

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUTAÇÕES
GERMINATIVAS NO GENE *TP53* EM PACIENTES COM
MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS OU COM
TUMORES ISOLADOS TÍPICOS DA SÍNDROME DE LI-
FRAUMENI**

MARINA DE CAMARGO CANNAVAN

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Maria Isabel Alves de Souza
Waddington Achatz**

Co-Orientadora: Dra Dirce Maria Carraro

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Cannavan, Marina de Camargo

Diagnóstico molecular de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes com múltiplos tumores primários ou com tumores isolados típicos da síndrome de Li-Fraumeni / Marina de Camargo

Cannavan, 2011.

123p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz

Descritores: 1. DIAGNÓSTICO 2. MUTAÇÃO 3. MUTAÇÃO EM LINHAGEM GERMINATIVA 4. PACIENTES 5. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

DEDICATÓRIA

Aos pacientes, pela luta e coragem,
vocês me fizeram ver a vida de outra forma.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus pais, Edgard e Eliana, por todas as vezes que me incentivaram em todas as minhas decisões, por sempre estarem ao meu lado e por me darem todo apoio e suporte.

Agradeço a minha irmã, Thais, pela amizade e pelas conversas antes de dormir.

Agradeço ao meu namorado, César, por sempre me ouvir nos momentos que eu mais preciso, por estar sempre ao meu lado e por ser além de meu amor, meu melhor amigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos pacientes pela confiança e admiração em meu trabalho. Eu que admiro a força de vocês.

Agradeço a minha orientadora neste trabalho, Dra Maria Isabel Waddington Achatz, pelo conhecimento e apoio.

À minha co-orientadora, Dra Dirce Maria Carraro, pelo incentivo, paciência, apoio, e por disponibilizar o laboratório para realização do meu trabalho.

À minha orientadora de Iniciação Científica, Dra Mércia Tancredo Toledo, que me apresentou a Oncologia.

À Dra Ana Krepischi, pela paciência e início da co-orientação.

Às minhas amigas do Departamento de Oncogenética, Andréia Veloso, Amanda Nóbrega, Karina Santiago, Juliana Badke e Sônia Nogueira, que me apoiaram, tanto torceram por mim e comigo caminharam para a conclusão desta dissertação.

Às médicas do Departamento de Oncogenética, Simône Noronha, Rima Jbili e Maria Nirvana Formiga, pela atenção e ajuda na coleta de pacientes.

À Bianca Lisboa por me ensinar todas as técnicas necessárias para realização deste projeto.

Aos colegas do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, especial ao Dr. Felipe por me ajudar na análise das sequências, Giovana, Roberto, Letícia, Márcia e Carolina pelo apoio e disponibilidade em me acompanhar nos experimentos e esclarecer as minhas dúvidas.

Aos colegas do Laboratório de NeoGene, pelo apoio e incentivo.

Aos amigos da Pós Graduação, Ribamar, Renata e Juan.

À minha xará Marina Gomes e ao Rodrigo Crespo pelas conversas bem humoradas.

Aos funcionários do Laboratório Lavoisier, pela coleta de sangue.

Às meninas do Banco de Macromoléculas, Eloisa, Louise e Vera pela extração do DNA.

À Dra Isabela Werneck, pela revisão dos tumores e realização de LCM.

Ao Departamento de Pediatria, em especial a Dra Cecília e a enfermeira Dra Andréia pelo apoio e por encaminhar os pacientes.

Ao Dr. Gustavo, diretor do Hospital GPACI, por acreditar no meu trabalho e encaminhar os pacientes.

À Dra Tatiana El-Jaick, do Hospital Infantil Joana de Gusmão, por encaminhar os pacientes com tumor adrenocortical.

Ao Departamento de Pós Graduação, em especial Vanuza e Luciana pela enorme paciência com os alunos.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa, pela revisão do projeto.

À toda equipe de colaboradores da Biblioteca, em especial ao Jeferson pelo apoio bem humorado.

À Suely Francisco, pela ajuda e paciência na revisão deste projeto.

Aos meninos do SAME, pela simpatia, atenção e competência em manter a revisão dos prontuários organizada.

À CAPES e FAPESP pelo auxílio financeiro.

E, finalmente, a todos aqueles que, direta ou indiretamente, participaram da elaboração deste estudo, gostaria de expressar o mais profundo agradecimentos.

