localização e estabilidade do quarteto são diferentes dependendo da presença ou não do alelo

duplicado (Marcel et al. 2008 - Anexo 9). Esta estrutura regula a ligação dos fatores responsáveis pelo processamento o qual resulta na excisão do íntron 2. Possivelmente o efeito ocorre nesta região, pois o íntron nesta parte é extremamente pequeno, com o polimorfismo PIN 3 localizado a menos de 50 pb do sitio receptor de processamento (*splicing*) do íntron 2. A retenção do íntron 2 introduz na seqüência diversos códons de parada a jusante, ou *downstream* em relação ao primeiro códon de iniciação. Esse mRNA não possibilita a formação da proteína p53 completa (*full-length*). Ao invés disso, promove a formação de uma proteína truncada que usa outro ATG, localizado na posição 40 no éxon 4 como códon de iniciação. Esta proteína é estável e se liga ao DNA, porém não transativa a expressão gênica devido à falta de 39 resíduos que correspondem exatamente ao domínio de transativação da p53 (Yin et al. 2002; Courtois et al. 2002). Existe evidencia biológica de que esta proteína se comporta como um inibidor da função da p53, através de sua ligação aos promotores que impossibilita a proteínas *full-length* de chegar até o seu domínio de transativação (Gosh et al. 2004; Courtois et al. 2004). Assim, o PIN3 pode ser um polimorfismo que especifica uma função reguladora crítica na atividade da p53. No entanto, os mecanismos de ação ainda precisam ser melhor elucidados.

5.6.2 Polimorfismos intragênicos de *TP53* PIN2 e PEX4

Foi surpreendente notar nos resultados obtidos a partir desta análise que os polimorfismos PIN2 e PEX4 não são modificadores de risco nos portadores de mutações em *TP53* nem em pacientes que não tiveram a detecção da mutação. Um estudo anterior demonstrou que o polimorfismo no códon 72 do éxon 4 era um importante modificador de risco em portadores de mutações germinativas no gene

TP53 (Bougeard et al. 2006). No entanto, baseado em nossos resultados, podemos deduzir que este efeito foi devido a duplicação no íntron 3 (PIN3), a qual não foi considerada no referido estudo.. O grupo de famílias avaliado em nosso estudo demonstrou que tanto PEX4 como PIN2 tem efeito modificador discreto na idade ao diagnóstico, porém este efeito é expressivamente menor do que PIN3. Este efeito, quando analisado em combinação com PIN3, perde seu significado. É importante ressaltar que PEX4 é o polimorfismo mais estudado no gene *TP53* devido a seu impacto na sequência codificante, que codifica a troca de uma arginina por uma prolina no códon 72 do éxon 4. Nossos resultados sugerem que os estudos realizados para a avaliação do PEX4 deveriam ser revisitados, para avaliação do efeito de PIN3 nos diferentes grupos e amostras estudados, pois o mesmo pode ser responsável por parte dos resultados obtidos.

5.6.3 *MDM2* como modificador tumor específico

Os resultados obtidos nesse estudo para o SNP309 do gene *MDM2* estão de acordo com aqueles publicados por Bougeard et al. em 2006. Nós encontramos uma diferença de oito a nove anos na idade ao diagnóstico do primeiro câncer se comparados os portadores dos genótipos T/T em relação aos que apresentavam genótipo T/G. A idade ao aparecimento de tumores relacionados ao SNP309 *MDM2* demonstram que o efeito do polimorfismo tende a ser maior em cânceres em idade jovem do que em tumores de ocorrência tardia.

Para determinarmos se este efeito realmente estava presente, avaliamos separadamente os tumores mais frequentes e representativos da LFS/LFL: sarcomas de partes moles e câncer de mama. O efeito do SNP309 do *MDM2* sobre a idade de

acometimento do câncer de mama foi pequeno e não significativo estatisticamente. Em contraste, no efeito sobre sarcomas de partes moles a diferença foi significativa, com uma diferença de 35,5 anos no aparecimento dos tumores. Logo, em contraste com o observado pela ação do PIN3, *MDM2* SNP309 aparentemente exerce um efeito modificador tumor-específico.

Estudos combinando o *MDM2* SNP309 com PIN3 mostram resultados complexos. O efeito na idade ao diagnóstico para portadores de mutação em *TP53* demonstrou significância estatística: a idade média ao diagnóstico foi a mesma em PIN3 N/N homozigotos que eram portadores tanto dos genótipos de *MDM2* SNP309 T/T como G/T, sugerindo que o efeito do alelo *MDM2* SNP309 T não modera o impacto de PIN3. No entanto, os alelos de *MDM2* SNP309 G não demonstram aceleração do início do tumor em portadores de PIN3 N/D. Ou seja, alelos T de *MDM2* SNP309 em indivíduos heterozigotos para PIN3 podem ter efeito moderador de risco, porém isso não se verifica em indivíduos que não tem a duplicação de PIN3. Este fato sugere um efeito epistático em *MDM2* SNP309, no entanto esta hipótese necessita de um estudo com maior número de indivíduos para chegar a uma significância estatística.

A ausência de genótipos G/G *MDM2* nos pacientes deste estudo foi surpreendente. Esta ocorrência sugere que mutações germinativas em *TP53* e o genótipo G/G de *MDM2* são incompatíveis para o desenvolvimento, levando a perda precoce de embriões em portadores deste genótipo. A perda deve ser bastante precoce, pois não há relatos frequentes de abortamentos nas famílias estudadas. No momento presente, apenas suposições podem ser feitas sobre este efeito. Estudos em camundongos deficientes para o gene *MDM2* demonstraram que este gene tem

importante papel no desenvolvimento. Em camundongos deficientes para tal gene, há perda embrionária precoce devido a apoptose maciça.

Inativação de *TP53* em um camundongo associada à inativação nos dois alelos de *MDM2* (*MDM2-null*) demonstrou viabilidade do embrião, sugerindo que o efeito da inativação de *MDM2* levava a incapacidade de controlar a função de p53 em um momento específico do desenvolvimento embrionário (Oca Luna et al. 1995; Chavez-Reyes et al. 2003). Logo, os dois genes colaboram no desenvolvimento embrionário. Na situação que descrevemos aqui, a combinação letal aparenta ser entre o mutante *TP53* (que tem atividade apoptótica deficiente) e o genótipo G de *MDM2* SNP309, que tem alta expressão da proteína *MDM2*, acarretando assim uma diminuição da função do alelo selvagem de *TP53*. A diminuição do funcionamento do que restou de atividade de p53 tornaria o embrião inviável. É importante ressaltar aqui que até o momento, nunca foi identificado nenhum indivíduo que seja portador de uma mutação germinativa em homozigose em *TP53*.

5.6.4 Modificadores e seu impacto na prática clínica: auxílio nas estratégias de rastreamento e manejo?

Fica claro a partir deste estudo que a determinação da mutação germinativa é apenas o primeiro passo frente à avaliação molecular da LFS/LFL. A existência de diferentes genótipos que irão conferir um atraso no desenvolvimento dos tumores ou o aumento no risco para desenvolvimento dos mesmos tem implicação clínica. No caso de indivíduos assintomáticos portadores da mutação no gene *TP53*, na presença do alelo NN no PIN3, o rastreamento para tumores ADR e o acompanhamento clínico visando o diagnóstico precoce de tumores deve ser iniciado ao nascimento devido ao

alto risco para o desenvolvimento de tumores infantis, superior àqueles que têm a duplicação no *PIN3*. Este acompanhamento pode ser a partir dos 20 anos ou 10 anos antes do tumor mais jovem ocorrido na família.

5.7 Mutações germinativas em *TP53*: quem deve ser testado e por onde começar?

5.7.1 Recomendações para testagem do gene *TP53*

Levando em conta que a população sul e sudeste brasileira é composta em 0,3% de portadores da mutação R337H, é certo que existem muitos indivíduos em risco, portadores da mutação, não detectados. As famílias que devem ser testadas são aquelas que preenchem os critérios para LFS/LFL e que podem ser identificadas depois de uma avaliação detalhada. No entanto, nem todos têm conhecimento sobre suas origens ou contato com seus familiares. Nestes casos, como saber quem são os portadores?

Acreditamos que os seis diferentes critérios existentes para a síndrome, o clássico, o de Birch, os de Eeles 1 e 2, o de Chompret modificado e o do Consórcio, são fundamentais e devem ser verificados sempre que referida história familiar de câncer em uma família proveniente desta região. No caso da ocorrência de tumores isolados, do tipo ADR e rabdomiosarcoma para os tumores infantis e câncer de mama ou colorretal antes dos 36 anos os pacientes devem ser considerados como possíveis candidatos para a síndrome. Chompret sugeriu a inclusão de mulheres jovens com câncer de mama apenas frente à ausência de mutações germinativas detectadas no teste molecular para *BRCA1* e *BRCA2*. Como estes são testes muito caros e que poucos brasileiros podem ter acesso, frente à alta ocorrência da mutação R337H,

propomos que as populações do sul e sudeste brasileiros que apresentem câncer de mama e colorretal antes dos 36 anos sejam sistematicamente rastreados para a mutação R337H após receberem aconselhamento genético.

5.7.2 Manejo de famílias LFS/LFL

No momento, acompanhamos nossos pacientes de acordo com as diretrizes do NCCN. O manejo das famílias LFS/LFL desde o início deste estudo demonstrou vários benefícios para os pacientes. Foram detectados oito cânceres em pacientes em acompanhamento, realizado entre junho de 2005 e junho de 2008. Dentre os oito tumores detectados, seis foram em famílias R337H. A detecção ocorreu principalmente nos pacientes R337H, pois um número maior de portadores desta mutação aderiu ao rastreamento. Todos os pacientes foram imediatamente submetidos ao tratamento das lesões detectadas.

Através da revisão do padrão tumoral na população LFS/LFL brasileira, confirmamos a ocorrência de múltiplos casos de tumores de tireóide e renal. Desta forma, introduzimos a realização semestral de ultrassonografias de tireóide e vias urinárias, devido à alta prevalência destes tumores na população portadora da síndrome em acompanhamento. Como este é um exame efetivo na detecção precoce, pouco invasivo e de baixo custo, mostrou-se como uma estratégia eficaz e necessária em nossa população. Nenhum novo caso de câncer renal foi detectado, no entanto cistos renais de dimensões variadas foram detectados em cinco pacientes.

Atualmente, alguns pacientes estão em acompanhamento por lesões detectadas no rastreamento. Uma paciente de 31 anos, portadora da mutação no códon 213, cujo irmão e a mãe apresentaram câncer renal, foi detectada com lesões císticas renais de

até 40 milímetros. A paciente foi encaminhada ao serviço de cirurgia pélvica, onde prossegue o acompanhamento semestral dos cistos.

Em quatro pacientes portadores submetidos à colonoscopia entre 2007 e 2008, foram detectados pólipos adenomatosos com atipias, a maior parte delas de baixo grau. No entanto, em dois pacientes de 29 e 35 anos, foram verificados pólipos adenomatosos com atipia de grau moderado e alto grau respectivamente. Estes pólipos podem ser considerados como lesões de alto potencial maligno e a retirada dos mesmos pode ser considerada como uma prevenção de tumores de cólon.

Assim, o manejo destes pacientes permanece o mesmo proposto pelo nosso grupo em 2007 (Achatz et al. 2007). Além do rastreamento intensivo de lesões em mama, por meio de mamografia e alternado com a ressonância magnética das mamas, a ultrassonografia de tireóide e vias urinárias deve ser realizada semestralmente. Os pacientes devem ser rastreados por colonoscopia e a cada dois anos a partir dos 25 anos. Filhos de portadores do alelo D no polimorfismo PIN3 devem ser rastreados desde o nascimento por meio de avaliação bioquímica e ultrassonográfica para alterações na glândula adrenocortical. O teste genético deve ser realizado assim que possível, após consentimento por escrito dos pais. Novos métodos de diagnóstico por imagem, como a realização anual de PET para diagnóstico precoce de lesões ou mesmo o PET específico para as mamas (PEM) ainda não foram suficientemente avaliadas para justificar o seu uso no rastreamento sistemático de nossos pacientes (Masciari et al. 2008).

6 CONCLUSÕES

- 1 O padrão das mutações germinativas no gene *TP53* nas famílias brasileiras é distinto dos padrões mundiais devido à alta incidência da mutação no éxon 10 R337H, responsável por 44,4% (8/18) de todas as mutações pontuais descritas neste estudo. Todas as demais mutações encontradas ocorreram no domínio de ligação ao DNA. Mutações *missense* correspondem a 88,9% de todas as mutações encontradas.
- 2 A presença do alelo duplicado no polimorfismo PIN3 apresentou impacto modificador, levando a um retardo de 17,1 anos no desenvolvimento de tumores em famílias brasileiras com germinativas detectadas no gene *TP53*. Os polimorfismos PIN2 e PEX 4 não são modificadores de risco em pacientes LFS/LFL com ou sem mutações em *TP53*. O efeito modificador do SNP309 do gene *MDM2* é exercido na idade de acometimento de sarcomas de partes moles em portadores de mutações germinativas em *TP53*.
- 3 A genotipagem de doze indivíduos provenientes de oito famílias aparentemente não relacionadas e portadoras da mutação R337H para 29 *TAG SNPs* intragênicos demonstrou o mesmo haplótipo em todas as famílias. A probabilidade destes indivíduos terem, ao acaso, o mesmo genótipo foi estimada em $3,8 \times 10^{-6}$, estabelecendo a existência de efeito fundador para R337H no sul e sudeste brasileiro.

- 4 A prevalência estimada do R337H na população do sul e sudeste brasileiro é de 0,3%. Considerando uma população de 100 000 000 indivíduos nesta região, podem existir até 300 000 portadores da mutação no R337H. A ocorrência desta mutação na população etnicamente heterogênea do sudeste e sul do Brasil é sugestiva de que circunstâncias históricas e demográficas possam estar envolvidas na disseminação da mesma e na manutenção da sua prevalência elevada nesta região. A procedência das famílias R337H coincide com o eixo da rodovia conhecida como “Estrada dos Tropeiros”, sugerindo que o primeiro portador da mutação R337H pode ter sido um tropeiro, tendo a disseminação ocorrido entre os séculos XVII e XIX nesta rota.

- 5 A maior ocorrência de tumores de tireóide e renais nos pacientes brasileiros portadores da LFS/LFL indicam a importância da introdução de ultrassonografia de tireóide e vias urinárias no rastreamento semestral. A investigação por colonoscopia a cada dois anos deve ser realizada nas famílias LFS/LFL brasileira devido a maior ocorrência deste tumor.

7 PERSPECTIVAS

O principal assunto a ser abordado ao término desta tese é a alta incidência de tumores em indivíduos provenientes do sul e sudeste do país. A possibilidade de que até 300 000 indivíduos provenientes destas regiões sejam portadores da mutação fundadora R337H no gene *TP53* nos leva a necessidade de criarmos estratégias para o seguimento deste grupo. Inicialmente, será necessária a educação de profissionais da saúde para a detecção de possíveis famílias em risco. Estudos de prevalência para saber qual a importância da mutação nos casos aparentemente “esporádicos” dos diferentes tumores seria de grande importância. Em seguida, o aconselhamento genético e estratégias de detecção molecular da mutação R337H e do polimorfismo do íntron 3, PIN3, deverão ser implantadas em âmbito público.

A viabilização de um rastreamento sistemático e precoce para estes indivíduos poderá contribuir para a detecção precoce de lesões malignas ou mesmo a prevenção a partir da detecção de lesões precursoras de câncer. Cirurgias mais eficazes e de menor porte podem ser suficientes frente ao diagnóstico precoce, possivelmente reduzindo a necessidade de tratamentos quimio ou radioterápicos e o custo emocional e real do tratamento para estes pacientes. É importante direcionar esforços para estudos de custo-eficácia da realização da triagem ampla para detecção de portadores, levando em consideração a penetrância para diferentes tipos de tumores, ainda a ser definida, e o custo das estratégias de prevenção/rastreamento em comparação com os benefícios de tal intervenção, determinando, por exemplo o número de anos de vida produtiva salvos em um portador submetido ao rastreamento e o número de tumores detectados precocemente. Em famílias portadoras de mutações nas quais seja detectada a

ausência da duplicação no íntron 3, é imprescindível a implementação da realização de teste preditivo em crianças que sejam possíveis portadoras.

Várias perguntas permanecem em suspenso relacionadas a LFS/LFL. Inicialmente, gostaríamos de compreender quais fatores podem estar envolvidos na manifestação de diferentes tumores na síndrome, além da idade de acometimento destes tumores. Em portadores assintomáticos, quais fatores estariam relacionados à não-penetrância da mutação no gene *TP53*, ou seja, resultando no não-desenvolvimento de um tumor ao longo da vida). Como atualmente mais de 80 indivíduos da família Y12 já foram avaliados para a mutação R337H, é possível a definição de trios e quartetos que contenham as diferentes combinação de portadores com tumor, portadores sem tumor, não portadores com tumor e assim por diante (Figura 20).

Figura 19. Trios/quartetos para estudo de CNVs na família Y12.

Para a avaliação destes grupos da mesma famílias, estabelecemos uma colaboração com o Dr. David Malkin, do Hospital Sick Children de Toronto, Canadá, na qual visamos a avaliação do impacto de DNA CNVs (*copy number variations*) nas famílias R337H brasileiras. DNA CNVs são uma fonte importante de variedade genética humana. Para tanto, amostras de DNA são avaliadas a partir de arrays de oligonucleotídeos de alta densidade. Como sua importância relacionada a suscetibilidade ao câncer e a progressão tumoral ainda não foram bem estabelecidas seria de grande interesse determinarmos qual é sua influência na LFS/LFL.

Outra dúvida surgida foi que frente à ausência de mutação germinativa no gene TP53 pelos métodos de seqüenciamento da região codificante e a busca de rearranjos, qual a alteração molecular responsável pelas características clínicas apresentadas e o padrão autossômico dominante? Assim, visamos aplicar a metodologia para detecção de CNVs no grupo de pacientes com a LFS/LFL e sem detecção de mutação.

A LFS/LFL constitui um desafio constante, sendo fundamental a tomada de consciência por parte dos profissionais de que esta síndrome não se trata de uma doença rara, mas sub-diagnosticada e freqüente. Estratégias populacionais devem ser desenvolvidas para o acompanhamento de portadores. Sendo assim, estudos visando um melhor conhecimento de outros mecanismos que possam estar envolvidos na patogênese da síndrome são fundamentais para a compreensão e manejo dos pacientes.

8 ANEXOS

Anexo 1. Projeto aprovado no Comitê de Ética e Pesquisa da Fundação Antonio Prudente, em 30.09.2003, sob o número 531/03.

À
Dra. Maria Isabel Waddington Achatz

Ref.: Projeto de Pesquisa n.º 531/03
"Diagnóstico molecular da síndrome de Li-Fraumeni em famílias brasileiras".

Prezada Doutora:

Seu projeto de pesquisa, acima mencionado, foi apreciado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital do Câncer em sua última reunião de 30.09.2003. Os membros desta comissão aprovaram a realização deste estudo. Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhados à secretaria do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Agnelo Anelli
Presidente da Comissão de Ética em Pesquisa

C.C.
Orientador: Dr. André Vettore
Co-orientador: Dr. José Cláudio C. Rocha

Anexo 2. Projeto aprovado na Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob o nº 0568/07.

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em 13.12.07, **APROVOU**, *ad-referendum*, o Protocolo de Pesquisa nº **0568/07**, intitulado **"MODIFICADORES DE PENETRÂNCIA DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE TP53 EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E LI-FRAUMENI LIKE (LFS/LFL): IMPACTO DOS POLIMORFISMOS INTRAGÊNICOS DO TP53 E DE GENES QUE REGULAM A ATIVIDADE DA P53"**, apresentado pelo **DEPARTAMENTO DE RADIOLOGIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani**

Pesquisador (a) Executante: **Maria Isabel Alves de S. Waddington Achatz**

Ciente,

CAPPesq, 13 de dezembro de 2007.

Prof. Dr. Giovanni Guido Cerri
Chefe do Departamento de Radiologia
FMUSP

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP
Fone: 011 - 30696442 fax: 011 - 3069 6492 - e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br
matc

Anexo 3. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Hospital A. C. Camargo – Fundação Antonio Prudente
Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Tel.2189-5181

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos- Res CNS 196/96 e Res CNS 251/97 do Ministério da Saúde

INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo para a avaliação de famílias brasileiras com o diagnóstico da síndrome de Li-Fraumeni. Este documento fornece informações sobre o estudo para o qual está sendo convidado a participar.

Este estudo tem como objetivo pesquisar a presença de alterações no DNA de pacientes que receberam o diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e em seus familiares. Serão pesquisadas alterações em regiões do DNA, nos genes *TP53*, *AKT* e *MDM2*, que podem estar relacionadas com a origem da síndrome de Li-Fraumeni. A síndrome de Li-Fraumeni é uma síndrome rara e hereditária que leva ao alto risco para o desenvolvimento de câncer. Os tumores mais relacionados são sarcoma, leucemia, tumores do sistema nervoso central, câncer adrenocortical e câncer de mama de início em idade jovem.

Para obter um maior conhecimento clínico e científico do câncer, médicos e pesquisadores desta instituição desenvolvem pesquisa clínica científica. Através da pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos das doenças e oferecer novas possibilidades de diagnóstico e tratamento. Grande parte destes trabalhos requer a utilização de fragmentos de tecidos ou de sangue. A utilização deste material biológico não influencia em nada o seu diagnóstico ou tratamento. Caso você concorde em participar desta atividade de pesquisa, será solicitada a coleta de 20 mL. de seu sangue. Esta coleta é feita de forma semelhante a exames de sangue de rotina.

O aconselhamento genético será oferecido a todos os pacientes e familiares que fizerem parte deste estudo. Ele possibilitará o esclarecimento das características da síndrome e dos testes a serem realizados. Para compararmos os resultados deste estudo com a população brasileira também será coletado o sangue de controles, que são pessoas que não tem o diagnóstico desta síndrome e que nunca tiveram tumores.

I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : SEXO : .M F

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)

DOCUMENTO DE IDENTIDADE : SEXO: M F

DATA NASCIMENTO.:/...../.....

ENDEREÇO Nº APTO:

BAIRRO: CIDADE

CEP: TELEFONE: DDD (.....)

II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1- TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: Modificadores de penetrância de mutações germinativas no gene *TP53* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni Like (LFS/LFL): impacto dos polimorfismos intragênicos do *TP53* e de genes que regulam a atividade da p53.

2- PESQUISADOR: Dra. Maria Isabel Waddington Achatz CRM – 105322

CARGO/FUNÇÃO: Diretora do Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo

3. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a disponibilidade de assistência no HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrentes da pesquisa.

SIM NÃO

5. Declaro ter sido esclarecido sobre a viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

SIM NÃO

6. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhum tipo de remuneração financeira.