RESUMO

Cannavan MC. **Diagnóstico molecular de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes com múltiplos tumores primários ou com tumores isolados típicos da síndrome de Li-Fraumeni.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e sua variante Li-Fraumeni *like* (LFL) são síndromes de predisposição hereditária ao câncer raras, associada a mutações germinativas no gene *TP53*. Esta síndrome predispõe portadores a uma ampla variedade de tumores em idade jovem. A síndrome LFS/LFL está presente em 0,3% da população do sul e sudeste do Brasil, devido a um efeito fundador. O objetivo deste projeto foi avaliar a presença de mutações germinativas no gene *TP53* em indivíduos com múltiplos tumores primários e em pacientes com tumores isolados típicos da LFS/LFL. Foram analisadas 109 amostras provenientes de 106 indivíduos e três blocos de parafina, divididos em quatro grupos: (1) pacientes portadores de múltiplos tumores primários (MP=54), (2) pacientes com diagnóstico de câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (CM=41), (3) pacientes portadores de tumor adrenocortical (ADR=11) e (4) amostras de carcinomas do plexo coróide (PC=3). Foi realizado o sequenciamento da região codificante do gene *TP53* e foram detectadas mutações germinativas em 13% dos pacientes com MP, 2,4% no grupo CM e 54,5% nos pacientes com ADR. Dentre as mutações encontradas, 71,4% correspondem à mutação fundadora p.R337H. Foi descrita pela primeira vez a alteração p.V143M. Este estudo contribuiu para a caracterização clínica de pacientes que devem ser testados para mutações no gene *TP53* e caracterização molecular de pacientes com múltiplos tumores primários, pacientes com tumor adrenocortical e pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

SUMMARY

Cannavan MC. **[Molecular diagnosis of germline mutations in *TP53* gene in patients with multiple primary tumors or with isolated tumors typical from the Li-Fraumeni syndrome]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

The Li-Fraumeni syndrome (LFS) and its variant Li-Fraumeni like (LFL) are a rare hereditary predisposition cancer syndromes associated to germline mutations in *TP53* gene. It predisposes carriers to a wide range of tumors at young age. It is present in 0.3% of the population from South and Southeast Brazil, the due to a founder effect. The objective of this project was to evaluate the presence of germline mutations in *TP53* gene in individuals with multiple primary tumors and in isolated tumors typical of LFS/LFL. It were analyzed 109 samples from 106 individuals and three paraffin blocks divided into four groups: (1) patients with multiple primary tumors (MP = 54), (2) patients diagnosed with breast cancer before the age of 35 without mutation in the *BRCA1* and *BRCA2* genes (BC = 41), (3) patients with adrenocortical tumors (ADR = 11) and (4) samples of choroid plexus carcinomas (PC = 3). Sequencing of the coding region of *TP53* gene was performed and germline mutations were found in 13% of patients with MP, 2.4% in the BC group and 54.5% in patients with ADR. Among the mutations found, 71.4% correspond to p.R337H founder mutation. It was first described p.V143M alteration. This study has contributed to the clinical characterization of patients who should be tested for the *TP53* gene, and also to the molecular characterization of patients with multiple primary tumors, patients with adrenal gland tumors and patients with breast cancer before 35 years old without mutation in the *BRCA1* and *BRCA2* genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O gene <i>TP53</i> e a proteína p53.....	14
Figura 2	Suspensão em G ₁ em resposta a lesão no DNA.....	17
Figura 3	Esquema das alterações sofridas pela proteína mutante p53- p.R337H de acordo com a variação do pH.....	23
Figura 4	Heredograma da paciente MJ02039T, paciente portadora da mutação p.V143M.....	57
Figura 5	Heredograma da paciente MT-14/ADR, portadora da mutação p.R337H.....	59
Figura 6	Heredograma da paciente MT-34/ADR, portadora da mutação p.R337H.....	60
Figura 7	Heredograma da paciente LFS256/ADR, portadora da mutação p.R337H.....	61
Figura 8	Heredograma da paciente MT-20/MP, portadora da mutação p.T125T.....	65
Figura 9	Heredograma da paciente MT-24/MP, portador da mutação p.R337H.....	66
Figura 10	Heredograma da paciente MT-35/MP, portadora da mutação p.M237I.....	67
Figura 11	Heredograma da paciente MT43/MP, portadora da mutação p.R337H.....	68

Figura 12	Heredograma da paciente MT057/MP, portadora da mutação p.R337C.....	69
Figura 13	Heredograma da paciente MT060/MP, portadora da mutação p.R337H.....	70
Figura 14	Heredograma da paciente Y0131/MP, portadora da mutação p.R337H.....	71

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Divisão dos grupos dos pacientes com múltiplos tumores primários de acordo com os critérios de inclusão.....	35
Tabela 2	Perfil Tumoral de Pacientes com Múltiplos Tumores Primários.....	47
Tabela 3	Critérios Clínicos dos pacientes do grupo MP.....	49
Tabela 4	Critérios Clínicos das pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	51
Tabela 5	Faixa etária de acometimento do grupo de pacientes com tumores adrenocorticais.....	52
Tabela 6	Perfil de mutações germinativas no gene <i>TP53</i> em pacientes do grupo MP.....	56
Tabela 7	Perfil da alteração germinativa no gene <i>TP53</i> em paciente do grupo CM.....	58
Tabela 8	Perfil da mutação germinativa no gene <i>TP53</i> em pacientes do grupo ADR.....	58
Tabela 9	Espectro tumoral dos pacientes portadores de múltiplos tumores primários com mutação detectada no gene <i>TP53</i>	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes.....	6
Quadro 2	Protocolo de rastreamento para pacientes portadores da LFS/LFL segundo NCCN versão 2011.....	9
Quadro 3	Protocolo de rastreamento para paciente portadores da LFS e LFL adaptado à população brasileira.....	11
Quadro 4	Critérios de inclusão.....	34
Quadro 5	Critérios de exclusão.....	35
Quadro 6	Espectro tumoral de 47 pacientes portadores de múltiplos tumores primários sem detecção de mutação no gene <i>TP53</i>	73

LISTA DE ABREVIATURAS

ADR	Tumor adrenocortical
AG	Aconselhamento Genético
ASCO	Do ingles “ <i>American Society of Clinical Oncology</i> ”
CCR	Câncer Colorretal
CEC	Carcinoma espinocelular
CGH	Do inglês “ <i>Comparative Genomic Hybridization</i> ”
CM	Grupo de pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos s mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
CMJ	Grupo de pacientes com câncer de mama entre 31 e 35 anos s mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
CMMJ	Grupo de pacientes com câncer de mama antes dos 30 anos s mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
CMOH	Câncer de Mama e Ovário Hereditário
CMCH	Câncer de Mama e Cólon Hereditário
DNA	Do inglês “ <i>Deoxyribonucleic acid</i> ” (ácido desoxiribonucléico)
EDTA	Do inglês “ <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i> ” (Ácido etilenodiam tetra-acético)
FASAY	Do inglês “ <i>Functional Analysis of Separated Allele in Yea</i> (Ensaio de separação de alelos em leveduras)
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GIST	Tumor do estroma gastrointestinal
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
IARC	Do inglês “ <i>International Agency for the Research on Canc</i> (Agência Internacional para a Pesquisa em Câncer)
Kb	Do inglês “ <i>Kilo-bases</i> ” (Quilobase)
kD	Do inglês “ <i>Kilo-Dalton</i> ” (Quilodalton)
LCM	Do Inglês “ <i>Laser Capture Microdissection</i> ” (Microdissecção a laser)
LFL	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i>
LFL-B	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Birch

LFL-CM	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Chompret modificado
LFL-C2009	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Chompret versão 2009
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	Síndrome de Li-Fraumeni Clássica
µg	Micrograma
MF	Melanoma Familiar
MP	Múltiplos Tumores Primários
NCCN	Do inglês " <i>National Comprehensive Cancer Network</i> "
Ng	Nanograma
PBL	Do inglês " <i>Peripheral blood lymphocytes</i> " (Linfócitos de sangue periférico)
PC	Carcinoma do plexo coróide
PCR	Do inglês " <i>Polymerase Chain Reaction</i> " (Reação em cadeia da polimerase)
pH	Potencial hidrogeniônico
Polyphen	Do inglês " <i>Polymorphism Phenotyping</i> "
RB	Retinoblastoma
SEER	Do inglês " <i>Surveillance, Epidemiology and End Results</i> "
SIFT	Do inglês " <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i> "
SPHC	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer
SNC	Sistema Nervoso Central
SO	Sarcoma ósseo
SPM	Sarcoma de partes moles
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Do inglês " <i>Tris EDTA</i> "