SIM NÃO

7. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização futura. Nesse caso, porém, entendo que serei recontactado para fornecer consentimento específico para este(s) novo(s) estudo(s).

SIM NÃO

8. Em caso de resposta afirmativa à pergunta “7”, entendo que o meu material genético somente será utilizado após informação e consentimento de minha parte e/ou de meus familiares.

SIM NÃO

V. INFORMAÇÕES SOBRE O PESQUISADOR:

TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS:(XX11) 2189-5181.

“Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital A.C. Camargo – SP, pelo Telefone 2189-5020”;

VI. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES: O(a) senhor(a) receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado em seu prontuário.

VII - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa

São Paulo, de de .

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

REVIEW

***TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes**A Petitjean¹, MIW Achatz², AL Borresen-Dale^{3,4}, P Hainaut¹ and M Olivier¹¹International Agency for Research on Cancer, Lyon, France; ²Department of Oncogenetica, Hospital do Câncer, Sao Paulo, Brazil;³Department of Genetics, Institute for Cancer Research, Rikshospitalet-Radiumhospitalet Medical Centre, Montebello, Oslo, Norway and ⁴Faculty of Medicine, University of Oslo, Oslo, Norway

A large amount of data is available on the functional impact of missense mutations in *TP53* and on mutation patterns in many different cancers. New data on mutant p53 protein function, cancer phenotype and prognosis have recently been integrated in the International Agency for Research on Cancer *TP53* database (<http://www-p53.iarc.fr/>). Based on these data, we summarize here current knowledge on the respective roles of mutagenesis and biological selection of mutations with specific functional characteristic in shaping the patterns and phenotypes of mutations observed in human cancers. The main conclusion is that intrinsic mutagenicity rates, loss of transactivation activities, and to a lesser extent, dominant-negative activities are the main driving forces that determine *TP53* mutation patterns and influence tumor phenotype. In contrast, current experimental data on the acquisition of oncogenic activities (gain of function) by p53 mutants are too scarce and heterogenous to assess whether this property has an impact on tumor development and outcome. In the case of inherited *TP53* mutations causing Li-Fraumeni and related syndromes, the age at onset of some tumor types is in direct relation with the degree of loss of transactivation capacity of missense mutations. Finally, studies on large case series demonstrate that *TP53* mutations are independent markers of bad prognosis in breast and several other cancers, and that the exact type and position of the mutation influences disease outcome. Further studies are needed to determine how *TP53* haplotypes or loss of alleles interact with mutations to modulate their impact on cancer development and prognosis.

Oncogene (2007) 0, 000–000. doi:10.1038/sj.onc.1210302**Keywords:** *TP53*; p53; mutation; transactivation; phenotype**Introduction**

The tumor suppressor gene *TP53* (OMIM no. 191117) encodes a transcription factor which is activated in response to several forms of cellular stress and exerts multiple, antiproliferative functions (Vogelstein *et al.*, 2000). Somatic *TP53* gene alterations are frequent in most human cancers and germline *TP53* mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers (Li-Fraumeni (LFS) and Li-Fraumeni-like syndromes (LFL)) (Hainaut and Hollstein, 2000).

In contrast to other tumor suppressor genes that are mainly altered by truncating mutations, the majority of *TP53* mutations are missense substitutions (75%). Other alterations include frameshift insertions and deletions (9%), nonsense mutations (7%), silent mutations (5%) and other infrequent alterations (Olivier *et al.*, 2002). Since initial studies by Soussi and co-workers (Ory *et al.*, 1994), it is recognized that different forms of mutant p53 proteins may have different functional and biological effects. About 30% of *TP53* missense mutations found in cancer correspond to nucleotide substitutions at highly mutable CpG dinucleotides, at codons encoding residues that play essential structural and chemical roles in the contacts between the p53 protein and specific DNA sequences that constitute the p53 response elements (p53-RE) (Hainaut and Hollstein, 2000). These mutations result in a very significant loss of DNA binding activity and transactivation capacity (Ory *et al.*, 1994). However, many other residues are also the target of missense mutations, which may differ in their effects on p53 protein structure and activity. In the past 10 years, systematic data have been generated on the functional impact of *TP53* missense mutations. In particular, experimental assays have been performed in yeast and human cells to measure various properties including: (1) transactivation activities (TA) of mutant proteins on reporter genes placed under the control of p53-RE; (2) induction of cell-cycle arrest or apoptosis; (3) dominant-negative effects (DNE) over the wild-type protein; (4) temperature sensitivity; (5) activities of mutant proteins that are independent and unrelated to the wild-type protein (gain of function (GOF)). Results from these functional assays have recently been integrated into the International Agency for Research on Cancer (IARC) *TP53* database (<http://www-p53.iarc.fr/>)

Correspondence: Dr P Hainaut, Group of Molecular Carcinogenesis and Biomarkers, International Agency for Research on Cancer, 150 Cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France.

E-mails: hainaut@iarc.fr; wrisez@iarc.fr

Links: IARC *TP53* database, <http://www-p53.iarc.fr/>; OMIM *TP53*, no. 191117; OMIM LFS, no. 151623.

). This database provides structured data and analysis tools to study *TP53* mutation patterns in specific cancers and to investigate the functional and clinical impact of mutations. It contains all *TP53* gene variations reported in human cancers and populations, with annotations related to the clinical and pathological characteristics of tumors, and demographics, carcinogen exposures and family history of patients. The integration of standardized annotations on the functional impact of missense mutations provides a powerful framework for the analysis of 'functional' patterns of mutations in cancers and the detection of genotype/phenotype associations.

In this review, we exploit the annotations of the IARC *TP53* database to summarize the current knowledge on how mutagenesis and biological selection of mutations with specific functional characteristic may explain the pattern of mutations observed in human cancers. Based on these functional considerations, we discuss the genotype–phenotype correlations observed in patients with inherited germline *TP53* mutation, as well as the significance of somatic *TP53* mutation for predicting cancer progression, response to therapy and outcome.

Somatic mutation patterns: roles of mutagenesis and biological selection

Most *TP53* mutations found in human cancers are missense substitutions resulting from single-nucleotide substitutions (SNS) that cluster within the DNA-binding domain of the protein. These mutant proteins often accumulate in the nucleus of tumor cells and are retained in distant metastasis. Moreover, the most frequent mutants have been shown to be capable of cooperating with oncogenes for cellular transformation (Hinds *et al.*, 1990). These observations have lead to the hypothesis that missense mutations are preferentially selected in cancers because they carry some specific pro-oncogenic functions (GOF). However, if the expected number of missense mutations within exons 5–8, encoding the DNA-binding domain, is calculated, it is comparable to the observed frequency in cancer. Indeed, among 1567 possible SNS within exons 5–8, 1150 (73.4%) would produce missense mutations, of which 999 (86.8%) have been found in cancer and account for 87.9% of all SNS reported in cancer (Table 1). All possible nonsense mutations within exons 5–8 have been found in cancer and are twice more frequent in cancer (7.2%) than expected (3.7%), whereas possible silent mutations are 4–5 times less frequent in cancer than expected (Table 1). The selection of nonsense mutations in cancer is thus stronger than the one of missense mutations, whereas silent mutations are counter-selected. These observations suggest that loss of function is a strong factor of selection.

Although missense mutations do not seem to be strongly selected in cancer, some mutants are more frequent than expected. Of the 1150 possible missense mutants, nine account for 30% of missense mutations found in cancers (Olivier *et al.*, 2002). The frequency of

Table 1 Observed and expected frequency of SNSs within exons 5–8

Mutation type	Expected mutations ^a	Observed mutations ^b	Frequency in cancers ^c
Missense	1150 (73.4%)	999 (74.9%)	16367 (87.9%)
Nonsense	58 (3.7%)	58 (4.3%)	1335 (7.1%)
Silent	359 (22.9%)	276 (20.7%)	902 (4.9%)
Total	1567	1333	18604

Abbreviation: SNS, single-nucleotide substitution. ^aPossible mutations produced by SNSs within exons 5–8. ^bPossible SNS within exons 5–8 that are present in the IARC *TP53* database (R11, October 2006). ^cFrequency of SNS within exons 5–8 as reported in the IARC *TP53* database (R11, October 2006).

specific mutants can be analysed in relation with their probability of occurrence (based on intrinsic nucleotide substitution rates calculated by Lunter and Hein, 2004) and functional impact (based on TA assessed in yeast assays on eight different p53-RE by Kato *et al.*, 2003), with new scatter plot graphs that have been implemented in the IARC *TP53* database (Figure 1). These graphs show that frequent mutants are those associated with high substitution rates and complete loss of TA (Figure 1a and b). For example, transitions at CpG sites are expected to be the more frequent because of their high intrinsic mutagenicity. There are 34 possible missense mutations resulting from transitions at CpG sites within exons 5–8. However, only seven are frequently observed in cancers. These mutants show a complete loss of TA, whereas the 27 rare mutants retain significant TA on one or more p53-RE. Thus, mutagenicity and loss of TA appear to be the main driving forces that shape *TP53* mutation patterns.

P53 transcriptional activity relies on the formation of tetramers (dimers of dimers). Mutant proteins may interfere with wild-type p53 by forming hetero-oligomers less competent for specific DNA binding. The capacity of mutant proteins to interfere with the wild-type form has been studied in yeast and human cell assays in various settings. Since the first systematic study performed in yeast on 35 mutants (Brachmann *et al.*, 1996), data have been produced on more than 200 mutants, showing that DNE correlate with cancer frequency, but that DNE may be promoter- and cell-type dependent. A recent analysis of the IARC *TP53* database with a group of 117 mutants that were analysed for DNE on p53-RE from WAF-1 and RGC promoters confirmed that the proportion of DNE mutants was indeed correlated with frequency of occurrence in sporadic cancers (data not shown). DNE may thus play a significant role in the selection of mutation in addition to TA and may explain why missense mutant hotspots are more frequent than nonsense mutations (Figure 1a and b).

In addition to loss of TA and DNE, acquisition of oncogenic GOF activities has been proposed to play a role in the selection of mutations. Studies in mouse models of LFS have reported evidence of GOF for R175H and R273H mutants (Lang *et al.*, 2004; Olive *et al.*, 2004). Tumors in these knock-in mice were more

Figure 1 Scatter plot graphs for the analysis of mutant frequencies in relation to nucleotide substitution rates and functional impact. Mutants resulting from an SNS are represented as dots, which are color- and shape-coded according to the functional impact of the mutation, and located on the x axis according to their frequency in cancer and on the y axis according to nucleotide substitution rates that produced the mutation. (a and c) Missense, nonsense and silent mutations reported in all cancer (a) or in non-small-cell carcinomas of the lung (c). (b and d) Missense mutations can be further color- and shape-coded according to their transactivation capacity (based on a classification derived from functional assays in yeast). Detailed functional annotations for each specific mutant can be downloaded at <http://www-p53.iarc.fr/Mutations.html>.

metastatic or were arising in different tissues compared with knockout mice. Interference with p63/73 and increased cell proliferation was suggested to be the underlying molecular mechanisms. In human cells, various GOF properties have been studied, including activation of genes normally unaffected or repressed by wild-type p53, interference with other transcription factors and resistance to specific drugs. However, most experimental data on GOF have been generated with 'hotspot' mutants and no systematic study has been performed that would allow a global analysis of cancer-related mutants toward their GOF properties. Thus, there is no clear evidence for the impact of a GOF effect on the frequency of p53 somatic mutations in cancer.

The role of mutagenesis in shaping mutation patterns is best illustrated by the example of lung cancer. Instead of the classical hotspots found in most cancers (transitions at CpG sites at codons 175, 248 and 273), specific hotspots are observed in lung cancers (Figure 1c). These hotspots are due to G > T transversions that have been

shown to be caused by the presence of benzo(a)-pyrene diol epoxide (BPDE) adducts on guanines at these codons (Denissenko *et al.*, 1996). BPDE is the main metabolite of benzo(a)-pyrene, one of the most potent carcinogens present in high quantity in tobacco smoke. In lung tissue from smokers, the actual nucleotide substitution rate for these mutants is thus expected to be higher than the one estimated from endogenous processes. The lung hotspots are all defective for TA with less than 20% of wild-type activity on all p53-RE (Figure 1d). Another site of adduct formation by BPDE is the third base of codon 267, but the resulting mutation would not produce an amino-acid change. This mutation has been reported only once in a breast tumor sample. These results show that both mutagenesis and selection of loss of TA is shaping the patterns of mutation observed in lung cancer. In other tissues where non-classical hotspots are observed (such as non-melanoma skin cancers or bladder carcinoma), similar

mechanisms involving other carcinogens or specific mutagenic conditions are suspected to be involved.

Polymorphisms in the TP53 gene

The list of polymorphisms (SNP) along the *TP53* gene has considerably grown these last years, because of large-scale genome sequencing (<http://www-p53.iarc.fr/Polymorphism1.html>). The most extensively studied SNP (SNP72) is a G/C variation at the second position of codon 72 in exon 4, leading to Arg72 or Pro72 protein variants. Sharp ethnic differences are observed for this SNP, the Arg72 variant being more prevalent in Caucasians, whereas the Pro72 variant is more prevalent in Chinese and African-Americans (Beckman *et al.*, 1994; Langerod *et al.*, 2006a). Residue 72, although not conserved, is located within a proline-rich region and may affect the structure of the putative SH3-binding domain in p53. Several functional differences have been reported between the Arg72 and Pro72 variants. Arg72 was shown to be more efficient in inducing apoptosis, a property that correlated with a greater capacity to interact with MDM2 which facilitate nuclear export and mitochondrial localization (Dumont *et al.*, 2003). In contrast, the Pro72 variant was found to be more efficient in inducing cell-cycle arrest (Pim and Banks, 2004) and DNA repair (Siddique and Sabapathy, 2006). Other differences include the ability to bind components of the transcriptional machinery, to activate transcription, and to repress the transformation of primary cells (Thomas *et al.*, 1999). The protein with Arg72 was also found to be more efficiently targeted for degradation by the E6 protein of human papilloma virus (HPV)16, suggesting that individuals homozygous for Arg72 may be at higher risk of HPV-related cervical cancers (Storey *et al.*, 1998). However, most population-based studies have so far failed to confirm this hypothesis (Helland *et al.*, 1998; Klug *et al.*, 2001; Koushik *et al.*, 2004).

From the differences in functional properties, one may expect an impact of this SNP72 on cancer susceptibility, response to chemotherapeutic treatments and/or patients outcome. Numerous studies have analysed the impact of SNP72 on cancer risk but results have been contradictory and no clear consensus has been reached. For the impact on cancer outcome, one study on advanced head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) has shown that patients carrying a wild-type Arg72 variant have a better outcome in response to chemotherapy than those carrying a wild-type Pro72 variant (Sullivan *et al.*, 2004). However, as almost half of HNSCC carry a somatic *TP53* mutation, the effect of such a mutation must be taken into account.

Marin *et al.* (2000) were the first to report that in squamous cell carcinomas (SCC) *TP53* mutations were more frequent in tumors of Pro/Arg heterozygous patients compared with Arg/Arg homozygous patients, with mutations occurring on the Arg allele and loss of heterozygosity (LOH) affecting the Pro allele. They

proposed that the selective mutation of the Arg allele may be explained by the fact that SNP72 can be an intragenic modifier of mutant p53 behavior. Indeed, they showed that Arg72-containing alleles were more potent in neutralizing p73-induced activity. The role of p73 in this selection was emphasized by the fact that in breast adenocarcinomas, that did not express p73, mutations did not occur preferentially on the Arg allele (Marin *et al.*, 2000). Inhibition of drug-induced p73-dependent apoptosis by mutants has been shown to correlate well with the response to chemo-radiotherapy treatment of HNSCC patients, carriers of a 72Pro mutant showing longer overall and progression-free survivals (Bergamaschi *et al.*, 2003). Based on these results, several studies have tried to use solely SNP72 as a prognostic factor but showed conflicting results (Xu *et al.*, 2005; Kochethu *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Wegman *et al.*, 2006).

Selective mutation of the Arg allele has been observed by others in HNSCC (Bergamaschi *et al.*, 2003; Schneider-Stock *et al.*, 2004) and non-small-cell lung cancer (Nelson *et al.*, 2005), but also in breast cancer (Langerod *et al.*, 2002; Bonafe *et al.*, 2003). Moreover, other studies showed that *TP53* mutation preferentially occurred on the Pro72 allele in advanced ovarian carcinoma (Wang *et al.*, 2004), or did not find any difference between the genomic status at codon 72 and the presence of *TP53* mutation in colorectal cancer (Langerod *et al.*, 2002). Thus, the significance and tissue specificity of the preferential expression of a mutated Arg72 allele remain to be clarified. Interestingly, Tada *et al.* (2001) reported that preferential mutation of the Arg allele was only true for mutants, which were not DNE. The nature of mutation may thus add a level of complexity to this question.

Another polymorphism, the 16 bp duplication in intron 3 (DIN3), has been found to be associated with increased risk of colorectal cancer in a case-control study and correlated with a reduced level of *TP53* mRNA in lymphoblastoid cell lines (Gemignani *et al.*, 2004). However, because of a strong linkage disequilibrium (LD) between DIN3 and SNP72, it cannot be determined from these experiments whether DIN3 alone influences mRNA stability or if this effect requires the Pro72 variant. In another study, haplotypes for DIN3, SNP72 and intron 6 G>A correlated with higher apoptotic indices and DNA repair capacity in lymphoblastoid cell lines (Wu *et al.*, 2002).

These experimental data give additional clues for a biological effect of *TP53* polymorphisms on p53 function and point out the fact that haplotypes may provide more relevant information than SNPs. In a recent study, extensive re-sequence analysis of all exons, evolutionarily conserved intronic regions, 6 kb of the promoter region and spaced regions up to 50 kb in either direction of *TP53* in 94 healthy Norwegian women, showed that LD extended across the entire *TP53* coding region including the two neighboring genes, *ATP1B2* and *WDR79* (Langerod *et al.*, 2006a). SNP72 was shown to reside on several common haplotypes and, in non-African populations, a significant north-south

gradient for the Arg allele was found, with an increase in allele frequency in association with distance from the equatorial plane. This latter observation suggests that this allele could have undergone selection after the dispersion out of Africa. Analyses of 18 SNPs in the *TP53* region and neighboring genes on the same LD block in 2700 breast cancer cases and 3400 controls from Norway and Poland, showed no individual SNP in *TP53* to be significantly associated with risk of breast cancer (paper submitted). However, significant and consistent associations with two linked SNPs in the 5' neighboring gene *WDR79* was found. Stratification of tumors by estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) status showed these increases in risk to be limited to ER tumors.

From the data reviewed above, it is clear that more systematic studies are needed to clarify the impact of both SNP72 and the various *TP53* haplotypes on cancer outcome, taking into account the genotype of patients, and the LOH and *TP53* mutation status of tumors.

Phenotype–genotype correlations of germline mutations

TP53 germline mutations are associated with LFS and LFL (Malkin *et al.*, 1990). *TP53* germline mutations have also been reported in individuals with no family history or with a family history not fulfilling LFS or LFL definitions (Olivier *et al.*, 2003). The most frequent cancers associated with *TP53* mutations are breast cancer, bone and soft tissue sarcomas, brain tumors and adrenocortical carcinomas (ADC) (Wong *et al.*, 2006). Other less frequent cancers include leukemia, stomach cancer and colorectal cancer.

Genotype–phenotype correlations have been reported in *TP53* germline mutation carriers (Birch *et al.*, 1998; Olivier *et al.*, 2003). Missense mutations located within the DNA-binding loops of the protein were found associated with a higher prevalence of brain tumors and an earlier age at onset of breast cancers, whereas missense mutations outside the DNA-binding loops were associated with a higher prevalence of ADC (Olivier *et al.*, 2003). Using the new functional annotations integrated in the IARC *TP53* database, the mean age at onset of tumors in confirmed carriers of missense mutations was compared between partially functional and non-functional missense mutants (based on TA) for cancers where at least four tumors with age data was available. The mean age at onset of breast and colorectal tumors in carriers of a non-functional mutation was significantly lower than the one for carriers of partially functional mutation (Table 2). Thus, the penetrance of a mutation may be related to its degree of loss of TA, at least in some tissues. The notion that loss of function is in itself sufficient for causing LFS is substantiated by the fact that a large deletion encompassing the whole *TP53* gene has been reported in an LFS family (Bougeard *et al.*, 2003).

The fact that transcription-competent mutations can be found in cancer families is surprising. In such

Table 2 Mean age at onset of cancers in relation to transactivation property of germline *TP53* mutations^a

Tumor site/type	Non-functional	Functional/partially functional
Breast carcinoma	33.3	42.7
Soft tissue sarcoma	17.3	20.6
Brain tumor	23.6	26.2
Bone sarcoma	16.9	17.7
ADC	3.2	4.6
Lung carcinoma	46.1	48.8
Colorectal carcinoma	36.3	52

Abbreviation: ADC, adrenocortical carcinoma. ^aTumors in confirmed carriers of a germline *TP53* mutation reported in the IARC *TP53* database (R11, October 2006).

families, 7/20 carried a transcription-competent mutation that is predicted to be deleterious based on sequence conservation. It is thus possible that loss of an activity independent of TA, or not captured by the yeast assays, contributes to the observed phenotypes. It is also possible that mutations in other genes may contribute to the cancer phenotype. Indeed, in one family, the *TP53* mutation (N210Y) was concomitant with a truncating mutation in *APC* (Zajac *et al.*, 2000). The phenotype in this family was classical FAP (familial adenomatous polyposis syndrome, associated with *APC* mutation), but with a more severe phenotype than expected from the associated *APC* mutation. Recently, a polymorphism in the MDM2 gene (SNP309) has been shown to influence the age at onset of tumors in *TP53* mutation carriers in a gender- and hormone-dependent manner (Bond *et al.*, 2004, 2006; Bougeard *et al.*, 2006). These examples show how a combination of mutations with intermediate penetrance in two tumor suppressor genes may result in atypical phenotypes. Families with a partially functional *TP53* mutation may thus carry another intermediate penetrance mutation that act in synergy with *TP53* to promote cancer in tissues that are less typical or occur at different age than the one in families that carry high-penetrance *TP53* mutations.