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Incidências do câncer no Brasil e as síndromes de predisposição hereditária ao câncer	1
1.2	Síndrome de Li-Fraumeni	2
1.2.1	Quadro clínico	3
1.2.2	Crterios diagnsticos da Sndrome de Li-Fraumeni	3
1.2.3	Aconselhamento gentico e rastreamento na LFS/LFL	7
1.3	O gene supressor de tumor <i>TP53</i> e a LFS/LFL	12
1.3.1	O gene <i>TP53</i>	12
1.3.2	A proteina p53	14
1.4	Mutaes no gene <i>TP53</i>	19
1.4.1	R337H: mutao especifica da populao brasileira	20
1.4.2	Propriedades bioqumicas e biolgicas do p.R337H	21
1.5	LFS e tumores tpicos da sndrome	24
1.5.1	Mltiplos tumores primrios	24
1.5.2	Cncer de mama em idade jovem	26
1.5.3	Tumor adrenocortical	27
1.5.4	Carcinoma do plexo-coride	29
2	JUSTIFICATIVA	31
3	OBJETIVOS	32
3.1	Objetivo geral	32
3.2	Objetivos especficos	32
4	MATERIAL E MTODOS	33
4.1	Seleo de pacientes	33
4.2	Extrao do DNA	36
4.2.1	Sangue perifrico	36

4.2.2	Amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina	38
4.3	Detecção de mutações no gene <i>TP53</i> a partir do sequenciamento	40
4.4	Predição da patogenicidade mediante os programas <i>in silico</i> , <i>Polyphen</i> e <i>SIFT</i>	42
4.5	Pós-teste	43
5	RESULTADOS	45
5.1	Caracterização clínica dos pacientes com múltiplos tumores primários	45
5.2	Caracterização clínica dos pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> E <i>BRCA2</i>	50
5.3	Caracterização clínica dos pacientes com tumor adrenocortical	51
5.4	Caracterização clínica dos pacientes com carcinoma do plexo coróide	53
5.5	Detecção de mutações germinativas, perfil familiar e tumoral dos pacientes	54
5.5.1	Múltiplos tumores	54
5.5.2	Câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	56
5.5.3	Tumor adrenocortical	58
5.5.4	Carcinoma do plexo coróide	61
5.6	Espectro tumoral e familiar em pacientes com múltiplos tumores primários e mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	62
5.6.1	Pacientes MP e história familiar de câncer	64
5.7	Espectro tumoral e familiar em pacientes com múltiplos tumores primários sem a detecção de mutações germinativas no gene <i>TP53</i> ...	71
5.8	Aconselhamento genético pós-teste e estratégias de rastreamento	74
6	DISCUSSÃO	77
6.1	Aspectos inovadores deste estudo	78
6.2	Múltiplos tumores primários	79
6.2.1	Detecção de mutações em indivíduos com múltiplos tumores primários	80
6.2.2	Espectro tumoral de indivíduos com múltiplos tumores primários	83

6.2.3	Idade de acometimento tumoral em pacientes com múltiplos tumores primários	89
6.2.4	Tratamento radioterápico em pacientes com múltiplos tumores primários.....	90
6.3	Câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>	92
6.4	Tumores adrenocorticais	93
6.5	Carcinomas do plexo coróide	95
6.6	Correlação genótipo-fenótipo	96
6.7	Mutações germinativas detectadas no gene <i>TP53</i>	97
6.7.1	Mutações germinativas no domínio de ligação.....	98
6.7.2	Patogênese de mutações no domínio de oligomerização	101
6.7.3	Mutações de novo	104
6.8	Pacientes com múltiplos tumores sem mutações germinativas no gene <i>TP53</i>	105
6.9	Pontos a serem elucidados	106
7	CONCLUSÕES	107
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ANEXOS

Anexo 1 Centros colaboradores

Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Anexo 3 Caracterização clínica e molecular das pacientes do grupo CM

Anexo 4 Heredogramas grupo MP

Anexo 5 Heredogramas grupo CM

Anexo 6 Heredogramas grupo ADR

Anexo 7 Carta de aprovação do Comitê de Ética

Anexo 8 Pôster apresentado na American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011 (2-6 Abril)