Another example of atypical phenotype linked to a specific *TP53* germline mutation has been reported in Brazilian families. A specific mutation, R337H (CGC to CAC), located within the oligomerization domain of p53 has been first reported in children with ADC but not documented in familial history of other cancers (Ribeiro *et al.*, 2001). Structural and functional studies have identified that R337H mutant had a pH-dependent defect, making the protein inactive only in conditions of increased intracellular pH (DiGiammarino *et al.*, 2002). It was postulated that replacement of Arg by His at codon 337 in the dimerization motif of p53 alters hydrogen bonding between two p53 monomers, hampering dimerization and consequently specific DNA binding at pH8. This observation has led to the speculation that R337H may predispose to cancer development only in tissues in which a rise in intracellular pH is a major growth or survival regulatory signal. Such a rise in pH occurs in apoptotic cells and may play a role in the extensive tissue remodeling that occurs through selective apoptosis in adrenal cortical

glands during pre- and post-natal development. The authors postulated that it may explain why this conditional mutant might only predispose to ADC. However, in a study on 45 Brazilian families selected for their compliance to LFS/LFL clinical definitions, we found the R337H mutant in six LFL families (Achatz *et al.*, 2006). In one breast tumor, from a R337H carrier, of which tumor material was available, LOH was demonstrated. The spectrum of cancers in these families was similar to the one of LFL families carrying other types of *TP53* mutations, with a high prevalence of breast cancers and sarcomas, and only two families with ADC cases. Thus, the phenotype associated with R337H is not restricted to ADC. In fact, in yeast assays, this mutant showed defect in oligomerization and partial loss of function. The fact that this mutant retains significant activity (TA and possibly others) that may depend on cellular conditions may make it highly susceptible to gene–gene and gene–environment interactions, which may explain phenotypic variations observed in different series of patients.

Mutation and prognosis: lessons from breast cancer

Several studies have investigated the predictive value of *TP53* mutation status for tumor response to treatment and patient outcome in various cancers. However, different clinical and methodological settings have been used and the results have often been heterogeneous and contradictory. The vast majority of studies have relied on immunohistochemistry to assess p53 alterations. This approach is, however, a poor surrogate for gene mutation detection, as many mutations do not lead to protein accumulation, and as accumulation of wild-type p53 may also occur in the absence of gene mutation. Hence, the use of IHC leads to an unacceptable number of misclassified cases and to a greater inter-study variability. By contrast, in studies that have screened *TP53* mutations by gene sequencing to precisely identify the mutation, the presence of a mutation has been correlated with a shorter survival or a poor response to treatment in several cancers (comprehensive list of studies available at <http://www-p53.iarc.fr/Somatic.html>). Moreover, a number of studies have described specific types of mutation that were associated with a worse prognosis compared with other mutations. This is the case for mutations within the DNA-binding motifs that have been repeatedly associated with shorter survival or poor response to chemotherapy in several types of cancer.

In breast cancer, more than 20 studies have analysed the prognostic or predictive value of *TP53* mutation. Almost all of them have shown that *TP53* mutation was clearly associated with bad prognosis, mutations at residues involved in DNA contacts often being of worse prognosis. However, it was not clear from these studies whether *TP53* is a factor of prognosis independently of other clinicopathological factors, and there is no clear consensus on the specific type of mutations carrying a

worse prognosis, as different classifications of mutations have been used and the comparison of individual mutations was limited by a lack of statistical power. To assess through a more powerful analysis whether the identification of *TP53* mutation presents a real benefit over currently available factors of prognosis (such as tumor size, node status, and ER and PR contents), we have recently collected and pooled clinical and molecular data on 1794 European breast cancer patients who were followed up for at least 10 years and whose tumors were screened for somatic *TP53* gene mutation. Results from this large cohort showed that *TP53* mutation was an independent factor of poor prognosis, and that missense mutations located within the DNA-binding motifs had a similar prognostic value than non-missense mutations, the latter being associated with the worse outcome (Olivier *et al.*, 2006). The non-missense mutations in this series were mostly truncating mutations predicted to result in the absence of protein expression, hence a clear loss of function. Thus, loss of function may be sufficient for the poor prognosis of missense mutations located within the DNA-binding motifs.

When classified with annotations in the IARC *TP53* database, the majority of missense mutations in the breast cancer series were TA incompetent and predicted as deleterious according to inter-species protein sequence conservation (Olivier *et al.*, 2006). Thus, the difference in prognosis observed between missense mutations located outside the DNA-binding motifs and those located within the DNA-binding motifs could not be explained by a difference in TA. With new data available on DNE (Dearth *et al.*, 2006), we could re-annotate 160 mutants out of 235 from the breast series for their capacity to exert strong DNE on both *WAF1* and *RGC* p53-RE. Among 133 mutants located within the DNA-binding motifs, 110 were DNE (83%), whereas among 27 mutants located outside the DNA-binding motifs, seven were DNE (26%). The difference in prognosis may thus be related to the DNE capacity of mutants, an interesting observation that would require to be confirmed by further studies. It also remains to be determined whether GOF may be implicated, but experimental functional data on a larger spectrum of mutants would be needed to perform such analysis.

If *TP53* mutation status has a clear prognostic value on its own, its value against other molecular markers of prognosis those are validated or under testing has not been investigated thoroughly. In a large study including women with node-negative breast cancer, *TP53* mutation status was shown to be useful to identify women at higher risk of disease recurrence and death when their tumor had *ERBB2* amplification (Bull *et al.*, 2004). More recently, expression profiling using micro-arrays for tumor classification has received a lot of attention. The first study that identified different subtypes of tumors based on their expression profiles showed that these profiles were associated with differences in clinical outcome and that *TP53* gene mutation clustered with the profiles associated with worst outcome (Sorlie *et al.*, 2001). Then, the question of whether gene expression

profiles offer better prognostic information in patients with long-term follow-up was addressed (Langerod *et al.*, 2006b). Both univariate and multivariate analysis showed that *TP53* mutation status and tumor size were the strongest predictors of breast cancer survival when expression subgroups were not included, but gene expression-based classification and tumor size were the most significant and independent predictors of survival when all parameters were analysed. The *TP53* mutation status showed strong association with the 'basal-like' gene expression subgroup, and these tumors had a characteristic gene expression pattern. Using a different set of genes, Miller *et al.* (2005) have identified an expression signature for *TP53* mutation status in human breast cancer that is a good predictor of patient survival.

Overall, these results strongly support the fact that *TP53* mutations have a prognostic value in various groups of breast cancer patients, the associated risk of dying from breast cancer ranging from 2 to 5.

Conclusion

In the early 1990s, the rapid accumulation of data on *TP53* mutations in human cancer raised high expectations for clinical exploitation. However, the use of IHC as a surrogate for genetic analysis has confused the scientific and medical community by producing contradictory results. From the currently available data on the functional impact of specific mutations and on large series of tumors screened for *TP53* gene alterations, it is clear that the precise identification of the genetic alteration is required for the correct interpretation and analysis of *TP53* status in relation to tumor phenotype or patient outcome. Moreover, mutation analysis should also include assessment of the haplotype of the allele harboring the mutation as well as of the loss of the residual, wild-type allele (LOH). Performing such analyses in a streamlined, cost-effective manner compa-

tible with clinical application will require further technological developments. Until recently, polymerase chain reaction-based prescreening methods (single-stranded conformational polymorphism, denaturing gradient gel electrophoresis and its variations, denaturing high performance liquid chromatography) followed by DNA sequencing, have been the gold standards for gene mutation identification, but they are labor-intensive, thus not suitable for clinical practice. In addition, they do not allow to easily reconstruct wild-type and mutant haplotypes and are not suitable for assessing LOH. New techniques have been developed recently that may be more easily implemented for routine use, such as microarray-based methods (Affymetrix, APEX (Le Calvez *et al.*, 2005)).

In terms of future research, the focus should be on developing *TP53* mutation studies in the context of clinical trials. Large trials including hundred of patients randomly allocated to different treatment protocols are necessary to provide sufficient statistical power to determine the exact impact of *TP53* mutations, not only on overall survival but also on response to treatment. Such data will also help to delineate in which tumors and clinical context *TP53* may represent a specific target for new therapeutic approaches. Finally, studies on cancer syndromes associated with *TP53* germline mutations may provide a wealth of novel and important information on the mechanisms that regulate the penetrance of *TP53* mutations, as well as on gene-environment interactions that may either maximize or minimize the clinical impact of *TP53* mutations. There is mounting evidence that polymorphisms in gene regulating the *TP53* pathway, including *MDM2* and *AKT1*, are potential modifiers of *TP53* gene functions (Bond *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2005). Understanding the nature and mechanisms of these modifying effects, as well as the biological context in which they occur, will open new perspectives for approaches aimed at controlling the clinical impact of *TP53* mutations.

References

- Achatz MI, Olivier M, Calvez FL, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM *et al.* (2006). The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.*
- Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A *et al.* (1994). Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* **44**: 266–270.
- Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigianti G *et al.* (2003). p53 Polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* **3**: 387–402.
- Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DG, Harris M, Tricker KJ *et al.* (1998). Cancer phenotype correlates with constitutional *TP53* genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene* **17**: 1061–1068.
- Bonafe M, Ceccarelli C, Farabegoli F, Santini D, Taffurelli M, Barbi C *et al.* (2003). Retention of the p53 codon 72 arginine allele is associated with a reduction of disease-free and overall survival in arginine/proline heterozygous breast cancer patients. *Clin Cancer Res* **9**: 4860–4864.
- Bond GL, Hirshfield KM, Kirchhoff T, Alexe G, Bond EE, Robins H *et al.* (2006). *MDM2* SNP309 accelerates tumor formation in a gender-specific and hormone-dependent manner. *Cancer Res* **66**: 5104–5110.
- Bond GL, Hu W, Bond EE, Robins H, Lutzker SG, Arva NC *et al.* (2004). A single nucleotide polymorphism in the *MDM2* promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**: 591–602.
- Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, Vasseur S, Martin C, Brugieres L *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, Brugieres L, Chompret A, Gesta P, Charbonnier F, Valent A *et al.* (2003). Screening for *TP53* rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the *TP53* gene. *Oncogene* **22**: 840–846.
- Brachmann RK, Vidal M, Boeke JD. (1996). Dominant-negative p53 mutations selected in yeast hit cancer hot spots. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**: 4091–4095.

- Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwa D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI *et al.* (2004). The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* **22**: 86–96.
- Dearth LR, Qian H, Wang T, Baroni TE, Zeng J, Chen SW *et al.* (2006). Inactive full-length p53 mutants lacking dominant wild-type p53 inhibition highlight loss-of-heterozygosity as an important aspect of p53 status in human cancers. *Carcinogenesis*.
- Denissenko MF, Pao A, Tang M, Pfeifer GP. (1996). Preferential formation of benzo[a]pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53. *Science* **274**: 430–432.
- DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC *et al.* (2002). A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* **9**: 12–16.
- Dumont P, Leu JI, Della III PA, George DL, Murphy M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet* **33**: 357–365.
- Gemignani F, Moreno V, Landi S, Moullan N, Chabrier A, Gutierrez-Enriquez S *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.
- Hainaut P, Hollstein M. (2000). p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* **77**: 81–137.
- Harris SL, Gil G, Hu W, Robins H, Bond E, Hirshfield K *et al.* (2005). Single-nucleotide polymorphisms in the p53 pathway. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **70**: 111–119.
- Helland A, Langerod A, Johnsen H, Olsen AO, Skovlund E, Borresen-Dale AL. (1998). p53 Polymorphism and risk of cervical cancer [letter]. *Nature* **396**: 530–531.
- Hinds PW, Finlay CA, Quartin RS, Baker SJ, Fearon ER, Vogelstein B *et al.* (1990). Mutant p53 DNA clones from human colon carcinomas cooperate with ras in transforming primary rat cells: a comparison of the 'hot spot' mutant phenotypes. *Cell Growth Differ* **1**: 571–580.
- Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R *et al.* (2003). Understanding the function–structure and function–mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 8424–8429.
- Klug SJ, Wilмотte R, Santos C, Almonte M, Herrero R, Guerrero I *et al.* (2001). TP53 polymorphism, HPV infection, and risk of cervical cancer. **10**: 1009–1012.
- Kochethu G, Delgado J, Pepper C, Starczynski J, Hooper L, Krishnan S *et al.* (2006). Two germ line polymorphisms of the tumour suppressor gene p53 may influence the biology of chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* **30**: 1113–1118.
- Koushik A, Platt RW, Franco EL. (2004). p53 Codon 72 polymorphism and cervical neoplasia: a meta-analysis review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **13**: 11–22.
- Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM *et al.* (2004). Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**: 861–872.
- Langerod A, Bukholm IR, Bregard A, Lonning PE, Andersen TI, Rognum TO *et al.* (2002). The TP53 codon 72 polymorphism may affect the function of TP53 mutations in breast carcinomas but not in colorectal carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **11**: 1684–1688.
- Langerod A, Burdette L, Yeager M, Llaca V, Presswalla S, Gerhard DS *et al.* (2006a). Pattern of genetic variation in the *tp53* locus indicates linkage disequilibrium extends across the flanking genes, *ATP1B2* and *WDR79*. *Hum Mutat* (in press).
- Langerod A, Zhao H, Borgan O, Nesland JM, Bukholm IK, Ik Dahl T *et al.* (2006b). TP53 mutation status and gene expression profiles are powerful prognostic markers of breast cancer. *Breast Cancer Res* (in press).
- Le Calvez F, Ahman A, Tonisson N, Lambert J, Temam S, Brennan P *et al.* (2005). Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem* **51**: 1284–1287.
- Lunter G, Hein J. (2004). A nucleotide substitution model with nearest-neighbour interactions. *Bioinformatics* **20**(Suppl 1): I216–I223.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JFJ, Nelson CE, Kim DH *et al.* (1990). Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* **250**: 1233–1238.
- Marin MC, Jost CA, Brooks LA, Irwin MS, O'Nions J, Tidy JA *et al.* (2000). A common polymorphism acts as an intragenic modifier of mutant p53 behaviour. *Nat Genet* **25**: 47–54.
- Miller LD, Smeds J, George J, Vega VB, Vergara L, Ploner A *et al.* (2005). An expression signature for p53 status in human breast cancer predicts mutation status, transcriptional effects, and patient survival. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 13550–13555.
- Nelson HH, Wilkojmen M, Marsit CJ, Kelsey KT. (2005). TP53 mutation, allelism and survival in non-small cell lung cancer. *Carcinogenesis* **26**: 1770–1773.
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT *et al.* (2004). Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell* **119**: 847–860.
- Olivier M, Lees R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. (2002). The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* **19**: 607–614.
- Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P *et al.* (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* **63**: 6643–6650.
- Olivier M, Langerod A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J *et al.* (2006). The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **12**: 1157–1167.
- Ory K, Legros Y, Auguin C, Soussi T. (1994). Analysis of the most representative tumour-derived p53 mutants reveals that changes in protein conformation are not correlated with loss of transactivation or inhibition of cell proliferation. *EMBO J* **13**: 3496–3504.
- Pim D, Banks L. (2004). p53 Polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *Int J Cancer* **108**: 196–199.
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR *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**: 9330–9335.
- Santos AM, Sousa H, Portela C, Pereira D, Pinto D, Catarino R *et al.* (2006). TP53 and P21 polymorphisms: response to cisplatin/paclitaxel-based chemotherapy in ovarian cancer. *Biochem Biophys Res Commun* **340**: 256–262.
- Schneider-Stock R, Mawrin C, Motsch C, Boltze C, Peters B, Hartig R *et al.* (2004). Retention of the arginine allele in codon 72 of the p53 gene correlates with poor apoptosis in head and neck cancer. *Am J Pathol* **164**: 1233–1241.

- Siddique M, Sabapathy K. (2006). Trp53-dependent DNA-repair is affected by the codon 72 polymorphism. *Oncogene* **25**: 3489–3500.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al.* (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 10869–10874.
- Storey A, Thomas M, Kalita A, Harwood C, Gardiol D, Mantovani F *et al.* (1998). Role of a p53 polymorphism in the development of human papillomavirus-associated cancer. *Nature* **393**: 229–234.
- Sullivan A, Syed N, Gasco M, Bergamaschi D, Trigiante G, Attard M *et al.* (2004). Polymorphism in wild-type p53 modulates response to chemotherapy *in vitro* and *in vivo*. *Oncogene* **23**: 3328–3337.
- Tada M, Furuuchi K, Kaneda M, Matsumoto J, Takahashi M, Hirai A *et al.* (2001). Inactivate the remaining p53 allele or the alternate p73? Preferential selection of the Arg72 polymorphism in cancers with recessive p53 mutants but not transdominant mutants. *Carcinogenesis* **22**: 515–517.
- Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. (1999). Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. *Mol Cell Biol* **19**: 1092–1100.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* **408**: 307–310.
- Wang Y, Kringen P, Kristensen GB, Holm R, Baekelandt MM, Olivier M *et al.* (2004). Effect of the codon 72 polymorphism (c.215G>C, p.Arg72Pro) in combination with somatic sequence variants in the TP53 gene on survival in patients with advanced ovarian carcinoma. *Hum Mutat* **24**: 21–34.
- Wegman P, Stal O, Askmalms MS, Nordenskjold B, Rutqvist LE, Wingren S. (2006). p53 Polymorphic variants at codon 72 and the outcome of therapy in randomized breast cancer patients. *Pharmacogenet Genomics* **16**: 347–351.
- Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH *et al.* (2006). Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology* **130**: 73–79.
- Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK *et al.* (2002). p53 Genotypes and haplotypes associated with lung cancer susceptibility and ethnicity. *J Natl Cancer Inst* **94**: 681–690.
- Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z *et al.* (2005). p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res* **11**: 7328–7333.
- Zajac V, Tomka M, Ilencikova D, Majek P, Stevurkova V, Kirchhoff T. (2000). A double germline mutations in the APC and p53 genes. *Neoplasma* **47**: 335–341.

Editorial Manager(tm) for Familial Cancer
Manuscript Draft

Manuscript Number: FAME104R1

Title: Inheritance of TP53 mutation and tumour spectrum in Brazilian LFS/LFL families: association with early-onset colorectal cancer

Article Type: Short Communication

Section/Category:

Keywords: TP53, p53, mutations, Li-Fraumeni syndrome, colorectal cancer

Abbreviations: colorectal cancer, CRC; LFS, Li-Fraumeni syndrome; LFL, Li-Fraumeni-Like syndrome

Corresponding Author: Dr. Magali Olivier, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: International Agency for Research on Cancer (IARC)

First Author: Maria Isabel Waddington Achatz

Order of Authors: Maria Isabel Waddington Achatz; Magali Olivier, Ph.D.; Benedito Mauro Rossi; Edenir Inez Palmero; Maira Caleffi; Fernanda Lenara Roth; Luciane Kalakun; Pierre Hainaut; Patricia Ashton-Prolla; Dirce Carraro, PhD

Manuscript Region of Origin:

Abstract: Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a dominantly inherited cancer predisposition syndrome characterized by the predisposition to multiple early-onset cancers. Here we describe the observed tumor spectra in 45 Brazilian families matching commonly accepted LFS/LFL clinical definitions and stratified by the presence or absence of TP53 germline mutation. The specificity of these spectra included a low frequency of bone sarcomas and frequent gastric and CRC cancers. CRC represented 6.2% (21/338) of all tumours and age at diagnosis was 32.4 years in TP53 mutation carriers versus 51.6 in non-carriers, indicating that TP53 germline mutation may confer susceptibility to early onset CRC. It is proposed to consider early onset CRC in the LFS/LFL tumour spectrum and that screening for CRC should be envisaged

in the follow-up of subjects belonging to LFS/LFL families, in particular if there is a history of early onset CRC and/or in populations where there is a high incidence of CRC.

Response to Reviewers: Comment 1. Detailed information on families and mutations

The reviewer requested that we provide more details on the clinical diagnosis of families and mutations. As this information has already been published in a previous paper (Achatz et al., *Cancer Letters*, 2007), we felt that it was not necessary to repeat this information in a table in this paper. To address this comment, we have emphasized reference to the first paper in paragraph two (page 3) and provided some details in the third paragraph (page 4).

Comment 2. Selection bias towards early onset cancers

The reviewer is concerned about a possible selection bias that would affect the age at onset of tumors observed in these families. Although this is true for cancers that are used for the clinical diagnosis of LFS/LFL, this does not apply to CRC. None of the CRC included in our analysis were used as the basis for the clinical diagnosis of LFS/LFL and only one case occurred in a proband who also developed a soft tissue sarcoma and lymphoma. The earlier age at onset of CRC in families with a TP53 mutation compared to CRC in families without a mutation is thus not affected by this bias. In paragraph 5, page 6, we provide more details and modified the text to address these points.

Comment 3. Family size and tumor inclusion criteria

The reviewer also raises the problem of phenocopies when including tumors in third or higher-degree relatives. We included all cancers in probands and in up to fourth-degree relatives. Although we can not exclude that some tumors might represent phenocopies, results regarding CRC should not be strongly affected by this particular bias. Indeed, among cancers included, two-third of all CRC were in first or second-degree relatives. In paragraph 5, page 6, we provide more details and modified the text to address these points.

Comment 4. Age-specific incidence rates

The reviewer points out that the age and sex structure of the families and the local age/sex specific cancer incidence rates need to be taken into account in interpreting data. We are in complete agreement with this view. However, we consider that these factors are not a source of bias in the comparison between LFS/LFL families with and without a TP53 germline mutation. There were no differences in terms of total tumor numbers and family structure between these two groups. There are only limited cancer registration data for Brazil, and none of the registers indexed in “Cancer Incidence on 5 Continents, IARC” cover the areas from which the families under study originate. Data from neighboring cancer registries in Campinas and in Porto Alegre show a cumulative risk of colorectal cancer (including colon, rectum, anus and small intestine) of

about 2% in males at 50 years of age. Although these data are too limited to be taken as representative of the general population of Brazil, they correspond to a risk of colorectal cancer much lower than the one observed among the members of the families.

Comment 5. Incidence of colorectal cancer

The reviewer points out the fact that in other studies the incidence of CRC in TP53 germline mutation carriers is very low and suggests that mutations in MMR genes might be responsible for the LFL phenotype in some of our families. LFS/LFL diagnosis was based on the occurrence of the typical spectrum of tumors of the syndrome including sarcoma and adrenocortical tumors which, to our knowledge, have never been described as part of Lynch syndrome. Furthermore, none of the families fulfill Amsterdam criteria 1 and 2 and thus testing of those families for MMR would not be the first choice. We agree that TP53 testing should be considered as second line analysis after evaluation of mismatch repair genes (MMR) genes whenever Amsterdam criteria is met. In paragraph 7 (page 7) this issue was addressed.

Comment 6. Error in age at diagnosis of CRC

The correct figure is 32.4, it has been corrected.

INHERITANCE OF *TP53* MUTATION AND TUMOUR SPECTRUM IN
BRAZILIAN LFS/LFL FAMILIES: ASSOCIATION WITH EARLY-ONSET
COLORECTAL CANCER.