1 INTRODUÇÃO

1.1 INCIDÊNCIAS DO CÂNCER NO BRASIL E AS SÍNDROMES DE PREDISPOSIÇÃO HEREDITÁRIA AO CÂNCER

No Brasil, as estimativas para o ano de 2010, válidas também para 2011, apontam para a ocorrência de 489.270 casos novos de câncer no país (Ministério da Saúde 2009). Estima-se que 5 a 10% dos tumores malignos conhecidos sejam hereditários e 20 a 30% correspondam a agrupamentos de tumores em uma família, ou tumores familiares (LINDOR et al. 2008). Mutações germinativas ocorridas em genes de reparo e genes supressores de tumor estão relacionadas ao alto risco para a ocorrência destes tumores (TUCKER e FRIEDMAN 2002). Pacientes com mutações nestes genes podem ser classificados como portadores de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (SPHC). A maior parte dos genes relacionados às SPHC tem alta penetrância (ROCHA e KAGOHARA 2006).

A identificação de um indivíduo afetado por câncer hereditário é fundamental para a identificação dos familiares potencialmente em risco e sua inclusão em programas de redução de risco e/ou prevenção do câncer. Poucos serviços especializados no diagnóstico e aconselhamento genético (AG) de 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 (ACHATZ 2008).

O Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo, fundado em 1999, fornece aconselhamento genético e rastreamento para pacientes portadores de SPHC. Desde a sua fundação até hoje, 522 famílias foram registradas e mais de 4760 pacientes atendidos buscando o diagnóstico precoce frente às síndromes diagnosticadas. Os testes moleculares para detecção das diferentes alterações moleculares relacionados a ocorrência das SPHC, que possibilitaria a confirmação das síndromes, são de difícil acesso aos pacientes devido ao alto custo e as dificuldades técnicas inerentes.

1.2 SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma SPHC transmitida de forma autossômica dominante, que predispõe indivíduos afetados ao surgimento de múltiplas neoplasias com início precoce e pode afetar diversos membros da mesma família. Mutações germinativas no gene *TP53* foram relacionadas à LFS e predispõe portadores ao risco elevado para o desenvolvimento de tumores malignos na infância e em adultos jovens (MALKIN et al. 1990).

Estima-se que pacientes com LFS apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparado a 1% na população geral, e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 70 anos de idade (BIRCH et al. 2001). Portadores que desenvolveram tumor na infância são mais suscetíveis ao desenvolvimento de tumores secundários (HISADA et al. 1998).

1.2.1 Quadro Clínico

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 sarcomas ósseos (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 frente a concentração familiar de SPM, SO, SNC, ADR e cânceres de mama, diagnosticados antes dos 45 anos de idade (LI et al. 1988). A ocorrência de um espectro tumoral mais amplo incluindo cânceres de pulmão, próstata, estômago, cólon, pâncreas, além de tumores de células germinativas e melanoma foi descrito por HARTLEY et al. (1989). Tumores de células germinativas, papilomas do plexo coróide e tumor de Wilms também foram descritos em portadores da síndrome (HARTLEY et al. 1993).

1.2.2 Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni

O diagnóstico da síndrome inicialmente é clínico, realizado a partir da observação e anotação dos diversos casos relatados pelas famílias avaliadas. Os critérios para a determinação do diagnóstico clínico são o clássico LFS e Li-Fraumeni *like* (LFL), caracterizado em famílias que não apresentam a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome (LI et al.

1988; BIRCH et al. 1994; EELES 1995; CHOMPRET et al. 2001) (Quadro 1). Dentre os critérios de LFL, o critério de Chompret é o mais utilizado. Este critério vem sofrendo adaptações com a intenção de aumentar sua especificidade de diagnosticar os casos que não são compreendidos pelos critérios clínicos clássicos. BOUGEARD et al. (2008) revisaram os critérios iniciais propostos pelo grupo, incluindo tumores de mama em mulheres antes dos 36 anos na ausência de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. No entanto, a ocorrência de mutações germinativas em *TP53* em mulheres portadoras de câncer de mama em idade jovem e na ausência de história familiar é controverso. GINSBURG et al. (2009) selecionaram 95 mulheres para análise da mutação no gene *TP53*, de vários grupos étnicos, que desenvolveram câncer de mama antes dos 30 anos e que possuíam achados negativos para mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Não foram encontradas mutações germinativas no gene *TP53*.