Maria Isabel Waddington Achatz¹, Magali Olivier², Benedito Mauro Rossi³, Edenir Inez Palmero⁴, Maira Caleffi⁵, Fernanda Lenara Roth⁶, Luciane Kalakun⁷, Dirce Carraro⁸, Pierre Hainaut², Patricia Ashton-Prolla^{4,6}

1. Dept Oncogenetica, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, Brazil
2. Group of Molecular Carcinogenesis and Biomarkers, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France
3. Department of Pelvic Surgery, Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brazil
4. Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clinicas, Porto Alegre, Brazil
5. Nucleo Mama Porto Alegre and Associação Hospitalar Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil
6. Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil
7. Post-graduate course in Epidemiology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.
8. Laboratório de Genetica do Cancer, Hospital do Câncer A. C. Camargo, São Paulo, Brazil

Correspondence to: Maria Isabel Waddington Achatz,
Dept Oncogenetica, Hospital do Câncer A. C. Camargo, Rua Professor Antonio Prudente 211 – Sao Paulo, Brazil – CEP 01509010
Email: miachatz@hcancer.org.br

Keywords: *TP53*, p53, mutations, Li-Fraumeni syndrome, colorectal cancer

Abbreviations: colorectal cancer, CRC; LFS, Li-Fraumeni syndrome; LFL, Li-Fraumeni-Like syndrome.

Abstract

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a dominantly inherited cancer predisposition syndrome characterized by the predisposition to multiple early-onset cancers. Here we describe the observed tumor spectra in 45 Brazilian families matching commonly accepted LFS/LFL clinical definitions and stratified by the presence or absence of *TP53* germline mutation. The specificity of these spectra included a low frequency of bone sarcomas and frequent gastric and CRC cancers. CRC represented 6.2% (21/338) of all tumours and age at diagnosis was 32.4 years in *TP53* mutation carriers versus 51.6 in non-carriers, indicating that *TP53* germline mutation may confer susceptibility to early onset CRC. It is proposed to consider early onset CRC in the LFS/LFL tumour spectrum and that screening for CRC should be envisaged in the follow-up of subjects belonging to LFS/LFL families, in particular if there is a history of early onset CRC and/or in populations where there is a high incidence of CRC.

Li-Fraumeni syndrome (LFS; MIM# 151623) is an autosomal dominant disorder of predisposition to multiple cancers. The underlying genetic defect is germline mutation in the *TP53* tumor suppressor (MIM# 191170). Classic LFS is defined by a proband with sarcoma diagnosed before the age of 45, associated with a tumor before 45 years in a first-degree relative, and another tumor before 45 years or a sarcoma at any age in a close relative. Most frequent cancers in LFS are sarcomas, breast cancers, brain tumors and adrenocortical carcinomas (ADR). Additional tumors described in some LFS families include leukemia, melanoma, lung, gastric, colorectal, and prostate cancers as well as germ cell tumors, choroid plexus papillomas, and Wilms' tumors [1]. Some families present a tumor pattern reminiscent of LFS without matching classical criteria and are termed Li-Fraumeni like (LFL). Several definitions of LFL have been proposed (LFL-E1 and LFL-E2, LFL-B) [2][3]. However, the spectrum and frequency of tumors associated with germline *TP53* mutations are uncertain. In 2001, Birch et al. assessed the frequency of cancers in *TP53* mutation carriers and used cancer statistics from the United Kingdom (U.K.) to analyze the excess of cancer risk associated with inheritance of *TP53* mutation [4]. They showed that although breast carcinomas, sarcomas and brain tumors were most frequent, the greatest increase relative to general population rates were in rare tumors, ADR and phyllodes tumors. Thus, *TP53* germline mutations do not simply increase general cancer risk but exert some tissue specific effects.

In a previous study, we have described *TP53* germline mutations in LFS and LFL Brazilian families and we have shown a high prevalence of a specific mutation at codon 337, R337H [5]. This mutation has been previously related to childhood adrenocortical tumors (ADR) but in our series the overall tumor spectrum associated with this mutation was similar to the one associated with other reported *TP53* germline mutations (IARC *TP53* database). Here we further analyze the spectrum of tumors in our series of Brazilian LFS/LFL families.

Families matched at least one of the accepted LFS or LFL definitions (LFL-E1, LFL-E2 or LFL-B) and were recruited in a high-cancer risk clinic within a protocol approved by local ethics committees (Fundação Antônio Prudente, National Commission for Ethics in Research, Brazil). Blood was obtained from cancer-affected probands for *TP53* mutation analysis by sequencing as described previously [5]. Information on cancer occurrence in the family was obtained by structured interview and ascertained using hospital records. Table 1 shows the 119 tumors detected in patients from families in which the proband had an identified germline mutation and the 219 tumors from families in which no *TP53* mutation has been detected in the proband. A total of 158 tumors (46,7%) were confirmed by histopathological reports, medical records or death certificates. Tumors occurring in probands and relatives (1st to 4th degree) were included. Mutations were detected in 13 families. They included six R337H mutations, three previously reported germline mutations (two G245S and one R213Q) and three novel germline mutations (V173M, V197M and G244D). R337H is located in the p53 oligomerisation domain while other mutations are located in the DNA-binding domain. All these mutations have been shown to be loss of function mutations in yeast transactivation assays [6].

Table 1: Spectrum and mean age at diagnosis of tumors in 45 Brazilian Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like families

Tumors	Cases with <i>TP53</i> mutation		Cases without <i>TP53</i> mutation	
	n (%)	Age at diagnosis	n (%)	Age at diagnosis
Total (338)	119 (35.2%)		219 (64.8%)	
Breast*	33 (27.7%)	43,5	39 (17.8%)	44,9
Central nervous system*	13 (10.9%)	19	13 (5.9%)	32
Soft tissue sarcoma*	10 (8.4%)	30,1	27 (12.3%)	31,8
Gastric*	8 (6.7%)	55,6	22 (10.0%)	51,6
Adrenocortical	8 (6.7%)	14,7	0	N/A
Colorectal*	7 (5.9%)	32,4	14 (6.4%)	51,6
Lung*	7 (5.9%)	55,9	8 (3.7%)	46,6

Prostate*	4 (3.4%)	64,5	12 (3,5%)	72
Renal	4 (3.4%)	20,7	0	N/A
Esophagus*	3 (2,5%)	53	6 (2,7%)	68,3
Head and neck*	3 (2,5%)	54,5	6 (2,7%)	48,8
Liver*	3 (2,5%)	39	4 (1.8%)	60,5
Ampulla of Vater	2 (1.7%)	49,5	0	N/A
Thyroid	2 (1.7%)	41,5	4 (1,8%)	58
Leukemia/ Lymphoma*	2 (1.7%)	45	19(8.6%)	33,2
Female genital tract*	2 (1.7%)	59,7	11 (3,2%)	54,2
Non-melanoma skin cancer*	1 (0.8%)	58	10 (2,9%)	48,7
Bone sarcoma*	1 (0.8%)	N/A	8 (3.6%)	17,3
Melanoma	1 (0.8%)	80	6 (2,7%)	47
Pancreas*	1 (0.8%)	58	5(2.3%)	47,5
Bladder*	0	N/A	3 (1.4%)	54
Wilms´	0	N/A	1(0.4%)	1
Bone	1 (0.8%)	21	0	N/A
Hidatyform mole	0	23	1 (0,4%)	N/A
Unknown	3 (2,5%)	N/A	0	N/A

Key: N/A: not applicable; * the exact age at diagnosis was unknown in one to three tumors in the group, and thus, not included in the average.

Consistent with Birch et al. (2001), breast carcinomas, soft tissue sarcomas and brain tumors were the three most common diagnoses. However, the prevalence of other cancers showed important differences with the UK series. In the latter series, the 4th and 5th diagnoses were osteosarcomas and lung carcinomas, each representing 6.7% of the total, whereas gastric cancer was 6th (4.7%) and colon cancer, 14th (1.3%). In Brazilian families with *TP53* mutations, the 4th and 6th diagnoses were gastric and colorectal cancers, representing respectively 6.7% and 5.9% of all diagnoses. These two cancers were also common in families without germline mutations, corresponding to the 3rd and 4th diagnoses. In contrast, osteosarcomas were rare, with only 0.8% of diagnoses in families with *TP53* mutations (3.6% in families without mutations). The strongest association with *TP53* mutation was observed for ADR and renal cancers, which were

diagnosed solely in *TP53* germline mutation carriers, representing 6.7% and 3.4% of all diagnoses.

The low prevalence of bone sarcomas in the Brazilian series may be due to under-diagnosis related to late presentation, rapid progression, and reliance upon imaging techniques that were not readily accessible in many centers in Brazil. The high proportion of gastric cancer is correlated with the fact that this cancer is frequent in Brazil, with incidences (2006) of 16,3:100.000 in males and 8,7:100.000 in females. CRC is also a frequent cancer in the general population, accounting for the fourth most common cancer in male population and the third in female population, with incidences of 12:100.000 men and 15:100.000 women (<http://www.inca.gov.br>). A total of 21 cases of CRC were diagnosed in 15 of the 45 families (33.3%), including 5/13 (38%) families with and 10/32 (31%) families without detected *TP53* mutation. CRC may represent phenocopies among the tumors found in these families. However, the age at diagnosis of CRC in families with a *TP53* mutation was significantly lower compared to those without a mutation. The average age at onset of 6 CRC in families with mutation was 32.4 years (28.4 excluding one case in a proband) and 51.6 years in those (12 cases) without mutation (p -value=0.011, T-test). In three cases, tumor was not confirmed and age of onset unknown, thus not included. Two-thirds of all CRC (12/18) occurred in 1st and 2nd degree relatives. None of these CRC were used for the initial clinical diagnosis of LFS/LFL, thus excluding a selection bias towards early onset CRC. This observation argues in favor of an association between inheritance of *TP53* mutation and early occurrence of CRC in these families.

Another evidence linking CRC and inheritance of *TP53* mutation comes from the analysis of the IARC *TP53* database (<http://www-p53.iarc.fr/germline>). Indeed, we showed that inherited *TP53* mutations are associated with early-onset CRC [1]. Moreover, in subjects with germline mutations that completely abrogate p53 transcriptional activity, CRC is diagnosed at 36.3 years on average, compared

with 52 years in subjects with mutations that partially retain transcriptional capacity [7]. Another study by Wong et al. (2006) reported a high prevalence of early onset CRC in 397 patients from a US series with classical LFS, occurring several decades earlier than in the general population [8]. This observation led to suggest that LFS should be considered as diagnosis when a young patient presents with CRC.

Taken together, our data and those of Wong et al. (2006) suggest that CRC may be a common diagnosis in LFS/LFL families in specific populations. Although larger dedicated studies would be required to provide a definitive proof, screening for CRC in the context of LFS/LFL families should be considered depending on the population or family context. We thus propose the following recommendations: (1) early onset CRC should be considered among cancers characterizing the LFS/LFL spectrum and *TP53* testing should be considered as second line analysis after evaluation of mismatch repair genes (MMR) whenever Amsterdam 1 and 2 criteria are met; (2) screening for CRC should be envisaged in the follow-up of subjects belonging to LFS/LFL families, in particular if there is a history of early onset CRC and/or in populations where there is a high incidence of CRC. Screening should be considered in a case to case basis from the age of 25, as also proposed by Wong et al. (2006). Concerning other cancers, screening for gastric cancer should be performed from age 45 in individuals from this and other high risk populations, given the possibility of gene-environment interactions enhancing the risk of gastric cancer in LFS/LFL subjects from Brazil. On the other hand, given the current low rate of osteosarcoma diagnosed in Brazilian LFS/LFL families, efforts should focus on assessing the impact of under-diagnosis.

Acknowledgements

The authors wish to thank Ghislaine Martel-Planche, Elodie Caboux and Dr Ricardo Renzo Brentani for their continuous support. The work of M I W A at IARC was partially supported by an ICRETT fellowship of Union Internationale

Contre le Cancer (UICC), No. 978/2004, and by FAPESP grant No. 03/10121-8. This work was partially supported by the National Cancer Institute (NCI), USA.

References

- 1 Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, Eeles RA (2003) Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 63:6643-6650
- 2 Birch JM (1994) Li-Fraumeni syndrome. *Eur J Cancer* 30A:1935-1941
- 3 Eeles RA (1995) Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 25:101-124
- 4 Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM (2001) Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 20:4621-4628
- 5 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 (2007) The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96-102
- 6 Kato S, Han SY, 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* 100:8424-9
- 7 Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, 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* 28:622-629
- 8 Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S (2006) Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology* 130:73-79

Anexo 6. Garritano S, Landi S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Brentani R, Ashton-Prolla P, Tavtigian S, Hainaut P, **Achatz MIW**. High frequency of the cancer-predisposing *TP53* mutation R337H in the population of south Brazil: evidence for founder effect. *PNAS*. *Submitted*.

High frequency of the cancer-predisposing *TP53* mutation R337H in the population of southern Brazil: evidence for a founder effect.

Sonia Garritano, Stefano Landi, Federica Gemignani, Edenir Inez Palmero, Magali Olivier, Ghyslaine Martel-Planche, Florence Le Calvez-Kelm, Fernando Vargas, Ricardo Renzo Brentani, Patricia Ashton-Prolla, Sean Tavtigian, Pierre Hainaut and Maria Isabel Waddington Achatz

Due to migration and selection throughout history, founder effects are common among humans. Founder effect is defined as the loss of genetic variation when a new colony is established by one or a small number of individuals. Such effects are rapidly diluted by population dispersion and mixing, but can be stabilized through time and space by endogamy due to geographic and/or cultural segregation. Here we describe a founder effect due to a mutation in the *TP53* gene at codon 337 (CGC to CAC, arginine to histidine, R337H, base number 17588), which predisposes to the early occurrence of multiple cancer and which is present at estimated allele frequency of 0.0015 in the population of Southern Brazil (Palmero 2008). Haplotyping of 10 unrelated R337H carriers using a set of 29 tag SNPs encompassing the whole *TP53* gene (including the promoter, 24179 bp) revealed that all subjects carried the same, rare haplotype. The geographic origin of the R337H families in Southern Brazil shows that they are mostly distributed along a road axis between the cities of São Paulo and Porto Alegre, over 1200 km apart, which is historically known as the main commercial route used by merchants of portuguese origin in the XVIII and XIX century.

TP53 encodes a transcription factor that acts as suppressor of DNA replication and cell proliferation in response to genotoxic and other stresses. Somatic mutations in this gene are common in almost all forms of human cancers. Germline mutations in

TP53 are associated with inheritance of the Li-Fraumeni Syndrome (LFS, OMIM #151623), a rare autosomal disorder characterized by familial clustering of tumours, with a predominance of sarcomas, breast cancers, brain tumours and adrenocortical carcinomas, diagnosed before the age of 45 years Li et al. (1988). Other cancers, such as lung cancer, skin melanoma, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer are present in excess in some families. Germ cell tumours, choroid plexus papilloma, and Wilms tumor have also been reported as part of the spectrum. BIRCH et al. (2001). A number of families with tumour patterns that resemble LFS have been described, leading to different definitions of Li-Fraumeni-Like (LFL) syndromes. Overall, about 400 families with germline *TP53* mutations have been described worldwide (IARC *TP53* mutation database, <http://www-p53.iarc.fr>). In Brazil, a particular germline mutation at codon 337 in *TP53* (CGC to CAC, arginine to histidine, R337H, genomic nucleotide number 17588) has been repeatedly detected in apparently unrelated subjects. The mutation was first identified in children with adrenocortical carcinoma (ADC) in families with no reported history of other cancers. Further investigation in families prone to multiple cancers showed that the mutation was also present in families that correspond to the LFS/LFL definitions. Outside Brazil, this mutation has been found only twice, in a Portuguese family tested in France (Chompret et al. 2002). There are conflicting reports as to the origin of the mutation. Ribeiro et al. have argued against a founder effect based on limited analysis of 5 hypervariable loci on chromosome 17p, including only one within the *TP53* region. (Ribeiro et al. 2000) In contrast, using two intragenic hypervariable loci, Latronico et al. suggested that a founder effect was statistically probable. Recently, we have assessed the prevalence of R337H in 750 healthy women participating in a community-based breast cancer screening programme in the area of Porto Alegre, Southern Brazil. R337H was detected in 2 participants with no personal history of cancer but who reported a familial history of cancer at multiple sites, suggesting a carrier frequency of about 0.03 in this population (allele frequency: 0.015). LFS/LFL is a rare disease, with estimates in the range of 1:5000 in the general population, (Lalloo et al. 2003 Lancet), and germline mutations are commonly dispersed over more than 100 codons with a few hotspots representing over 5% of all mutations. Thus, the allele frequency of the R337H mutation in the population of Southern Brazil is at least 300 times higher than any single germline hotspot *TP53* mutation associated with LFS.

To characterize *TP53* haplotypes, set of 29 *TP53* locus SNPs with allele frequency >4% was selected out of a total of 183 SNPs identified by direct sequencing of 24179 bp of genomic DNA encompassing the whole gene, including its promoter and its 3' UTR, from a set of 48 unrelated subjects most of whom were ethnically admixed Brazilians (Garritano et al., submitted). Genotyping was carried out on 13 subjects from 8 previously identified, superficially unrelated, Brazilian *TP53* R337H families (Achatz et al., 2007, Palmero et al., 2007), and 90 Caucasians from the Coriell repository HapMap sample collection (<http://www.hapmap.org>), making a total of 206 chromosomes. DNA from the Brazilians was extracted from peripheral blood lymphocytes using standard procedures, and DNA from the HapMap samples was prepared at Coriell. Genotyping was performed using the High resolution melting (HRM) method (Liew et al., 2004).

Table 1 shows the structure and frequency of the most common haplotypes encountered among the 206 chromosome. This dense panel of SNPs (1 every 833 base pair, on average) allowed the fine description of the locus and distinguished a total of 56 different *TP53* haplotypes. Only three of them had a frequency above 0.1. Six other haplotypes had frequencies between 0.1 and 0.015, whereas 47 rare haplotypes had, collectively, a frequency of 0.28.

The genotyping and haplotyping of the 12 R337H carriers showed that the mutation is borne by the same haplotype ("haplotype 3"), in all subjects. In the HapMap Caucasians sample set the frequency of haplotype 3 was only 0.077. The enrichment within the R337H carriers (100%) was therefore evident. Taking a conservative estimate that the actual haplotype frequency is as high as 0.13, the probability that all the 8 unrelated R337H families bear, by chance only, at least one chromosome with the haplotype 3, is 1.22×10^{-5} . If we consider the frequency of 0.077 of the HapMap Caucasians sample, the probability is 2.31×10^{-7} . Thus, this observation demonstrates that R337H is exclusively present on haplotype 3, supporting a founder effect. The difference between haplotype 3 and the most common (wild-type) haplotype 1 is due to a single C > T variation on SNP rs9894946, that resides in the extra-genic region at the 3' side of *TP53* locus. Therefore, when only SNPs within the coding region of *TP53* were genotyped, haplotype 3 would have been erroneously included as a component of common haplotype 1. This could explain why the founder effect was not previously identified.

Thanks to their proximity, we confirmed the linkage disequilibrium between R337H and SNP rs9894946 by allele-specific-PCR and sequencing (Figure 1). Furthermore, we entirely sequenced the 24179 bp of the TP53 locus in two unrelated carriers and we did not detect any difference, suggesting that these two carriers have a recent common ancestor. To track the history and the possible origin of haplotype 3, we genotyped the African (90 samples) and Asian (90 samples) series of HapMap sample set, for a total of 360 chromosomes. The common haplotype 1 was seen mostly among Caucasians and Asians, but was very uncommon within Africans (only 3 of 180 chromosomes). Haplotype 3 is not detected in Asians nor Africans, but only in Caucasians at a frequency of 0.077. This observation supports the hypothesis that haplotype 3 is a caucasian haplotype that derives from haplotype 1 by the formation of a single nucleotide substitution at rs9894946. It is unknown whether R337H occurred before or after this haplotype was introduced in Brazil.

To assess the age-related penetrance and the tumour-specific risk associated to R337H, we have analyzed cancer accrual with age in R337H carriers and obligate carriers identified so far in Brazilian families. Figure 2a shows that penetrance increases from early childhood to reach 15% by the age of 10-15, followed by a plateau until the age of 30 years and then steadily increases to reach 80% by the age of 70 years. In classical LFS, the penetrance is of about 50% and 90% by the ages of 30 and 70 years, respectively. Thus, R337H appears to carry a lower risk of childhood and adolescent cancer than most other *TP53* germline mutants, although the lifetime risk is in the same range as for other mutants. Figure 2b shows the accrual with age for each of the main types of tumour diagnosed in these families. The most typical childhood cancer is adrenal cortical carcinoma (ADC; average age:10.8, range 1-36). Over half of the cases of renal (non Wilm's) and brain tumours also occur at a young age, but the accrual patterns of these cancers is biphasic, with the remaining cases occurring past the age of 30. Breast cancer is the most represented cancer type, occurring from the age of 24 to 64 (average age: 43.7). Gastric cancer, as well as several other cancer types, develop at later ages. An important difference in relation to the classical LFS phenotype is the relatively late occurrence of soft tissue sarcomas (average age: 41.8, range 2-59). In conclusion, the cancer phenotype associated with R337H mutation includes multiple cancers of the Li-Fraumeni spectrum, with a low penetrance before the age of 20 but a lifetime risk comparable to classical LFS. As an illustration of this phenotype, the extended pedigree of a representative R337H

family, including 19 R337H positive and 38 R337H negative individuals, is depicted in Figure 3.

Biochemical and biological studies have shown that the protein product of R337H has unique structural and functional properties. The mutation falls in a α -helix structure which is critical for the stability of p53 dimers. The R337 residue is involved in the donation of an H bond (to D352) that stabilizes dimerization. Replacement of R337 by H results in a pH-sensitivity for H bond donation, correlating with the protonated state of the histidine. A small change in pH from 7.5 to 8.0, within the physiological range, results in the unfolding of dimers and in the inactivation of the DNA-binding and transcriptional capacity of p53 *in vitro*. Although intracellular factors that regulate the dynamics of p53 dimerization, and its pH-dependency, are still unknown, this particular molecular feature may explain the conditional character of the R337H mutant. Full inactivation of R337H may require the contribution of co-factors such as modifier genes, or changes in the intracellular environment that may impact on p53 dimer stability. Thus, R337H represents a paradigm for a mutant with conditional penetrance. This concept would explain why, in the pedigree presented in Figure 3, some individuals with mutations do not develop any cancer, whereas the proband developed several independent primary lesions.

The R337H mutation was initially identified in children that developed adrenocortical carcinomas in families that did not spontaneously report a history of other cancers (R). Further assessment of these families indicated that at least some of them had histories of cancer that matched LFL definitions (B). However, this initial finding of an apparently specific association between R337H and risk of ADC is puzzling. In LFS/LFL families, childhood ADR is the type of cancer that shows the strongest statistical association with any type of *TP53* germline mutation. Its occurrence in a child is strongly suggestive of the existence of a germline *TP53* mutant. The conditional nature of R337H makes it compatible with wide variations in the familial tumor patterns, ranging from a narrow spectrum in families where p53 function is only partially inactivated (as maybe the case in families where ADC is the only or the main cancer phenotype), to a large spectrum typical of LFS/LFL in families where the function of p53 is more deeply disrupted. These variations make it extremely difficult to currently predict the individual risk of cancer in R337H carriers, and pose a complex challenge for counseling and surveillance. Studies on genetic modifiers and

other determinants of risk are needed to identify appropriate and flexible follow-up and clinical management strategies.

The widespread occurrence of a founder mutation in the ethnically mixed population of southern Brazil suggests that particular historical and demographic circumstances have played a role in the spread of the mutation. The development of settlements and cities in southern Brazil took place in the XVIII and XIX centuries along a road axis known as the “Tropeiro” route. Tropeiros were travelling merchants, mostly of Portuguese origin, who were operating as organized groups to carry a wide range of goods from the area of Sao Paulo to Porto Alegre, and return, during journeys that lasted for about 6 months to 1 year. Thus, we suggest that the R337H mutation might have spread in the area at the time that corresponds to the opening of the Tropeiro route and formation of many cities and villages. There is evidence that the founder ancestor might have been of Portuguese origin. Indeed, the only non-Brazilian R337H mutation carrier identified outside Brazil was an 8-year old girl with ADC originating from Portugal and referred to a center in France for genetic testing (Chompret et al. 2002). Haplotyping of her DNA using the set of 29 SNPs revealed identity with the Brazilian haplotype 3. Since the area of distribution of R337H is the most populated area of Brazil, with a population of over 105 millions, this allele may be present in up to 300 000 individuals, making it one of the most numerically frequent cancer predisposing alleles, similar to the three Ashkenazi *BRCA1* and *BRCA2* founder mutations (Roa et al. 1996). However, The R337H founder effect represents a unique situation where a founder mutation has persisted among a large, open and mixed population due to its molecular characteristics and conditional penetrance rather than to cultural or geographical segregation.

Acknowledgements

We thank Mrs Amanda Nobrega and Andrea Veloso for their outstanding work with the R337H families, Mrs Eloisa R Olivieri and Dirce Carraro for technical support. We are also deeply indebted to all the families for their participation and commitment. SG is supported by a PhD fellowship of the University of Pisa, Italy, and by a visiting scientist award from IARC. This work is supported by FAPESP 03/10121-8.

Figure Legends

Figure 1: Presence of R337H on Haplotype 3, characterized by SNP rs9894946

The linkage disequilibrium between R337H and SNP rs 9894946 was confirmed by using an Allele-Specific-Oligonucleotide PCR (ASO-PCR). Top: primer used for ASO- and nested PCR. Bottom left: Sequencing of a direct PCR product generated with the nested primers, showing heterozygosity (C/T) at rs 9894946. Bottom right: Sequencing of a nested PCR product from ASO-PCR, showing only the T allele of rs 9894946, characterizing Haplotype 3.

Figure 2: Penetrance of R337H

Accrual of tumors with age in R337H carriers, in percentage of affected subjects (Figure 2a) and cancer-specific accrual with age, in percentage of each specific cancer (Figure 2b).

Table 1. Most common haplotypes found in the analysed samples including 90 Caucasians (from HapMap DNA sample set), 8 unrelated carriers, one trio, and one mother-daughter duo, carriers of the R337H mutation.

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

Markers list: rs2287499, rs17551157, rs17883353, rs17882227, rs17885845, rs9903378, rs17881035, rs11656607, rs5819163, rs2078486, new, rs1642782, rs12944939, rs8079544, rs1642785, rs17878362, rs17883323, rs1042522, rs1794287, rs1625895, rs12947788, rs12949655, rs1641548, rs1641549, rs6503048, rs17880560, rs1614984, rs9894946, rs17886760

Bold: most common allele

Yellow highlight haplotype 3

The red highlight T at Marker 28 in haplotype 3 corresponds to the only difference with the most common allele, haplotype 1

ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com

Cancer Letters xxx (2007) xxx–xxx

CANCER
Letters

www.elsevier.com/locate/canlet

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

Edenir Inêz Palmero ^{a,b}, Lavínia Schüler-Faccini ^{a,c,d}, Maira Caleffi ^e,
 Maria Isabel Waddington Achatz ^f, Magali Olivier ^g, Ghyslaine Martel-Planche ^g,
 Virginie Marcel ^g, Ernestina Aguiar ^{b,h}, Juliana Giacomazzi ^{b,h},
 Ingrid Petroni Ewald ^{b,h}, Roberto Giugliani ^{a,b,c,d},
 Pierre Hainaut ^g, Patricia Ashton-Prolla ^{a,b,c,d,*}

^a Post-Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul (UFRGS), Brazil

^b Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisas Biológicas, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^c Department of Genetics, UFRGS, Brazil

^d Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil

^e Hospital Moinhos de Vento, Porto Alegre, Brazil

^f Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil

^g Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France

^h Post-Graduate Program in Medical Sciences, UFRGS, Brazil

Received 30 October 2007; received in revised form 30 October 2007; accepted 31 October 2007

Abstract

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

© 2007 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

* Corresponding author. Present address: Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Rua Ramiro Barcelos 2350, 90035-903 Porto Alegre RS, Brazil. Tel.: + 55 51 2101 8011; fax: + 55 51 2101 8010.

E-mail address: pprolla@hcpa.ufrgs.br (P. Ashton-Prolla).

Keywords: *TP53* mutations; Li–Fraumeni syndrome; Breast cancer predisposition; Inherited breast cancer

1. Introduction

Germline mutations in *TP53* are associated with inheritance of the Li–Fraumeni Syndrome (LFS, OMIM #151623), a rare autosomal dominant disorder characterized by a familial clustering of tumors, with a predominance of sarcomas, breast cancers, brain tumors and adrenocortical carcinomas, diagnosed before the age of 45 years [13,14]. Other cancers, such as leukemia, lung cancer, skin melanoma, colorectal cancer, gastric cancer, pancreatic cancer, and prostate cancer are also present in excess in some families and, in some cases, germ cell tumors, choroid plexus papilloma and Wilms tumor have been reported as part of the spectrum [8,9,11,3,20]. The diagnostic criteria were initially defined as presence in the family of one individual with sarcoma before the age of 45, one first-degree relative with any cancer of the LFS spectrum under the age of 45 and another first- or second-degree relative with any cancer under age 45 or sarcoma at any age. Germline mutations in *TP53* are found in 70% of cancer-prone families fulfilling this definition. Subsequently, a number of families with tumor patterns that resemble LFS but do not fulfill the original criteria have been described, leading to different definitions of Li–Fraumeni-like (LFL) syndromes. Germline *TP53* mutations are present in 20–40% of the families matching LFL definitions [3,7,16].

In a study of 45 Brazilian families matching at least one of the clinical definitions of LFL [1], six were found to carry a particular germline *TP53* mutation at codon 337 (CGC to CAC, arginine to histidine, R337H). This mutation has been initially identified in the germline of subjects from Southern Brazil who developed childhood adrenocortical carcinoma (ADC) but no other cancer, suggesting that R337H may exert tissue-specific effects and predispose exclusively to this tumor type [19]. In contrast with these observations, we have found that R337H was present in the germline of subjects from families with a wide spectrum of inherited cancers, compatible with LFL definitions. Of a total of 56 histologically confirmed tumors in six families, the most common tumor topographies were breast cancer (30.4%), soft tissue sarcomas (10.7), brain tumors (10.7%), adrenocortical carcinomas (8.9%) and gastric cancer (8.9%). Sequencing of *TP53* in a breast

cancer case showed loss of the wild-type allele and retention of R337H suggesting that the mutant allele played a role in the development of this tumour. Furthermore, there is evidence in these families that cancer risk segregates with R337H mutation carriage. However, R337H was detected in several unaffected family members, suggesting that the penetrance of this mutation may be lower than that of conventional *TP53* mutations associated with LFS/LFL [1]. Compatible with this hypothesis, biochemical evidence indicates that the mutation has special, pH-dependent functional properties. The mutant protein forms oligomers and retains wild-type activity at pH 7, but fails to do so at pH 8, thus displaying a mutant phenotype only in pH conditions at the upper limit of the physiological range [6]. This dependence upon subtle changes in biochemical conditions may explain the variable patterns of cancers in families who carry this mutation in the germline. Outside Brazil, this mutation has been reported only once in a French family [5]. The reason why R337H occurs at a high frequency in cancer-prone families in Southern Brazil is unknown. Analysis of hypervariable microsatellite *loci* within the *TP53* gene supports the hypothesis of a founder effect [17].

Taken together, the conditional character of this mutant as well as the possibility of a founder effect has led us to suggest that the mutant allele may be relatively common in the general population of Southern Brazil, but may express its deleterious properties only in particular physio-pathological contexts. In the present study, we have analyzed the presence of R337H in the germline of 750 healthy volunteers from the area of Porto Alegre, Brazil's southernmost capital. Here we report the presence of the mutant R337H in two Brazilian subjects (0.3%), who both belonged to the same family with a positive cancer history but without the LFS/LFL clinical profile.

2. Materials and methods

In the present study, we have assessed the prevalence of R337H in the germline of a consecutive group of 750 cancer-unaffected women aged 40–69, participating in a breast cancer mammography screening program that covers 18 health districts in the city of Porto Alegre [4]. All

Fig. 1. Detection of R337H by restriction fragment length polymorphism and sequencing. DNA extracted from peripheral blood was amplified by PCR to generate a 238-base pair product encompassing exon 10 and flanking splice sites. (A) Restriction length fragment polymorphism (RFLP) analysis with HhaI. Black arrowhead: uncleaved fragment (mutant); white arrowhead: cleavage products (wild-type). MW, molecular weight marker; BL, blank. S1 and S2 are two subjects with wild-type and mutant codon 337, respectively. (B) Sequencing of an independent PCR product of sample S2 showing a G to A transition at the second base of codon 337.

participants signed informed consent and provided a blood sample. At recruitment, demographic data and information on individual and familial risk of breast cancer (BC) were collected through a structured questionnaire.

DNA was extracted from peripheral blood using standard procedures [15] and amplified with primers hybridizing to *TP53* in introns 9 and 10 to generate a 238-base pair PCR product encompassing the entire exon 10 plus flanking splice sites. This product was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) using the restriction enzyme HhaI, which specifically cleaves a DNA sequence that is scrambled by mutation at codon 337 [1]. The uncleaved mutant allele was identified in 4% agarose gels after ethidium bromide staining, and the nature of the mutation was determined by bi-directional, automated sequencing of an independent PCR product (Fig. 1).

3. Results

All patients were cancer-unaffected, unselected for family history and reported no particular breast-related complaints at inclusion. The mean age of the participants was 51.1 years and the majority of women were found to have either no abnormalities or benign findings on mammography (BIRADS 1, 2 or 3: 99.1%).

The R337H mutant was detected in two of the 750 participants (0.3%). Clinical examinations of the breast and mammographies were normal (BIRADS 1) in both participants, and none of them reported a previous diagnosis of cancer. However, the two participants reported a familial history of cancer, and were found to be fourth-degree relatives (Fig. 2). The participants (III.6 and IV.12) were re-contacted, informed of their results, and additional at-risk family members were invited to participate in the study. Those interested in participating provided an extended family history and a blood sample for R337H testing after informed consent. The mutation was found in three addi-

tional family members: one woman affected with breast cancer at the age of 36 years (IV.13) and two asymptomatic 62- and 80-year-old women (II.2, III.12). Furthermore, genotyping for three common polymorphisms in intron 2 (PIN2, rs1642785) [18] intron 3 (PIN 3) [12,10] and exon 4 (PEX4, rs1042522) [2] indicated that subjects with R337H share a common set of polymorphisms, compatible with the hypothesis that the same mutant haplotype is present in all R337H carriers.

4. Discussion

The results observed in this study suggest a much higher prevalence for the R337H mutant than that of other *TP53* germline mutations causing the LFS/LFL syndromes in the general population. The two subjects that were initially found to be R337H carriers belonged to a large family in which eight cases of cancer were ascertained, five of whom are part of LFS tumor spectrum. However, the tumor pattern observed in this pedigree does not match any of the clinical definitions of well-characterized cancer predisposition syndromes, including classical LFS and LFL criteria. This may explain why this family has not been so far recognized as at-risk for familial cancer. These observations do not by themselves support the conclusion that R337H is causally related to an increased risk of multiple cancers. However, taken together with our previously reported results in R337H families recruited in high-risk cancer genetics clinics (see Introduction, [1]), they concur to identify R337H as a low-penetrance mutation which is common in the population of Southern Brazil. Taken together, the information available on tumor patterns in R337H carriers suggests that the mutation has a

Fig. 2. Pedigree of the two asymptomatic R337H carriers participating in a mammography screening program (III.6 and IV.12). Cancer-affected individuals are shown in blackened symbols. Arrow indicates proband; current age is indicated in parenthesis. Dx, age at diagnosis; d, age at death; WT, wild-type.

low penetrance and it is likely that many carrier families may remain unaffected throughout life. On the other hand, some families with R337H appear to develop familial syndromes of the LFS/LFL type. In between, some R337H families present tumor patterns that show only one of the LFS/LFL traits, such as an excess of childhood ADC. It is therefore likely that other, yet unidentified genetic factors may act as modifiers of R337H penetrance and phenotype.

To our knowledge, this is the first study to report detection of a germline *TP53* mutation associated with an increased risk of developing several types of cancer in a population-based screening program. So far, individuals with germline *TP53* mutations have been detected in the course of genetic testing for high-risk families reporting to a cancer genetics clinic on the basis of a suspicious family history. These results suggest that the R337H allele may be present in a small but significant proportion of the general population in Southern Brazil, raising new, unprecedented clinical and ethical challenges. On the basis of current knowledge, however, care should be exercised in the detection, information and management of subjects who are R337H carriers.

The strict follow-up as recommended in LFS/LFL families should be proposed only if justified by familial history. Surveillance should take into account the possibility of an increased risk of multiple cancers, and not exclusively childhood ADC. In particular, initiatives for testing children in a population-based setting for identifying subjects at risk for childhood ADC should be reviewed with extreme caution because of the ethical and clinical implications over the lifetime of subjects who would be detected as R337H carriers. It is therefore essential to focus efforts on assessing the risk of cancer associated with R337H carriage, and on identifying modifiers that may help to better predict who could be at higher risk among R337H carriers.

Acknowledgements

The Núcleo Mama Cohort, from which the patients derive, is maintained by Associação Hospitalar Moinhos de Vento, in a partnership with Instituto da Mama do Rio Grande do Sul and the Municipal Health Agency from Porto Alegre. The authors thank Drs. Dakir Duarte Filho, Ademar José Bedin Júnior and Fávio Marcel Telis Gonzalez,

Patricia Izetti Lisboa Ribeiro, Giovana Skonieski and other members of the NMPOA Team for their essential role in recruiting and managing the NMPOA cohort. This study was supported in part by the following grants: Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq, Grant No. 40.0949/2005-9) to R. Giugliani; Susan G. Komen for the Cure (Grant POP 0403033) to P. Ashton-Prolla, Fundação de Incentivo à Pesquisa Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA, Project 05-182) to L. Schüler-Faccini; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES – PRODOC Grant No. 00202/03-7) to P. Ashton-Prolla. EI Palmero was supported in part by grants from The International Agency for Research in Cancer (IARC) and CNPq (Process No. 203732/2005-7).

References

- [1] M.I.W. Achatz, M. Olivier, F. LeCalvez, G. Martel-Planche, A. Lopes, B.M. Rossi, P. Ashton-Prolla, F.R. Vargas, J.C. JCasali da Rocha, A.L. Vettore, P. Hainaut, The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li–Fraumeni and Li–Fraumeni-like syndromes in Brazilian families, *Cancer Lett.* 245 (2007) 96–102.
- [2] G. Beckman, R. Birgander, A. Sjalander, N. Saha, P.A. Holmberg, A. Kivela, L. Beckman, Is p53 polymorphism maintained by natural selection?, *Hum Hered.* 44 (5) (1994) 266–270.
- [3] J.M. Birch, A.L. Hartley, K.J. Tricker, J. Prosser, A. Condie, A. Kelsey, M. Harris, P.H.M. Jones, A. Binchy, D. Crowther, A.W. Craft, O.B. Eden, G.R. Evans, E. Thompson, J.R. Mann, J. Martin, E.L.D. Mitchell, M.F. Santibañez-Koref, Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li–Fraumeni families, *Cancer Res.* 54 (5) (1994) 1298–1304.
- [4] M. Caleffi, P. Ashton-Prolla, B. Weber, J.M. Zignani, E.C. Dias, L.P. Antunes, A. Bedin Jr., E. Lisboa, M. Graudenz, P.R. Pohlmann, D. Duarte Filho, Breast cancer screening in 10,000 women of an underserved population in South Brazil: The NMAMAPOA cohort, *J. Clin. Oncol.* 23 (16 S) (2005) 877s, abstract# 9664.
- [5] A. Chompret, L. Brugieres, M. Ronsin, M. Gardes, F. Dessarps-Freichy, A. Abel, D. Hua, L. Ligot, M.G. Dondon, B. Bressac-de Paillerets, T. Frebourg, J. Lemerle, C. Bonaiti-Pellie, J. Feunteun, P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals, *Br. J. Cancer* 82 (12) (2000) 1932–1937.
- [6] E.L. DiGiammarino, A.S. Lee, C. Cadwell, W. Zhang, B. Bothner, R.C. Ribeiro, G. Zambetti, R.W. Kriwachi, A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer, *Nat. Struct. Biol.* 9 (1) (2002) 12–16.
- [7] R.A. Eeles, Germline mutations in the TP53 gene, *Cancer Surv.* 25 (1995) 10–24.
- [8] T. Frebourg, N. Barbier, Y.X. Yan, J.E. Garber, M. Dreyfus, J. Fraumeni Jr., F.P. Li, S.H. Friend, Germ-line p53 mutations in 15 families with Li–Fraumeni syndrome, *Am. J. Hum. Genet.* 56 (3) (1995) 608–615.
- [9] J.E. Garber, E.M. Burke, B.L. Lavalley, A.L. Billett, S.E. Sallan, R.M. Scott, W. Kupsky, F.P. Li, Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome, *Cancer* 66 (12) (1990) 2658–2660.
- [10] F. Gemignani, V. Moreno, S. Landi, N. Moullan, A. Chabrier, S. Gutierrez-Enriquez, J. Hall, E. Guino, M.A. Peinado, G. Capella, F. Canzian, A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA, *Oncogene* 23 (10) (2004) 1954–1956.
- [11] A.L. Hartley, J.M. Birch, K. Tricker, S.A. Wallace, A.M. Kelsey, M. Harris, P.H. Jones, Wilms’ tumor in the Li–Fraumeni cancer family syndrome, *Cancer Genet. Cytogenet.* 67 (2) (1993) 133–135.
- [12] V. Lazar, F. Hazard, F. Bertin, N. Janin, D. Beller, B. Bressac, Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene, *Oncogene* 8 (6) (1993) 1703–1705.
- [13] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr., Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome, *J. Natl. Cancer Inst.* 43 (6) (1969) 1365–1373.
- [14] F.P. Li, J.F. Fraumeni Jr., J.J. Mulvihill, W.A. Blattner, M.G. Dreyfus, M.A. Tucker, R.W. Miller, A cancer family syndrome in twenty-four kindreds, *Cancer Res.* 48 (18) (1988) 5358–5362.
- [15] S.A. Miller, D.D. Dykes, H.F. Polesky, A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells, *Nucleic Acids Res.* 16 (3) (1988) 1215, Feb 11.
- [16] M. Olivier, R. Eeles, M. Hollstein, M.A. Khan, C.C. Harris, P. Hainaut, The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users, *Hum. Mutat.* 19 (6) (2002) 607–614.
- [17] E.M. Pinto, A.E. Billerbeck, M.C. Villares, S. Domence, B.B. Mendonca, A.C. Latronico, Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* 48 (5) (2004) 647–650.
- [18] L.M. Pleasants, M.F. Hansen, Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene, *Hum. Genet.* 93 (5) (1994) 607–608.
- [19] R.C. Ribeiro, F. Sandrini, B. Figueiredo, G.P. Zambetti, E. Michalkiewicz, A.R. Lafferty, L. De Lacerda, M. Rabin, C. Cadwell, G. Sampaio, I. Cat, C.A. Stratakis, R. Sandrini, An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98 (16) (2001) 9330–9335.
- [20] L.C. Strong, M. Stine, T.L. Norsted, Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives, *J. Natl. Cancer Inst.* 79 (6) (1987) 1213–1220.

Anexo 8. Achatz MIW, Ashton-Prolla P, Hainaut P. A highly prevalent *TP53* mutation predisposing to multiple cancers in the Brazilian population: case for newborn screening ?

A highly prevalent *TP53* mutation predisposing to multiple cancers in the Brazilian population: case for newborn screening ?

Maria Isabel Waddington Achatz, Patricia Ashton-Prolla, Pierre Hainaut

Germline *TP53* mutations are the underlying genetic defect of the Li-Fraumeni Syndrome (LFS, OMIM #151623), a complex autosomal dominant syndrome characterized by the early occurrence of multiple cancers (Li et al. 1988, Malkin et al. 1990). The spectrum of tumors in *TP53* mutation carriers includes childhood brain, renal and adrenocortical cancers, soft tissue and bone sarcomas in adolescents and breast as well as several other cancers in young adults. The penetrance at the age of 30 years is of approximately 50%, with a lifetime risk of developing cancer over 90% in mutation carriers (Birch et al. 2001; Olivier et al. 2003). Studies in the USA and in Europe have shown that, in general, germline *TP53* mutations occur at the low rate of about 1:5.000 individuals (Lalloo et al. 2003).

Recent studies in cancer-prone families of Southern Brazil have identified a founder germline *TP53* mutation at an unusually high prevalence (Achatz et al. 2007). In a region of the country that encompasses the States of Paraná, Santa Catarina and Rio Grande do Sul, a *TP53* mutant at codon 337 (GCG to GAC, arginine to histidine, nucleotide 17588) occurs at a frequency of about 1:300 subjects (0.3%), over 10 times more commonly than estimated for other germline *TP53* mutations (Palmero et al. 2008; ref site TP). Initial studies on the *TP53* R337H mutation have claimed that the main, if not exclusive, cancer risk in carriers is adrenal cortical carcinoma, occurring from the age of 12 months with a penetrance of about 10% by the age of 12 years (Ribeiro et al. 2001; Figueiredo et al. 2006). However, a more thorough ascertainment of many families with this mutation has shown that cancer risk is much broader and may encompass the full spectrum of tumors associated with the Li-Fraumeni Syndrome, in particular early breast cancer (mean age at diagnosis < 40 years). In addition, current data on overall cancer penetrance suggest that the age-related cancer risk is somewhat lower than in LFS, with tumors detected in about 25% of carriers at the age of 30 years and a lifetime risk of about 80% (Garritano et al., submitted). The high carrier frequency of the *TP53* R337H mutant is in the range of that observed for carriage of germline *BRCA1* and *BRCA2* mutations in non-Ashkenazi individuals (1:300-1:600) and of the common K304E mutation in the MCAD gene associated with Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (1:100-1:200). Testing for the latter has been recently introduced in newborn screening programs of Australia, Germany, USA and UK (UKCSNS- MCADD SITE). Thus, the high population prevalence of this mutation in Southern Brazil, in addition to evidence that

adrenocortical carcinoma is a major risk in young carriers, has led to the implementation of systematic newborn screening in the Brazilian State of Paraná in 2005 (Piovezan 2006).