TINAT et al. (2009), selecionaram 161 pacientes com câncer de mama para avaliar a ocorrência de mutações no gene *TP53*. Dentre estes pacientes, 25 pertenciam a famílias que preenchiam os critérios de Chompret. Mutações no gene *TP53* foram detectadas em 16% (4/25) dos pacientes. No mesmo estudo, os autores avaliaram 128 pacientes portadores de câncer de mama antes dos 36 anos para mutações no gene *TP53*, previamente testados para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sem alterações detectadas. Foram verificadas mutações no gene *TP53* em 4% (5/128) dos pacientes. O grupo considerou como baixa a detecção de mutação. Devido a esses resultados e ao impacto psicológico frente as

implicações da realização de exames genéticos, os autores concluíram que seria apropriado evitar o teste no gene *TP53* em pacientes com câncer de mama sem história familiar de câncer ou múltiplos tumores primários. TINAT et al. (2009) sugeriram a atualização dos critérios de Chompret previamente descritos, denominando Versão 2009 dos critérios de Chompret (Quadro 1).

Surpreendentemente, uma sensibilidade de 99% foi encontrada quando se combinou os critérios clássicos da LFS e os critérios de Chompret, juntamente com carcinoma do plexo coróide, sem considerar história familiar de câncer (GONZALEZ et al. 2009b). TINAT et al. (2009) calcularam corretamente que a sensibilidade para os critérios de Chompret isoladamente foi de 92%, destacando a grande contribuição dos critérios de Chompret para o total da sensibilidade observada pelos critérios de Gonzalez (GONZALEZ et al. 2009a).

Quadro 1 - Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes.

Clássico Li Fraumeni	• Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) E • Familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45anos) 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	• 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	• 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 modificado	• 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 <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>
Versão 2009 dos critérios de Chompret	• Paciente-índice com tumor típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma de partes moles, osteossarcoma, SNC, câncer de mama pré-menopausal, 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 (exceto câncer de mama caso o probando tenha câncer de mama) antes dos 56 anos ou múltiplos tumores OU • Paciente-índice com múltiplos tumores (exceto múltiplos tumores de mama), sendo pelo menos dois do espectro LFS e o primeiro antes dos 46 anos • Paciente com carcinoma adrenocortical ou carcinoma do plexo coróide, independente da história familiar.

1.2.3 Aconselhamento genético e rastreamento na LFS/LFL

Aconselhamento genético é o processo de comunicação da presença de uma síndrome genética aos portadores e os seus familiares. Neste momento devem ser detalhadas informações sobre a origem, a herança e as implicações da doença, possibilitando ao paciente tomar decisões médicas e pessoais (NUSSBAUM et al. 2002).

O aconselhamento genético para o câncer familiar inicia-se a partir do reconhecimento do indivíduo em risco e da informação das estimativas desse risco para um potencial acometido. Partindo dessa premissa, uma vez identificada a “suspeita diagnóstica de síndrome de predisposição hereditária ao câncer”, o AG tem o propósito de passar as informações em relação ao diagnóstico, o prognóstico e como proceder com esses pacientes considerados de risco. Seja pela história familiar, seja pela realização do teste genético, o AG proporciona a identificação de indivíduos com um risco aumentado para desenvolver câncer em relação à população geral (VARGAS 2002).

Devem ser avaliadas famílias que apresentam múltiplos casos de câncer, ou a presença de tumores em idades atípicas. A possibilidade de identificar familiares de elevado risco para o desenvolvimento de câncer torna possível o emprego de uma abordagem preventiva e de detecção precoce do câncer. Os indivíduos considerados de alto risco devem ser encaminhados para o aconselhamento genético onde receberão todas as informações sobre a doença diagnosticada, informações sobre a herança e suporte para o rastreamento precoce (ROCHA et al. 2007)

Pequeno número de afetados, principalmente em famílias pequenas, dificuldade de confirmação da história familiar (laudos médicos, indivíduos adotados, e outros), presença de mutações espontâneas *de novo*, penetrância incompleta e variações clínicas da síndrome são considerados fatores de confusão para o diagnóstico de SPHC (ROCHA et al. 2007).

A LFS/LFL é uma síndrome de difícil acompanhamento por apresentar um espectro tumoral amplo e diversificado (VARLEY et al. 1997b). Para o acompanhamento clínico de pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni foi proposto pelo *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) um protocolo para rastreamento precoce de lesões (Quadro 2).