Newborn genetic screening has heavy clinical, ethical and societal implications. In 1968, Wilson and Jungner laid out a number of clear criteria setting up a framework for the development of newborn screening programs. In table 1, we have compiled in a synthetic form the scientific and medical evidence currently available on the R337H *TP53* mutant allele, its phenotypic effect in carriers and its detection, in relation to each of Wilson and Jungner's criteria.

There is no doubt that several of these criteria are met in the present context. First, cancer is a significant health problem which is treatable, and often curable, if detected at an early stage. Second, according to current estimates, the R337H mutation is present in an important fraction of the population in Southern Brazil. Pilot prevalence studies in the States of Rio Grande do Sul and Paraná have both detected carrier frequencies in the range of 0.3%. However, the prevalence outside these areas, as well as its variations among communities and ethnic groups, is not known. Third, the test (evaluation of a single nucleotide change at codon 337) is relatively easy to perform using a minimal blood sample and procedures that do not cause significant harm for newborns and families. Fourth, the benefits of curing cancer in those individuals who develop adrenocortical carcinoma due to early diagnosis are huge in comparison with the costs of testing. Based on current estimates of age-related penetrance, the burden of early life cancers due to R337H may represent up to 5 to 10% of all childhood and early adult cancers in the population, and up to 1-5% of all cancers before the age of 70 years.(Figure 1)

Figure 1 – mutation associated cancer burden

In contrast, it is also clear that several criteria are not met, due not only to insufficient knowledge of the natural history of the disease, but also to the nature of the test, which identifies a cancer predisposing

mutation but does not actually detect a preclinical phase of the disease. First, studies on cancer-prone families carrying the R337H mutation show that the individual risk of cancer is extremely variable and several cancer-unaffected adult carriers have been identified. There is evidence that different genetic traits act as modifiers of the penetrance, including a SNP in *MDM2* (SNP309), the principal regulator of p53 protein stability and several intragenic *TP53* polymorphisms. Other modifiers may exist, as well as interactions with low penetrance mutations associated with other forms of inherited cancer (e.g. variations in *ATM* or *CHEK2*, that predispose to breast cancer through genetic pathways that also involve *TP53*). Thus, the current knowledge is insufficient to accurately predict the individual risk of cancer based on the sole detection of the R337H mutation. In the absence of such knowledge, and in light of the existing evidence, subjects that carry the mutation should be followed up for a significant risk of multiple cancers throughout lifetime. Second, identification of the mutation does not in itself correlate directly with a preclinical phase.

Mutation positive subjects must be directed to medical follow-up within strict protocols in order to detect early cancer. However, the range and scope of the protocols applicable to Li-Fraumeni subjects is still a matter of debate. Current guidelines are based on annual clinical follow-up with additional imaging (mammography, colonoscopy) when appropriate (NCCN site). A recent study shows that whole body PET scan imaging in carriers of *TP53* germline mutations (other than R337H) can detect early, preclinical cancer lesions. However, in the case of the R337H mutation, there is currently no data to determine what is the appropriate scope and method for cost-effective monitoring and follow-up in carriers. Third, newborn screening may be associated with considerable psychological and social risks to screened subjects and their families, since the exact impact and outcomes of a positive result are not well defined. Current guidelines on Li-Fraumeni Syndrome do not recommend newborn or childhood testing. There is no clear procedure to control the use and dissemination of the information on screening results, nor to provide a counseling framework of *when* screening results will be informed to the subjects and *what* will be the content of information on the lifetime attributable risks for developing cancer. Knowledge of carriage of a deleterious *TP53* mutation may have a profound psychological impact as well as adverse effects on employment, marriage or social integration.

The implementation of a test into mandatory newborn screening programs should begin with demonstration of the clinical validity (the test correctly identifies future disease risk) and clinical utility (a clear guideline of effective interventions to reduce risk and/or improve health of those with positive results) of the test. Historically, many NBS tests were introduced under the assumption that they would lead to improved health and pose little or no risk to the subjects being tested, without any previous population-based studies addressing both clinical validity and utility (AAP Newborn Screening Task Force 2000). Due to several examples of exposure to unforeseen and unnecessary risks, there has been an increasing effort to conduct critical and comprehensive pilot studies on the implementation of newborn screening tests *before* their introduction in newborn screening programs (Atkinson et al., 2001; Woods et al., 2002; American Thoracic Society/European Respiratory Society, 2003; Grosse et

al. 2004). An important discussion within that scope is the need for individual informed consent, which is currently not obtained for newborn screening programs in many countries, including Brazil. Such procedure would be particularly important in the situation we are discussing here, which involves predictive testing of minors for a cancer predisposing allele whose penetrance is not entirely determined. In clinical settings, there is a strong recommendation for offering predictive and even diagnostic germline *TP53* mutation testing only after informed consent has been obtained (Li et al. 1992; Frébourg et al., 2001; Malkin et al., 2004; Prochazkova et al. 2008). In addition, the beneficial and harmful effects associated with the process of predictive testing itself on the newborn's parents and family, which have been demonstrated in several studies and are independent from the actual test results, must be considered and are very difficult to address in a setting of mass population screening (Duncan et al., 2008; McConkie-Rosell et al., 2008).

We conclude that, in the current context of scientific knowledge, the R337H mutation does not meet the appropriate criteria for mass newborn screening outside a comprehensive familial cancer risk evaluation, and that screening and counseling programs based on the exclusive risk of childhood adrenal cortical carcinomas are not sufficient given the potentially broad range of adult cancers associated with the mutation. We would like to emphasize the need for increased awareness, information and training of the medical community to better identify families with high cancer risk and refer them to structured cancer risk evaluation programs for a detailed assessment of hereditary cancer patterns. Due to the high prevalence of the R337H mutation, testing in a familial context should be considered as an alternative in families that match the clinical definition of any syndrome with multiple inherited tumors and in whom mutation testing for candidate genes such as *BRCA1* and *BRCA2* or mismatch repair genes has given negative results. Finally, newborn and/or childhood predictive genetic testing in already diagnosed R337H families may be considered on a case-by-case basis. However, counseling and follow-up should take into account the current knowledge on age and tumour-specific penetrance of the mutation, which may range from single-case diagnoses to families with the full Li-Fraumeni spectrum, and also limitations in the ability to predict, among carriers, who will develop cancer and when. It remains essential to concentrate efforts on assessing the risk of cancer associated with R337H carriage, and on identifying modifiers of its penetrance.

Table 1. Does newborn screening for the germline *TP53* mutation R337H meet the Wilson and Jungner criteria ?

Criteria	Met (Yes/No)	Comment
Condition to be screened should be a significant health problem	Yes	Risk of childhood cancer (adrenal cortical carcinoma, renal cancer, brain cancer): 10-15% by age 15; Lifetime risk of multiple cancers: 80%. Estimated prevalence of the mutation in the population of Southern Brazil: 0.3%.
The natural history of the condition should be well known	No	Factors that determine individual risk are not sufficiently known, including, in particular, the effect of modifier genes.
Condition should have a detectable preclinical phase	No	Germline R337H mutation is detectable ahead of any symptom; However it is not in itself a preclinical phase, and merely identifies subjects who are at increased risk for developing cancer, it does not predict accurately cancer type or age of occurrence.
Early detection should be beneficial as compared to late detection	Yes	Early cancer detection ensures, in most cases, access to curative treatment protocols.
An appropriate test should be available for application during the early phase	Yes	Mutation screening is feasible at birth, as a presymptomatic test.
Test must follow an accepted procedure	Yes	Mutation testing can be performed on a minimal blood sample
Risks, physical as well as psychological, must be less than benefits	No	There is considerable psychological and social risk associated with newborn detection for a mutation associated with a high lifetime risk of cancer, without provision of appropriate counseling to parents, patients and at-risk relatives.
Costs must be modest as compared to benefits	Yes	Costs would be modest with respect to years of life saved, in particular for childhood cancer.
	No	With an R337H carrier frequency of approximately 0.3% in Southern Brazil, the lifetime follow-up and screening of all mutation-positive individuals with adequate imaging and cancer detection methods entails considerable costs in infrastructure and manpower, which are not met at present

References

AAP Newborn Screening Task Force. Newborn Screening: A blueprint for the future executive summary: Newborn screening taskforce report. *Pediatrics* 106:389-427 (2000).

Achatz, M.I. *et al.* The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 245, 96-102 (2007)

American Thoracic Society/European Respiratory Society. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am J Respir Crit Care med* 168:818-900 (2003).

Atkinson *et al.* A public health response to emerging technology: Expansion of the Massachusetts newborn screening program. *Public Health Rep* 116:122-131 (2001).

Birch, J.M. *et al.* Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 20, 4621-4628 (2001).

Duncan *et al.* "You're one of us now": Young people describe their experiences of predictive genetic testing for Huntington Disease (HD) and Familial Adenomatous Polyposis (FAP). *Am J Med Genet C* 148C:47-55 (2008).

Figueiredo, B.C. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 43:91-96 (2006).

Frébourg *et al.* Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. *Bull Cancer* 88:581-587 (2001).

Grosse *et al.* Newborn screening for cystic fibrosis: evaluation of benefits and risks and recommendations for state newborn screening programs. *MMWR Recomm Rep* 53:1-36 (2004).

Lalloo, F. *et al.* Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet* 361, 1101-1102 (2003).

Li, F.P. *et al.* A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 48, 5358-5362 (1988).

Li F.P. *et al.* Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* 47:381-386 (1992).

Malkin, D. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250, 1233-1238 (1990).

Malkin D. Predictive genetic testing for childhood cancer: taking the road less traveled by. *J Pediatr Hematol Oncol* 26:546-549 (2004).

McConkie-Rosell *et al.* Living with genetic risk: effect on adolescent self-concept. *Am J Med Genet C* 148C:56-69 (2008).

Olivier, M. *et al.* Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res.* 63, 6643-6650 (2003).

Palmero,E.I. *et al.* Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett.* 261, 21-25 (2008).

Prochazkova et al. A rare tumor and an ethical dilemma in a family with a germline TP53 mutation. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 180:65-69 (2008)

Ribeiro,R.C. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98, 9330-9335 (2001).

Woods et al., Screening of infants and mortality due to neuroblastoma. *N Engl J Med* 346:1041-1046 (2002)

Anexo 9. Marcel V, Palmero E, **Achatz MIW**, Martel-Planche G, Ashton-Prolla P, Moine H, Hall J, Van Dyck E, Hainaut P. p53PIN3 polymorphic motif is a modifier of TP53 mutations in Li-Fraumeni Syndrome and is contained in G-quadruplex structures involved in the regulation of alternatively spliced p53 transcripts. *Manuscript in preparation.*

p53PIN3 polymorphic motif is a modifier of TP53 mutations in Li-Fraumeni Syndrome and is contained in G-quadruplex structures involved in the regulation of alternatively spliced p53 transcripts

Virginie Marcel¹, Edenir Palmero¹, Maria Isabel Waddington Achatz², Ghyslaine Martel-Planche¹, Patricia Ashton-Prolla³, Hervé Moine⁴, Janet Hall⁵, Eric Van Dyck¹ and Pierre Hainaut^{1,*}

¹Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon Cedex 08, France

²Department of Oncogenetics, Hospital A.C.Camargo, São Paulo, Brazil.

³Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul and Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil.

⁴Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS (UMR7104)/INSERM (U596)/ULP/College de France, 67404 Illkirch, France

⁵INSERM U612: Institut Curie-Recherche, Orsay, France

*Corresponding author. Molecular Carcinogenesis and Biomarkers Group, International Agency for Research on Cancer, 150 cours A. Thomas, Lyon Cedex 08, France.
Tel.: + (33) 4 72 73 84 62; Fax: + (33) 4 72 73 83 22; E-mail: hainaut@iarc.fr

Running title: Polymorphic *G-quadruplexes* in *TP53*

Keywords: *G-quadruplex* / isoform / p53 / polymorphism / splicing / Li-Fraumeni syndrom / mutations

Li-Fraumeni Syndrome (LFS) and its variant Li-Fraumeni-Like Syndrome (LFL) are characterized by familial predisposition to multiple early onset cancers in association with germline *TP53* mutations. Individual and familial LFS/LFL phenotypes are heterogeneous, suggesting a role for modifier factors. The p53PIN3 polymorphism consists in a duplication of 16 bp in intron 3 (rs17878362; A1: major non-duplicated allele; A2: minor duplicated allele - frequency in Caucasians: 0.2). Here, we show that p53PIN3 has a modifier effect on LFS/LFL. In a series of 109 cancer affected LFS/LFL patients, cancer diagnosis occurred on average 17.1 years later in *TP53* mutation carriers with one p53PIN3 A2 allele than in those with the A1/A1 genotype ($P < 0.01$). The p53PIN3 motif is embedded within a G-rich domain that forms *G-quadruplex* structures with different topology in A1 and A2 alleles.

Site-directed mutagenesis and treatment with TMPyP4, a cationic porphyrin that binds *G-quadruplexes*, showed that these structures modulated alternative splicing of intron 2. In p53 mRNA, retention of intron 2 leads to the synthesis of Δ Np53, an isoform inhibiting wild-type p53 suppressive functions. We suggest that differential expression of p53 isoforms, due to the polymorphic *G-quadruplexes* in intron 3, is responsible for the effect of p53PIN3, the strongest *TP53* modifier identified to date.

Introduction

The tumor suppressor p53 protein controls anti-proliferative events in response to various cellular stresses {Vousden, 2007 #2}, and somatic *TP53* mutations have been identified in 50% of sporadic cancers. Germline *TP53* mutations are the underlying genetic defect in Li-Fraumeni (LFS) and its variant, Li-Fraumeni-like (LFL) Syndrome, autosomal dominant disorders that lead to multiple and early onset cancers {Petitjean, 2007 #32}. The most common cancers in germline *TP53* mutation carriers are breast cancers, soft tissue and bone sarcomas, brain tumours and adrenocortical carcinomas. However, tumor patterns show wide familial and individual variations that are not accounted for intrinsic biological differences between distinct *TP53* mutants {Olivier, 2003 #9}. The p53R72P polymorphism, a non-silent SNP at codon 72, and the *MDM2* SNP309, located in the promoter of the main regulator of p53 stability, Mdm2, have been shown to be genetic modifiers that accelerate tumor onset in *TP53* mutation carriers {Bond, 2006 #37; Bougeard, 2006 #36}.

The *TP53* gene is highly polymorphic and several polymorphisms are associated with cancer susceptibility (<http://www-p53.iarc.fr/index.html>) {Petitjean, 2007 #32}. A frequent polymorphism, p53PIN3, occurs in intron 3 and consists of a single repeat of 16 bp (rs17878362) {Lazar, 1993 #23; Runnebaum, 1994 #1}. The A2 allele, carrying the duplication, is present in about 20% of the Caucasian population (reference). Several case-control studies have shown associations between the A2 allele and cancer susceptibility, especially for ovarian, colorectal, breast and lung cancers {Gemignani, 2003 #7; Hung, 2006 #20; Runnebaum, 1995 #26; Wang-Gohrke, 2002 #6}. In addition, reduced levels of p53 mRNA were found in A2/A2 lymphoblastoid cell lines compared with A1/A1 cells {Gemignani, 2003 #7}. Overall, these results suggest that the A2 allele may be a risk allele in sporadic cancer that exhibits decreased efficacy of the suppressive response mediated by its protein product.

TP53 gene expression is complex, with several transcripts encoding isoforms carrying distinct N- and C-termini {Bourdon, 2005 #3}. The main proximal promoter generates transcripts with two different 5' regions, the fully spliced p53 (FSp53) and p53I2. FSp53

mRNA encodes the canonical p53 protein exerting tumour suppressor activities. The p53I2 mRNA is an alternatively (?) spliced variant retaining intron 2, which contains stop codons {Ghosh, 2004 #22; Matlashewski, 1987 #13}. The use of ATG at codon 40 as an alternative translation start site either from the FSp53 or p53I2 mRNAs produces the Δ Np53 isoform, lacking 39 residues that contain the main transactivation domain {Courtois, 2002 #16; Ghosh, 2004 #22}. Consequently, Δ Np53 is deficient in its capacity to transactivate p53 target genes. When expressed in excess as compared to p53, Δ Np53 inhibits p53 transcriptional activity and interferes in cell cycle control and apoptosis by exerting a dominant-negative effect through hetero-oligomerization {Courtois, 2002 #16; Ghosh, 2004 #22; Yin, 2002 #5}. Thus, factors that affect p53 alternative splicing may have an impact on the regulation of suppressor functions.

In this study, we have investigated whether the p53PIN3 polymorphism may act as a phenotype modifier in 109 cancer-affected individuals from LFS/LFL families recruited in Southern Brazil {Achatz, 2007 #34; Palmero, 2008 #35}. We report that p53PIN3 status had an accelerating effect on tumor onset, TP53 mutation carriers with the A1/A2 genotype having their first cancer around 17.1 years later than A1/A1 mutation carriers.

The sequence context of p53PIN3 is typical of *G-quadruplexes*, tertiary structures formed by the association of planar surfaces build by four guanines. To determine how this intronic polymorphism may act as modifier, we investigated the implication of the p53PIN3 sequence in a regulatory event modulating p53 expression.

First, we observed that the p53PIN3 sequence is embedded within *G-quadruplexes* structures located in intron 3. By experimental modulation of *G-quadruplex* formation, we secondly observed that these structures are involved in the regulation of alternative splicing of intron 2 in A1 allele. Finally, we analyzed the impact of the p53PIN3 A2 allele in *G-quadruplex* formation and function that exhibits some differences as compared to A1 allele. These observations showed that polymorphic *G-quadruplexes* induce a differential expression of alternative p53 transcripts depending on p53PIN3 status and may be a mechanism explaining the modifier effect on TP53 mutations in Li-Fraumeni Syndrome.

Results

p53PIN3 status and differential age of tumour onset in Li-Fraumeni patients

To investigate whether the p53PIN3 polymorphism is associated to increased cancer susceptibility we analysed the age of tumour onset according to both p53PIN3 and TP53 mutation status in 109 cancer affected patients from 95 Brazilian families with the LFS/LFL phenotype (Fig. 1). In this series, no patient with the p53PIN3 A2/A2 genotype was identified; this combination has also not been observed in Caucasian populations

(Ref/Charlotte). Eighty-six patients carried a wild-type *TP53* gene and presented the same mean age of tumour onset independently of *p53PIN3* status (A1/A1: 40.73 years $\pm$ 18.78; A1/A2: 43.15 years $\pm$ 15.39) (Fig. 1A). However, a significant difference of age of tumour onset was observed in 33 *TP53* germline mutation carriers depending upon their *p53PIN3* genotype (Fig. 1B). Homozygous A1/A1 patients developed their first tumours at a mean age of 29.99 years $\pm$ 14.54, while A1/A2 patients were first diagnosed with cancer at a mean age of 47.00 years $\pm$ 9.17, indicating that A1/A1 patients developed their first tumours 17 years earlier than A1/A2 patients (P-value < 0.01). In addition, the worst cancer susceptibility was associated to patients with germline *TP53* mutations and a *p53PIN3* A1/A1 genotype as compared to wild-type *TP53* *p53PIN3* A1/A1 or mutant *TP53* *p53PIN3* A1/A2 individuals. These observations indicate that the *p53PIN3* polymorphism has a modifier effect on *TP53* germline mutations in LFS/LFL, the rare A2 allele being associated with a delay in the onset of cancers associated with such mutations.

G-quadruplexes in A1 intron 3 of TP53 gene

To understand the modifier effect of the intronic *p53PIN3* polymorphism, we analyzed the A1 sequence context in which this polymorphism occurs. *TP53* intron 3 is a short guanine-rich sequence (33%) (Fig. 2A). Series of consecutive guanines are over-represented, in particular in the 5' end. The ratios of adjacent identical residues (G)_n (C)_n (A)_n (T)_n are 4:3:2:1, 6:1:0:1, 1:0:0:0 or 1:0:0:0, for $n = 2, 3, 6$ or 7 respectively. G-rich sequences have a propensity to fold into four-stranded, monovalent cation-dependent structures called *G-quadruplexes* {Simonsson, 2001 #17}. These structures are formed by the interaction of four guanines, two by two in a cyclic Hoogsteen hydrogen bonding arrangement termed a G-tetrad, and by the stacking of several G-tetrads (Fig. 2B,C). It is estimated that over 376,000 *G-quadruplexes* are present in the genome, preferentially located in non-coding regions, these structures being involved in gene expression control by affecting promoter activity or splicing {Gomez, 2004 #25; Huppert, 2005 #8; Qin, 2007 #4}. To analyze the capacity of the guanine-rich motifs in A1 intron 3 to form *G-quadruplexes*, the Quadfinder server and the web-based server QGRS Mapper were used for predicting quadruplex-forming sequences {Kikin, 2006 #14; Scaria, 2006 #19}. Using default parameters, analysis of A1 intron 3 predicted up to 5 sequences capable of forming *G-quadruplexes* containing the *p53PIN3* motif (Supplementary Fig. S1).

To demonstrate the formation of *G-quadruplexes* in A1 intron 3 *in vitro*, we analyzed synthetic RNA sequences derived from A1 intron 3 using the reverse transcriptase (RT) elongation assay {Weitzmann, 1996 #10}. This method takes advantage of the differential

salt-dependent stability of *G-quadruplexes* to identify structures that interfere with RT elongation. K^+ stabilizes *G-quadruplexes*, leading to a K^+ -dependent block of cDNA synthesis, whilst in the presence of Na^+ , the *G-quadruplex* stabilization is reduced, allowing complete cDNA synthesis. A long RT product corresponding to the entire A1 intron 3 RNA was observed in presence of Na^+ (Fig. 2D, lane 5). However in the presence of K^+ , premature stops of RT elongation were observed (lane 6). RT-stops mapped at positions corresponding to guanines on sequencing analysis, matching those predicted to form the 3' end of the *G-quadruplexes*. The detection of several RT-stops with different intensities is compatible with *in silico* predicted conformers within intron 3 (Supplementary Fig. S1). Finally, we observed that in the A1 allele, *G-quadruplexes* overlap the p53PIN3 motif (Fig. 2D) {Lazar, 1993 #23}. Overall, these observations demonstrate the formation of intra-molecular *G-quadruplexes* in A1 intron 3.

Effect of *G-quadruplexes* on p53 splicing in A1 p53PIN3 context

G-quadruplexes regulate the expression and splicing of several genes {Christiansen, 1994 #28; Cogan, 1997 #31}. Because alternative splicing of *TP53* involves retention (i.e. p53I2) or skipping (i.e. FSp53) of intron 2, we examined whether *G-quadruplexes* in A1 intron 3 were involved in the regulation of this splicing by using the cationic porphyrin TMPyP4, an intercalating molecule that modulates *G-quadruplex* structures. The effects of TMPyP4 on expression of FSp53 and p53I2 transcripts were analysed by real-time PCR in homozygous A1 lymphoblastoid cell lines (Fig. 3A). TMPyP4 induced dose-dependent, opposite effects on levels of the two p53 transcripts (Fig. 3B). Increasing TMPyP4 concentrations resulted in a significant decrease of FSp53 levels of around 2-fold (P-value a vs b or c < 0.05). In contrast, p53I2 levels increased by 2-fold after TMPyP4 treatment (P-value a vs c < 0.01). These results suggest that *G-quadruplexes* are involved in the regulation of *TP53* splicing in lymphoblastoid cells. RT elongation assays in the presence of TMPyP4 showed that this drug destabilized *G-quadruplexes* in A1 intron 3, indicating that these structures were involved in the regulation of intron 2 excision (Supplementary Fig. 2).

To analyze the direct effect of *G-quadruplexes* on *TP53* splicing, we developed a GFP-based reporter assay in which a *TP53* fragment from exon 2 to exon 4 carrying the A1 p53PIN3 allele was introduced between the ATG and the GFP coding sequence (GFP-E2E4, Fig. 4A). In this construct, correct splicing of intron 2 (FS-GFP) induces the synthesis of GFP protein, whereas retention of intron 2 (I2-GFP) introduces stop codons and prevents the expression of the fluorescent protein. In cells transfected with GFP-E2E4, three different GFP transcripts were detected, corresponding to the pre-mRNA, FS-GFP and I2-GFP transcripts (data not

shown). To explore the roles of *G-quadruplexes* in modulating *TP53* splicing, we introduced mutations at specific guanines involved in *G-quadruplexes* formation and analyzed their effects on GFP expression (Fig. 4B). We generated two mutant versions, GFP-E2E4Δ and GFP-E2E4ΔΔ, which lack the guanines predicted to be involved in the formation of one or four *G-quadruplex* structures, respectively (Supplementary Fig. 3). All constructs displayed equal transfection efficiency, as measured by mRNA expression analysis of the neomycin gene carried by plasmids (Fig. 4C).

Expression of GFP-E2E4 was analyzed by RT-PCR and GFP fluorescence. In cells transfected with GFP-E2E4Δ and -E2E4ΔΔ, a decrease of FS-GFP transcript was observed, accompanied by an increase of I2-GFP transcript and a decrease of GFP fluorescence (Fig. 4C,D). The decrease in fluorescence was dependent upon the number of guanines mutated and upon the consecutive reduction in the predicted number of *G-quadruplexes*. A significant reduction of fluorescence was detected when comparing GFP-E2E4ΔΔ with GFP-E2E4 (P-value < 0.05). Thus, disruption of *G-quadruplexes* was associated with a decrease of GFP expression of about 20%, indicating that these structures are directly involved in the retention of intron 2 in the A1 allele. However, this decrease is less than the 50% decrease in FSp53 transcript following the TMPyP4 treatment of lymphoblastoid cells. It is possible that the mutations in GFP-E2E4 may reduce the ability to form *G-quadruplex* structures without completely abolishing it, whereas TMPyP4 may have more radical effects. Alternatively, TMPyP4 may exert indirect effects on *TP53* splicing, maybe by modulating other genes containing *G-quadruplexes*. Taken together, the experiments using the GFP-based reporter system support our hypothesis that *G-quadruplexes* in intron 3 are directly involved in the excision of intron 2.

Impact of the A2 p53PIN3 motif on *G-quadruplexes* formation and function

The p53PIN3 A2 allele is characterized by the presence of a single repeat of a 16 bp motif. In the above results, we observed that the p53PIN3 A2 allele is associated with a protective effect on mutant *TP53* LFS patients and that the 16 bp motif of the p53PIN3 A1 allele is involved in a *G-quadruplex* structure modulating p53 alternative splicing which is known to regulate the expression of p53 and the ΔNp53 isoform. To assess the impact of the p53PIN3 A2 allele on *G-quadruplex* formation and function, we duplicated (?) the experiments in the p53PIN3 A2 allele context. First, the presence of the 16 bp repeat introduces 9 additional guanines into p53PIN3 A2 intron 3 leading to the prediction of up to 7 *G-quadruplex* structures using *in silico* Quadfinder prediction, indicating that the A2 allele may form 2 additional structures as compared to the A1 allele (Supplementary Fig. 1). Second, to obtain

experimental evidence for the formation of *G-quadruplexes* in A2 intron 3, we analyzed synthetic RNA sequences derived from A2 intron 3 using the RT elongation assay. As for the A1 intron 3 RNA, a long RT product corresponding to the entire RNA was observed in presence of Na⁺, while in presence of K⁺, premature stops of RT elongation were observed that correspond to guanines on sequencing analysis (Fig. 5A, lanes 1 and 2). These results demonstrate that *G-quadruplexes* are also formed in the A2 allele. However, the presence of the 16 bp repeat in the A2 intron 3 RNA shifts the ends of these structures by 16 bp in relation to the 5' end of intron 3, as RT pauses were observed after the two 16 bp motifs. These observations indicate ? (suggest) differences between *G-quadruplex* structures formed either in A1 or A2 alleles, with the 16 bp repetition modifying their spatial arrangement with respect to upstream splice sites. Thus, the formation of *G-quadruplexes* in intron 3 is independent of the p53*PIN3* status but their localisations are changed with respect to the 5' end of intron 3 between the A1 and A2 alleles.

In a second step, we analysed the effect of treatment by TMPyP4 on the expression of FSp53 and p53I2 transcripts, analysed by real-time PCR in homozygous A2 lymphoblastoid cell lines (Fig. 5B). The FSp53 mRNA level was increased by 3-fold in a dose-dependent manner (P-value a vs b < 0.05 and a vs c < 0.01). After TMPyP4 treatment, p53I2 mRNA level showed a weak but significant increase of 0.5-fold (P-value a vs c < 0.05). These results indicate that modulations of *G-quadruplexes* formation in A2 cells favour the production of FSp53 as compared to the one of p53I2. However, no clear shift between expression of FSp53 and p53I2 mRNA is observed in A1 cells, indicating that *G-quadruplex* structures in A2 cells have not the same effect on p53 splicing than in A1 cells (Fig. 3).

To verify this observation, we used GFP-based reporter assay carrying a *TP53* fragment carrying the single repeat of 16 bp (GFP-E2E4-A2) and we also introduced mutations at the same guanines than for GFP-E2E4Δ and ΔΔ but on guanines only present in the second 16 bp motif (Fig. 5C). Quadfinder prediction estimated that GFP-E2E4-A2-□ constructs might have the ability to form 5 *G-quadruplexes* and -A2-□□ to form 3 structures. We observed no significant difference of GFP expression using GFP-E2E4-A2 constructs, suggesting that disruption of *G-quadruplexes* had no effect on GFP expression in A2 allele as compared to in A1 allele. These experiments support the fact that *G-quadruplex* structure has different topological properties and effect on the expression of both FSp53 and p53I2 mRNA depending on p53*PIN3* status.

Discussion

The individual risk of cancer in patients from LFS/LFL families is not well characterized, and the pattern of germline *TP53* mutations is usually not considered as a predictor of phenotype, with the exception of a few genotype-phenotype correlations that have been established between mutations in specific codons and tumor type (refs). The p53*PIN3* polymorphism consists of a 16 bp duplication that occurs at a frequency of about 20% in Caucasians and is associated with cancer susceptibility (A1 allele: non-duplicated; A2 allele: duplicated) {Hung, 2006 #20; Runnebaum, 1995 #26; Wang-Gohrke, 2002 #6}. We demonstrated that the p53*PIN3* polymorphism has a modifier effect on the LFS/LFL phenotype of germline *TP53* mutation carriers, manifested by later onset of cancer in carriers of the p53*PIN3* A2 allele (Fig. 1). Indeed, patients carrying the A1/A2 genotype develop their first cancer on average 17 years after those carrying the A1/A1 genotype. A previous report has described that a decrease of p53 mRNA expression occurs in A2 cell lines as compared to A1 cells, suggesting that the p53*PIN3* motif is involved in the regulation of p53 mRNA {Gemignani, 2003 #7}. To assess a link between p53 mRNA expression and the p53*PIN3* polymorphism, we first demonstrated (described) the presence of *G-quadruplex* structures in intron 3 of p53 pre-RNA (Fig. 2). These *G-quadruplexes* involve guanine residues of the p53*PIN3* polymorphism. We show that *G-quadruplex* structures in intron 3 can occur in both configurations of p53*PIN3*. However, the presence of the repeat in A2 intron 3 affects the topology of *G-quadruplexes*, by inducing a 16 bp shift of the 3' end of the *G-quadruplexes* towards the 5' end of intron 3 (Fig. 1 and 5; Supplementary Fig. S1). We also show that, in the A1 allele, *G-quadruplexes* are involved in the splicing of p53 pre-mRNA into two distinct transcripts (Fig. 3). The fully spliced p53 transcript retains all 11 exons leading to the production of the p53 protein. The second transcript, p53I2 retains, in addition to all exons, the stop codon-rich intron 2 and encodes ΔNp53, a N-truncated p53 isoform {Ghosh, 2004 #22}. This alternative splicing is dependent upon the formation of *G-quadruplexes* in A1 intron 3, as shown by the effects of TMPyP4 and by site-directed mutagenesis (Fig. 2 and 3).

The mechanisms by which the *G-quadruplexes* regulate splicing remain to be identified. In humans, several studies have shown that presence of structural elements may hinder the accessibility of selected sequences to splicing factors {Buratti, 2004 #33}. For example, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 (hnRNP A1) has a high affinity for *G-quadruplexes* in RNAs and promotes their stabilization {Abdul-Manan, 1996 #29}. In the case of β-tropomyosin pre-RNA, an intronic *G-quadruplex* is bound by hnRNP A1, which inhibits alternative splicing. Other *cis*-splicing elements around this intronic structure have been shown to bind SF2/ASF {Expert-Bezançon, 2004 #30}. This protein acts as an

antagonist of hnRNP A1 in splicing events and has been recently described as an oncogene {Karni, 2007 #12}. It is possible that *G-quadruplexes* in *TP53* may regulate the differential binding of hnRNP A1, to facilitate intron 2 retention, and of SF2/ASF, to favour intron 2 exclusion. Indeed by using ESEfinder, a web-based resource to identify binding sites for SF2/ASF, several binding sites were found immediately after the *G-quadruplex* in intron 3 (Supplemental Fig. S4) {Cartegni, 2003 #18}.

We also observed that in A2 allele, modulation of *G-quadruplex* structures induced a different pattern of expression of alternative spliced p53 transcripts as compared to A1 allele, indicating that *G-quadruplexes* containing the p53PIN3 motif share (have ?) different topological properties and effects on p53 mRNA expression depending upon p53PIN3 status. The p53PIN3 polymorphism seems to induce a change in *G-quadruplex* topology and function, suggesting that p53PIN3 polymorphism may lead to a differential expression of p53 isoforms at the origin of the cancer susceptibility observed in LFS patient (Fig. 1). The A2 allele has protective effect on cancer development in mutant *TP53* patients, suggesting that this allele may be associated to a stronger p53 response than the A1 allele.

In conclusion, our results indicate that *G-quadruplexes* in intron 3 affect the expression of alternatively spliced p53 transcripts encoding two distinct isoforms, p53 and Δ Np53. The latter lacks the transactivation domain and the binding site of Mdm2, the main regulator of p53 stability {Courtois, 2002 #16; Ghosh, 2004 #22}. Thus, Δ Np53 escapes Hdm2-dependent degradation and is not subject to accumulation in response to DNA-damage. Given its capacity to act as an inhibitor of p53 activity, the relative levels of p53 and Δ Np53 may be critical for p53 function in response of multiple forms of stress. Our results show that the p53PIN3 polymorphism has a modifier effect on *TP53* mutations in Li-Fraumeni Syndrome and its variants and is involved in *G-quadruplex* structures that participate in intron 2 alternative splicing, suggesting that the presence of *G-quadruplexes* may be a novel mechanism by which this common p53PIN3 polymorphism may contribute to cancer susceptibility.

Materials and methods

Genotyping of LFS/LFL patients

Cancer affected patients from LFL and LFS families were recruited from cancer genetic counseling services in three Brazilian capitals (São Paulo, Rio de Janeiro and Porto Alegre). The study was approved by the respective ethical committees and all individuals provided informed consent before inclusion. DNA was isolated from peripheral blood using standard

procedures. *TP53* mutation testing (exons 2 to 11) and *p53PIN3* genotyping were performed by direct sequencing of PCR products (ref ?) (Supplementary Table I).

Reverse transcriptase elongation assay

Intron 3 RNA was synthesized by *in vitro* transcription with T7 RNA polymerase (Promega) of linearized pBSK plasmids containing intron 3 with A1 or A2 conformation. One µg of pBSK-A1 or -A2, denatured in 0.2 N NaOH and 0.2 mM EDTA (37 °C 30 min), were sequenced using Sequenase T7 (Amersham). Primer extensions were performed on 8 µmol of intron 3 RNA and 10⁴ c.p.m. of BSK-R labelled primer: denaturation (95°C 1 min) and annealing (24°C 10 min) were completed in specific buffer (100 mM NaCl or KCl, 25 mM Tris-HCl pH 8.3, 10 mM MgCl₂ and 0.2 mM dNTPs) before extension (37°C 30 min) using 30 units of AMV reverse transcriptase (Promega). Products were analyzed on 10% polyacrylamide-8 M urea gels following by autoradiography.

RNA analysis

Immortalized lymphoblastoid cell lines were derived from breast cancer patients. Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen™). The levels of each N-terminal variant were analysed using QuantiTect™ Syber® Green PCR Kit (Qiagen) and specific primers (Supplemental Table II) and normalized to that of *GAPDH*. The ΔCt was calculated as an average of 3 measurements by plate for 2 Q-PCR of 2 independent experiments. Lymphoblastoid cells were treated for 48 h with 10 or 100 µM of TMPyP4 (Calbiochem®).

GFP-based reporter system

A PvuI restriction site was introduced into the pEGFP-N3 plasmid between ATG and following GFP coding sequence to produce GFP-Pos plasmid. A negative control plasmid was produced by Klenow fragment digestion into PvuI site (Fermentas). A fragment from exon 2 to exon 4 of *TP53* gene, excluding ATG 1 and 40, was cloned into the PvuI restriction site of GFP-Pos plasmid. In 6-well plates, 5 × 10⁵ of H1299 p53-null cells were transfected with 0.2 µg/ml of these plasmids using Eugene (Roche) and GFP protein fluorescence was analyzed by flow cytometry. Mutant GFP-Δ and GFP-ΔΔ plasmids were produced by QuickChange® site-directed Mutagenesis Kit (Stratagene) (Supplemental Table III). GFP-transfected cells were treated with 500 µM of cycloheximide 5 hours post-transfection.

Figure 1. Differential age of tumour onset depending on p53*PIN3* polymorphism in patients issued from Li-Fraumeni families. Age of tumour onset was analysed in patients carrying a wild-type *TP53* (panel A) and in patients carrying a mutant *TP53* (panel B) depending on the percentage of cases. In the mutant panel, patients carrying A1/A1 genotype developed their first cancers 17 years before patients carrying A1/A2 genotype, indicating a protective effect of the A2 allele.

Figure 2. Evidence for *G-quadruplexes* within A1 intron 3 of *TP53* gene. *A*, Partial nucleotide sequence of *TP53* gene from the exon 2 end to the exon 4 start, showing exon sequences (bold), stop codons (capital letters) and guanines predicted to be involved in *G-quadruplex* formation (italic capital letters). *B*, Bidimensional representation of G-tetrad, stabilized by cations within the central cavity. *C*, Tridimensional representation of one putative *G-quadruplex*. *D*, *G-quadruplex* mapping within A1 intron 3 by reverse transcription using a radiolabeled oligonucleotide. RT-stops occur after the p53*PIN3* motif (lanes 5-6) and at a guanine residue as shown by comparison with the sequencing lanes (lines 1-4, T: thymine; C: cytosine; A: adenine; G: guanine). Black arrowheads: 5'-intron 3 end; open arrowheads: 3'-intron 3 end; bracket: position of p53*PIN3* motif; box on the right: shorter exposition of the area delimited by dotted lines.

9 REFERÊNCIAS

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; 245:96-102.

Allain DC. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn.* 2008;10:383-95.

Alazzouzi H, Suriano G, Guerra A, Plaja A, Espín E, Armengol M, Alhopuro P, Velho S, Shinomura Y, González-Aguilera JJ, Yamamoto H, Aaltonen LA, Moreno V, Capellà G, Peinado MA, Seruca R, Arango D, Schwartz S Jr. Tumour selection advantage of non-dominant negative P53 mutations in homozygotic MDM2-SNP309 colorectal cancer cells. *J Med Genet.* 2007;44:75-80.

Alpert TE, Haffty BG. Conservative management of breast cancer in BRCA1/2 mutation carriers. *Clin Breast Cancer.* 2004;5: 37-42.

Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimarães PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, Prado VF. The ancestry of Brazilian mtDNA lineages. *Am J Hum Genet.* 2000;67:444-61.

American Society of Human Genetics, Statement Ad Hoc Committee on Genetic Counseling. Genetic counseling. *Am J Hum Genet.* 1975; 27: 240-2.

Arva NC, Gopen TR, Talbott KE, Campbell LE, Chicas A, White DE, Bond GL, Levine AJ, Bargonetti J. A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-MDM2 complex occurs in *MDM2* SNP309 homozygous cells. *J Biol Chem.* 2005;280:26776-87.

Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, Beckman L. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered.* 1994;44:266-70.

Behar DM, Metspalu E, Kivisild T, Achilli A, Hadid Y, Tzur S, Pereira L, Amorim A, Quintana-Murci L, Majamaa K, Herrnstadt C, Howell N, Balanovsky O, Kutuev I, Pshenichnov A, Gurwitz D, Bonne-Tamir B, Torroni A, Villems R, Skorecki K. The Matrilineal Ancestry of Ashkenazi Jewry: Portrait of a Recent Founder Event. *Am J Hum Genet.* 2006. 78: 487–97.

Benito M, Díaz-Rubio E. Molecular biology in colorectal cancer. In: Clinical and Translational Oncology. 1st edition, Dordrecht-Netherlands: Springer; 2006.p.391-8.
 Beran TM, Stanton AL, Kwan L, Seldon J, Bower JE, Vodermaier A, Ganz PA. The Trajectory of Psychological Impact in BRCA1/2 Genetic Testing: Does Time Heal? *Ann Behav Med.* 2008. [Epub ahead of print]

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigiante G, Yulug I, Merlano M, Numico G, Comino A, Attard M, Reelfs O, Gusterson B, Bell AK, Heath V, Tavassoli M, Farrell PJ, Smith P, Lu X, Crook T. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell.* 2003;3:387-402.

Birch JM Li-Fraumeni syndrome. *Eur J Cancer.* 1994;30:1935-41.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D, Craft AW, Eden OB, Evans DGR, Thompson E, Mann JR, Martin J, Mitchell ELD, Santibanez-Koref MF. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994;54:1298-304.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene*. 2001;20:4621-8.

Børresen AL, Hovig E, Smith-Sørensen B, Malkin D, Lystad S, Andersen TI, Nesland JM, Isselbacher KJ, Friend SH. Constant denaturant gel electrophoresis as a rapid screening technique for p53 mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:8405-9.

Borresen AL, Andersen TI, Garber J, Barbier-Piroux N, Thorlacius S, Eyfjord J, Ottestad L, Smith-Sorensen B, Hovig E, Malkin D, Friend SH. Screening for germ line *TP53* mutations in breast cancer patients. *Cancer Res*. 1992;52:3234–6.

Bougeard G, Limacher JM, Martin C, Charbonnier F, Killian A, Delattre O, Longy M, Jonveaux P, Fricker JP, Stoppa-Lyonnet D, Flaman JM, Frébourg T. Detection of 11 germline inactivating *TP53* mutations and absence of TP63 and HCHK2 mutations in 17 French families with Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. *J Med Genet*. 2001;38:253-7.

Bougeard G, Brugières L, Chompret A, Gesta P, Charbonnier F, Valent A, Martin C, Raux G, Feunteun J, Bressac-de Paillerets B, Frébourg T. Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. *Oncogene*. 2003 Feb 13;22(6):840-6.

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, Frebourg T. Impact of the *MDM2* SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet*. 2006;43:531-3.

Bougeard G, Sesboüé 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.

Campeau PM, Foulkes WD, Tischkowitz MD. Hereditary breast cancer: new genetic developments, new therapeutic avenues. *Hum Genet.* 2008;124:31-42.

Carter J, Steingass SK, Jacobs AD, Wendleton DH, Jennings HC. Challenges to providing care to a fearful and angry patient and family. *Cancer Pract* 1995;3:338-41.

Carvajal D, Tovar C, Yang H, Vu BT, Heimbrook DC, Vassilev LT. Activation of p53 by MDM2 antagonists can protect proliferating cells from mitotic inhibitors. *Cancer Res.* 2005;65:1918-24.

Celli J, Duijf P, Hamel BC, Bamshad M, Kramer B, Smits AP, Newbury-Ecob R, Hennekam RC, Van Buggenhout G, van Haeringen A, Woods CG, van Essen AJ, de Waal R, Vriend G, Haber DA, Yang A, McKeon F, Brunner HG, van Bokhoven H. Heterozygous germline mutations in the p53 homolog p63 are the cause of EEC syndrome. *Cell.* 1999;99:143-53.

Chavez-Reyes A, Parant JM, Amelse LL, de Oca Luna RM, Korsmeyer SJ, Lozano G. Switching mechanisms of cell death in *MDM2*- and *mdm4*-null mice by deletion of p53 downstream targets. *Cancer Res.* 2003;63:8664-9.

Chi SW, Lee SH, Kim DH, Ahn MJ, Kim JS, Woo JY, Torizawa T, Kainosho M, Han KH. Structural details on *MDM2*-p53 interaction. *J Biol Chem.* 2005;280:38795-802.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugières L, Pagés S, Feunteun J, Bonaïti-Pellié C. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 2001;38:43-7.

Costa S, Pinto D, Pereira D, Rodrigues H, Cameselle-Teijeiro J, Medeiros R, Schmitt F. Importance of TP53 codon 72 and intron 3 duplication 16bp polymorphisms in prediction of susceptibility on breast cancer. *BMC Cancer.* 2008;8:32.

Courtois S, de Fromentel CC, Hainaut P. p53 protein variants: structural and functional similarities with p63 and p73 isoforms. *Oncogene.* 2004;23:631-8

De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2005;4:233-7.

De Oca Luna RM, Tabor AD, Eberspaecher H, Hulboy DL, Worth LL, Colman MS, Finlay CA, Lozano G. The organization and expression of the *MDM2* gene. *Genomics.* 1996;33:352-7.

De Souza IR, Muniz YC, de M Saldanha G, Alves Junior L, da Rosa FC, Maegawa FA, Susin MF, de S Lipinski M, Petzl-Erler ML. Demographic and genetic structures of two partially isolated communities of Santa Catarina Island, southern Brazil. *Hum Biol.* 2003;75:241-53.

Del Giglio A, Soares HP, Caparroz C, Castro PC. Granisetron is equivalent to ondansetron for prophylaxis of chemotherapy-induced nausea and vomiting: results of a meta-analysis of randomized controlled trials. *Cancer.* 2000;89:2301-8.

Del Priori M, Venâncio R. Uma história da vida rural no Brasil. 1ª edição, Rio de Janeiro: Ediouro; 2006.

Den Otter W, Koten JW, Van der Vegt BJ, Beemer FA, Boxma OJ, Derkinderen DJ, De Graaf PW, Huber J, Lips CJ, Roholl PJ. Oncogenesis by mutations in anti-oncogenes: a view. *Anticancer Res.* 1990;10:475-87.

DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol.* 2002;9:12-6.

Digianni L, Li FP, Fraumeni JF Jr, Syngal S, Garber JE. F18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography screening in Li-Fraumeni syndrome. *JAMA* 2008;299:1315-9.

Donnehower LA, Bocangel D, Dumble M, Lozano G. Manipulating the *TP53*. In: Hainaut P; Wiman K. 25 years of TP53 Research. 1st edition, Dordrecht, Netherlands: Springer; 2005. 183-209.

Duijf PH, Vanmolkot KR, Propping P, Friedl W, Krieger E, McKeon F, Dötsch V, Brunner HG, Van Bokhoven H. Gain-of-function mutation in Adult syndrome reveals the presence of a second transactivation domain in p63. *Hum Mol Genet.* 2002;11:799-804.

Eeles RA. Germline mutations in the *TP53* gene. *Cancer Surv.* 1995;25:101-24.

Eisen A, Rebbeck TR, Wood WC, Weber BL: Prophylactic surgery in women with a hereditary predisposition to breast and ovarian cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18:1980–5.

English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Immunol Methods.* 1974;5:249-52.

Estimativa 2008: Incidência de câncer no Brasil. INCA [Internet]. 2008 [acessado em 20 de outubro de 2008]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008>

Feng J, Tamaskovic R, Yang Z, Brazil DP, Merlo A, Hess D, Hemmings BA. Stabilization of *MDM2* via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem*. 2004;279:35510-7.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SB, Boffetta P, Ribeiro RC. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. 2006 Jan;43(1):91-6.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. *Cell*. 1989;57:1083-93.

Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, Brugières L, Berthet P, Bressac-de-Paillerets B, Chevrier A, Chompret A, Cohen-Haguenauer O, Delattre O, Feingold J, Feunteun J, Frappaz D, Fricker JP, Gesta P, Jonveaux P, Kalifa C, Lasset C, Leheup B, Limacher JM, Longy M, Nogues C, Oppenheim D, Sommelet D, Soubrier F, Stoll C, Stoppa-Lyonnet D, Tristant H. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. *Bull Cancer*. 2001;88:581-7.

Garber JE, Offit K. Hereditary cancer predisposition syndromes. *J Clin Oncol*. 2005;23:276-92.

Ghosh A, Stewart D, Matlashewski G. Regulation of human p53 activity and cell localization by alternative splicing. *Mol Cell Biol*. 2004;24:7987-97.

Grusenmeyer PA, Wong YN. Interpreting the economic literature in oncology. *J Clin Oncol*. 2007;25:196-202.

Guillem JG, Rapaport BS, Kirchhoff T, Kolachana P, Nafa K, Glogowski E, Finch R, Huang H, Foulkes WD, Markowitz A, Ellis NA, Offit K. A636P is associated with early-onset colon cancer in Ashkenazi Jews. *J Am Coll Surg*. 2003;196:222-5.

Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. *Curr Opin Oncol.* 1995;7:76-82.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res.* 2000;77:81-137.

Hainaut P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. *Nat Med.* 2002;8:21-3.

Hainaut P, Wiman KG. 25 Years of P53 Research. 25 years of TP53 Research. 1st edition, Dordrecht-Netherlands: Springer; 2005.

Hall MJ, Olopade OI. Disparities in genetic testing: thinking outside the BRCA box. *J Clin Oncol.* 2006;24:2197-203.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.

Hartley AL, Birch JM, Tricker K, Wallace SA, Kelsey AM, Harris M, Jones PH. Wilms' tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. *Cancer Genet Cytogenet.* 1993;67:133-5.

Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M, Teare MD. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? *Cancer Genet Cytogenet.* 1989;42:221-6.

Hartmann LC, Schaid DJ, Woods JE, Crotty TP, Myers JL, Arnold PG, Petty PM, Sellers TA, Johnson JL, McDonnell SK, Frost MH, Jenkins RB: Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in women with a family history of breast cancer. *N Engl J Med.* 1999;340:77-84.

Hartmann LC, Sellers TA, Schaid DJ, Frank TS, Soderberg CL, Sitta DL, Frost MH, Grant CS, Donohue JH, Woods JE, McDonnell SK, Vockley CW, Deffenbaugh A,

Couch FJ, Jenkins RB. Efficacy of bilateral prophylactic mastectomy in BRCA1 and BRCA2 gene mutation carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2001;93:1633-7.

Harris SL, Gil G, Robins H, Hu W, Hirshfield K, Bond E, Bond G, Levine AJ. Detection of functional single-nucleotide polymorphisms that affect apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102:16297-302.

Hemminki A, Markie D, Tomlinson I, Avizienyte E, Roth S, Loukola A, Bignell G, Warren W, Amino V M, Hoglund P, Jarvinen H, Kristo P, Pelin K, Ridanpää M, Salovaara R, Toro T, Bodmer W, Olschwang S, Olsen AS, Stratton MR, de la Chapelle A, Aaltonen LA. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz–Jeghers syndrome. *Nature.* 1998;391:184–7.

Hemminki K, Eng C. Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. *J Med Genet.* 2004;41:801-7.

Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90:606-11.

Holloway KB, Flowers FP. Multiple endocrine neoplasia 2B (MEN 2B)/MEN 3. *Dermatol Clin.* 1995;13:99-103.

Katballe N.; Christensen M.; Wikman FP; Orntoft TF; Laurberg S. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Danish colorectal cancer patients. *Gut.* 50: 43-51, 2002.

Kaiser J. Aventura no caminho dos tropeiros. 1ª edição, Florianópolis: Letras Brasileiras, 2006.

Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C. 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*. 2003;100:8424-9.

Kauff N, Satagopan JM, Robson ME, Scheuer L, Hensley M, Hudis CA, Ellis NA, Boyd J, Borgen PI, Barakat RR, Norton L, Castiel M, Nafa K, Offit K: Risk-reducing salpingo-oophorectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*. 2002;346:1609–15.

Kaurah P, MacMillan A, Boyd N, Senz J, De Luca A, Chun N, Suriano G, Zaor S, Van Manen L, Gilpin C, Nikkel S, Connolly-Wilson M, Weissman S, Rubinstein WS, Sebold C, Greenstein R, Stroop J, Yim D, Panzini B, McKinnon W, Greenblatt M, Wirtzfeld D, Fontaine D, Coit D, Yoon S, Chung D, Lauwers G, Pizzuti A, Vaccaro C, Redal MA, Oliveira C, Tischkowitz M, Olschwang S, Gallinger S, Lynch H, Green J, Ford J, Pharoah P, Fernandez B, Huntsman D. Founder and recurrent CDH1 mutations in families with hereditary diffuse gastric cancer. *JAMA* 2007;297:2360-72.

Kessler S. The genetic counselor as psychotherapist. *Birth Defects Orig Artic Ser*. 1979;15:187-200.

Kim IJ, Kang HC, Shin Y, Park HW, Jang SG, Han SY, Lim SK, Lee MR, Chang HJ, Ku JL, Yang HK, Park JG. A TP53-truncating germline mutation (E287X) in a family with characteristics of both hereditary diffuse gastric cancer and Li-Fraumeni syndrome. *J Hum Genet*. 2004;49(11):591-5.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68(4):820-3.

Kress M, May E, Cassingena R, May P. Simian virus 40-transformed cells express new species of proteins precipitable by anti-simian virus 40 tumor serum. *J Virol.* 1979;31(2):472-83.

Kuhl CK, Kuhn W, Schild H: Management of women at high risk for breast cancer: new imaging beyond mammography. *Breast.* 2005;14:480–486.

Lalloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, Evans DG; Early Onset Breast Cancer Study Group. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet.* 2003;361, 1101-2.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. *Nature.* 1979;278:261-3.

Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature.* 1992;358:15-6.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86:4970-3.

Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. *Oncogene.* 1993;8:1703-5.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.* 1991;351:453-6.

Le Calvez F, Ahman A, Tonisson N, Lambert J, Temam S, Brennan P, Zaridze DG, Metspalu A, Hainaut P. Arrayed primer extension resequencing of mutations in the TP53 tumor suppressor gene: comparison with denaturing HPLC and direct sequencing. *Clin Chem.* 2005;51:1284-7.

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.

Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71:747-52.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res.* 1988;48:5358-62.

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.

Lieberman DA, Holub JL, Moravec MD, Eisen GM, Peters D, Morris CD. Prevalence of colon polyps detected by colonoscopy screening in asymptomatic black and white patients. *JAMA.* 2008 Sep 24;300(12):1417-22.

Liew M, Pryor R, Palais R, Meadows C, Erali M, Lyon E, Wittwer C. Genotyping of single-nucleotide polymorphisms by high-resolution melting of small amplicons. *Clin Chem.* 2004;50:1156-64.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes Second Edition *Journal of the National Cancer Institute Monographs*, No. 38, 2008.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell.* 1979;17:43-52.

Lozano G, Levine AJ. Tissue-specific expression of p53 in transgenic mice is regulated by intron sequences. *Mol Carcinog.* 1991;4:3-9.

Lubin IM, Caggana M, Constantin C, Gross SJ, Lyon E, Pagon RA, Trotter TL, Wilson JA, McGovern MM. Ordering molecular genetic tests and reporting results: practices in laboratory and clinical settings. *J Mol Diagn*. 2008;10:459-68.

Lynch HT, Guirgis HA. Childhood cancer and the SBLA syndrome. *Med Hypotheses*. 1979;5:15-22.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, 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.

Manoukian S, Peissel B, Pensotti V, Barile M, Cortesi L, Stacchiotti S, Terenziani M, Barbera F, Pasquini G, Frigerio S, Pierotti MA, Radice P, Della-Torre G. Germline mutations of TP53 and BRCA2 genes in breast cancer/sarcoma families. *Eur J Cancer*. 2007;43:601-6.

Masciari S, Van den Abbeele AD, Diller LR, Rastarhuyeva I, Yap J, Schneider K, Digianini L, Li FP, Fraumeni JF Jr, Syngal S, Garber JE. F18-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography screening in Li-Fraumeni syndrome. *JAMA*. 2008;299:1315-9.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999;18:7621-36.

McLure KG, Lee PW. How p53 binds DNA as a tetramer. *EMBO J*. 1998;17:3342-50.

Mattick JS. Introns: evolution and function. *Curr Opin Genet Dev*. 1994;4:823-31.

Meijers-Heijboer H, van Geel B, van Putten WL, Henzen-Logmans SC, Seynaeve C, Menke-Pluymers MB, Bartels CC, Verhoog LC, van den Ouweland AM, Niermeijer MF, Brekelmans CT, Klijn JG. Breast cancer after prophylactic bilateral mastectomy in women with a BRCA1 or BRCA2 mutation. *N Engl J Med*. 2001;345:159-64.

Menin C, Scaini MC, De Salvo GL, Biscuola M, Quaggio M, Esposito G, Belluco C, Montagna M, Agata S, D'Andrea E, Nitti D, Amadori A, Bertorelle R. Association between *MDM2*-SNP309 and age at colorectal cancer diagnosis according to p53 mutation status. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98:285-8.

Meropol NJ, Schulman KA. Cost of cancer care: issues and implications. *J Clin Oncol*. 2007;25:180-6.

Miller SA, Dykes, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Ac Res*. 1988; 16:1215.

Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. *Mol Cancer Res*. 2003;1:1001-8.
National Advisory Council for Human Genome Research. Statement on use of DNA testing for presymptomatic identification of cancer risk. *JAMA*. 1994;271:785.

National Comprehensive Cancer Network. Genetic? Familial High risk assessment: Breast and Ovarian. Available from: http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/genetics_screening.pdf. Accessed 2008 out 22

NCBI National Center for Biotechnology Information. SNPs database. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>. Accessed 2008 out 22.

Narod SA, Offit K. Prevention and management of hereditary breast cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:1656-63.

Nelen MR, Kremer H, Konings IB, Schoute F, van Essen AJ, Koch R, Woods CG, Fryns JP, Hamel B, Hoefsloot LH, Peeters EA, Padberg GW. Novel PTEN mutations in patients with Cowden disease: absence of clear genotype-phenotype correlations. *Europ J Hum Genet*. 1999;7:267–73.

Nichols NM, Matthews KS. p53 unfolding detected by CD but not by tryptophan fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;288:111-5.

Nussbaum RL., McInnes RR, Willard HF Thompson e Thompson Genetica. 6a edição, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. 251-2.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC *TP53* database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat*. 2002; 19:607-14.

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;63:6643-6650.

Olopade OI, Offit K, Garber JE. Genetic testing for susceptibility to cancer. Task Force on Cancer Genetics Education. *JAMA*. 1998;279:1612-3.

Palmero EI, Ashton-Prolla P, da Rocha JC, Vargas FR, Kalakun L, Blom MB, Azevedo SJ, Caleffi M, Giugliani R, Schüler-Faccini L. Clinical characterization and risk profile of individuals seeking genetic counseling for hereditary breast cancer in Brazil. *J Genet Couns*. 2007a;16:363-71.

Palmero EI, Kalakun L, Schüler-Faccini L, Giugliani R, Regla Vargas F, Rocha JC, Ashton-Prolla P. Cancer genetic counseling in public health care hospitals: the experience of three Brazilian services. *Community Genet*. 2007b;10:110-9.

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

Pereira RM. Avaliação clínica e laboratorial de portadores da mutação *TP53* R337H, parentes de pacientes portadores da mutação e com tumor do córtex adrenal na infância [Tese] Curitiba (Paraná): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Peterson SK, Pentz RD, Marani SK, Ward PA, Blanco AM, La Rue D, Vogel K, Solomon T, Strong LC. Psychological functioning in persons considering genetic counseling and testing for Li-Fraumeni syndrome. *Psychooncology.* 2008;17:783-9.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. *TP53* mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene.* 2007a; 26, 2157-2165.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Hum Mutat.* 2007b;28:622-9.

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

Pinto GR, Yoshioka FK, Silva RL, Clara CA, Santos MJ, Almeida JR, Burbano RR, Rey JA, Casartelli C. Prognostic value of *TP53* Pro47Ser and Arg72Pro single nucleotide polymorphisms and the susceptibility to gliomas in individuals from Southeast Brazil. *Genet Mol Res.* 2008;7:207-16.

Piovezan GC. Prevalência do alelo *TP53* R337H no Estado do Paraná [dissertação] Curitiba (Paraná): Universidade Federal do Paraná; 2006.

Pho L, Grossman D, Leachman SA. Melanoma genetics: a review of genetic factors and clinical phenotypes in familial melanoma. *Curr Opinion Oncol*. 2006;18:173–9.

Pleasant LM, Hansen MF. Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. *Hum Genet*. 1994;93:607-8.

População: censos demográficos. IBGE [Internet]. 2008 [acessado em 20 de outubro de 2008]. Available at: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/default_censo_2000.shtm. Acessado em 2008 out 22.

Rebbeck TR. Inherited genetic predisposition in breast cancer. A population-based perspective. *Cancer*. 1999;86:2493-501.

Rebbeck TR, Lynch HT, Neuhausen SL, Narod SA, Van 't Veer L, Garber JE, Evans G, Isaacs C, Daly MB, Matloff E, Olopade OI, Weber BL; Prevention and Observation of Surgical End Points Study Group: Prophylactic oophorectomy in carriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. *N Engl J Med*. 2002;346:1616–22.

Reilly PR, Boshart MF, Holtzman SH. Ethical issues in genetic research: disclosure and informed consent. *Nat Genet*. 1997;15:16-20.

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 U S A*. 2001;98:9330-5.

Roa BB., Boyd A, Volcik K, Richards CS. Ashkenazi Jewish population frequencies for common mutations in BRCA1 and BRCA2. *Nat Genet*. 1996;14:185-7.

Rocha JCC, Vargas FR, Ashton-Prolla P: Câncer Familiar. In: Projeto Diretrizes AMB/ CFM. 2001. Disponível em: www.amb.org.br/projetodiretrizes/100_diretrizes/cancerfa.pdf. Acessado em 2008 jan 31.

Rubinstein WS. Hereditary breast cancer in Jews. *Fam Cancer*. 2004;3:249-57.

Sidransky D, Tokino T, Helzlsouer K, Zehnbaauer B, Rausch G, Shelton B, Prestigiacomo L, Vogelstein B, Davidson N. Inherited p53 gene mutations in breast cancer. *Cancer Res*. 1992;52:2984-6.

Sifri R, Gangadharappa S, Acheson LS. Identifying and testing for hereditary susceptibility to common cancers. *CA Cancer J Clin*. 2004;54:309-26.

South AP, Ashton GH, Willoughby C, Ellis IH, Bleck O, Hamada T, Mannion G, Wessagowit V, Hashimoto T, Eady RA, McGrath JA. EEC (ectrodactyly, ectodermal dysplasia, clefting) syndrome: heterozygous mutation in the p63 gene (R279H) and DNA-based prenatal diagnosis. *Br. J. Dermatol*. 2002;146: 216-20.

Srivastava S, Wang S, Tong YA, Hao ZM, Chang EH. Dominant negative effect of a germ-line mutant p53: a step fostering tumorigenesis. *Cancer Res*. 1993;53:4452-5.

Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature*. 1990; 348:747-9.

Stott FJ, Bates S, James MC, McConnell BB, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden KH, Peters G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14(ARF), participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J*. 1998;17:5001-14.

Sul J, Yu GP, Lu QY, Lu ML, Setiawan VW, Wang MR, Guo CH, Yu SZ, Mu L, Cai L, Kurtz RC, Zhang ZF. P53 Codon 72 polymorphisms: a case-control study of gastric cancer and potential interactions. *Cancer Lett*. 2006;238:210-23.

Tabori U, Nanda S, Druker H, Lees J, Malkin D. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res.* 2007;67:1415-8.

Tonin P, Serova O, Lenoir G, Lynch H, Durocher F, Simard J, Morgan K, Narod S. BRCA1 mutations in Ashkenazi Jewish women. *Am J Hum Genet.* 1995;57:189.

Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis *Clinical Genetics.* 2002;62:345.

Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. *Oncologist.* 2004;9:13-24.

Trkova M, Hladikova M, Kasal P, Goetz P, Sedlacek Z. Is there anticipation in the age at onset of cancer in families with Li-Fraumeni syndrome? *J Hum Genet.* 2002;47:381-6.

Van Bokhoven H, Hamel BC, Bamshad M, Sangiorgi E, Gurrieri F, Duijf PH, Vanmolkot KR, van Beusekom E, van Beersum SE, Celli J, Merks GF, Tenconi R, Fryns JP, Verloes A, Newbury-Ecob RA, Raas-Rotschild A, Majewski F, Beemer FA, Janecke A, Chitayat D, Crisponi G, Kayserili H, Yates JR, Neri G, Brunner HG. p63 Gene mutations in EEC syndrome, limb-mammary syndrome, and isolated split hand-split foot malformation suggest a genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet.* 2001;69:481-92.

Van Bokhoven H; McKeon F. Mutations in the p53 homolog p63: allele-specific developmental syndrome in humans. *Trends Mol Med.* 2002;8:133-9.

Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997;76:1-14.

Wambua S, Mwangi TW, Kortok M, Uyoga SM, Macharia AW, Mwacharo JK, Weatherall DJ, Snow RW, Marsh K, Williams TN. The effect of alpha+-thalassaemia on the incidence of malaria and other diseases in children living on the coast of Kenya. *PLoS Med.* 2006;3:158.

Weinberg RA. The retinoblastoma gene and cell growth control. *Trends Biochem Sci.* 1990;15:199-202.

Weitzel JN, Lagos VI, Cullinane CA, Gambol PJ, Culver JO, Blazer KR, Palomares MR, Lowstuter KJ, MacDonald DJ. Limited family structure and BRCA gene mutation status in single cases of breast cancer. *JAMA.* 2007;297:2587-95.

Whittemore AS, Gong G, John EM, McGuire V, Li FP, Ostrow KL, Dicioccio R, Felberg A, West DW. Prevalence of BRCA1 mutation carriers among U.S. non-Hispanic Whites. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:2078-83.

Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA, Potten CS. Radiation-induced p53 and p21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol.* 1998;153:899-909.

Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology.* 2006;130:73-9.

World Map. Wikipedia [Internet]. 2008 [acessado em 20 de outubro de 2008]. Disponível em: <http://en.wikipedia.org/wiki/Image:World-map-2004-cia-factbook-large-1.7m-whitespace-removed.jpg>

Wu X, Zhao H, Amos CI, Shete S, Maman N, Hong WK, Kadlubar FF, Spitz MR. p53 Genotypes and Haplotypes Associated With Lung Cancer Susceptibility and Ethnicity. *J Natl Cancer Inst.* 2002;94:681-90.

Yin Y, Stephen CW, Luciani MG, Fåhræus R p53 Stability and activity is regulated by *MDM2*-mediated induction of alternative p53 translation products. *Nat Cell Biol.* 2002;4:462-7.

Ying H, Chang DL, Zheng H, McKeon F, Xiao ZX. DNA-binding and transactivation activities are essential for TAp63 protein degradation. *Mol Cell Biol.* 2005;25:6154-64.

Xu Y, Yao L, Ouyang T, Li J, Wang T, Fan Z, Lin B, Lu Y, Xie Y. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:7328-33.

Zawlik I, Kita D, Vaccarella S, Mittelbronn M, Franceschi S, Ohgaki H. Common Polymorphisms in the *MDM2* and *TP53* Genes and the Relationship between *TP53* Mutations and Patient Outcomes in Glioblastomas. *Brain Pathol.* 2008. [Epub ahead of print].