Quadro 2 - Protocolo de rastreamento para pacientes portadores da LFS/LFL segundo NCCN versão 2011.

Risco	Rastreamento
Risco para câncer de mama	• Auto exame das mamas a partir dos 18 anos.
	• Exame clínico das mamas, a cada 6 meses, a partir dos 20-25 anos, ou 5 a 10 anos antes do mais jovem tumor de mama ocorrido na família.
	• Mamografia e/ou Ressonância Magnética das mamas anualmente a partir dos 20-25 anos, ou de acordo com a idade de ocorrência do tumor em familiar próximo.
	• Discutir caso a caso a opção de mastectomia redutora de risco, aconselhando sobre o grau de risco e possibilidade de reconstrução.
Risco para outros cânceres	• Exame físico geral anual, com atenção para os cânceres raros e segunda malignidades, incluindo também uma exame neurológico e de pele cuidadoso.
	• Radioterapia terapêutica teve ser utilizado com cautela.
	• Colonoscopia a cada 2-5 anos com início a partir dos 25 anos.
	• Pediatras devem ser informados quanto ao risco de cânceres infantis em crianças afetadas.
	• Discutir a opção de participar de abordagens de rastreamento inovadores utilizando tecnologias como PET scan, ultra-sonografia abdominal e ressonância nuclear magnética cerebral em ensaios clínicos, quando possível.
	• Exames de vigilância baseado no histórico de cada família
	• Educação sobre sinais e sintomas do câncer.

Legenda: Adaptado de NCCN *Clinical Practice Guidelines in Oncology: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*. Version 1.2011.

Mediante a presença aumentada de tumores pouco descritos na LFS/LFL em 13 famílias brasileiras portadoras de mutações no gene *TP53* em um estudo realizado pelo nosso grupo (ACHATZ 2006), foi proposto uma adaptação do protocolo do NCCN, no qual além dos exames de

rastreamento já previstos, foram incluídos exames focalizando a detecção precoce de lesões colorretais e no estômago, além de avaliação renal por métodos de imagem e citologia oncológica. Outro exame proposto foi a ultrassonografia da tireóide anual visando rastreamento de tumores da tireóide (Quadro 3).

Quadro 3 - Protocolo de rastreamento para paciente portadores da LFS e LFL adaptado à população brasileira.

Rastreamento	Anual	Semestral	Mensal
Adultos em risco	• Exame clínico com foco na detecção de tumores raros e novos tumores primários	• Exame clínico das mamas a partir dos 20-25 anos ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama em parente jovem (M)	• Auto-exame das mamas a partir dos 18 anos
	• Mamografia anual a partir dos 20-25 anos (M) ou 5 a 10 antes do tumor de mama em parente mais jovem	• Citologia oncológica	
	• Ultrassonografia de vias urinárias		
	• Ultrassonografia da tireóide		
	• Colonoscopia aos 35 anos ou 5 a 10 antes do tumor colorretal em parente mais jovem *		
	• Exame para detecção de sangue oculto nas fezes		
	• Endoscopia digestiva alta aos 35 anos, na presença de lesões suspeitas repetir anualmente		
	• Acompanhamento direcionado aos tumores ocorridos na família		
Crianças em risco	• Exame clínico com foco na detecção de tumores raros		
	• Exame para detecção de sangue oculto nas fezes		
	• Hemograma Completo		
Outras possibilidades de manejo	• Esclarecer famílias sobre limitações no rastreamento de tumores relacionados à síndrome		
	• Informar sobre mastectomia profilática bilateral (individualizar em cada família)		
	• Informar pediatras sobre risco de tumores infantis		
	• Rastreamento baseado na história de cada família		
	• Educação sobre possíveis sinais e sintomas de câncer		

Fonte: Adaptado de ACHATZ (2006)

Legenda: (M) – exame realizado em mulheres; * se presença de pólipos adenomatosos, repetir em 1 ano; ausência de pólipos adenomatosos, repetir em 3 anos.

1.3 O GENE SUPRESSOR DE TUMOR *TP53* E A LFS/LFL

Atualmente acredita-se que um pequeno grupo de genes controla a maior parte das vias ligadas à carcinogênese e frequentemente encontra-se alterado no câncer humano. 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). Mutações no gene *TP53*, estão entre as mais frequentes alterações genéticas detectadas nos cânceres humanos, inativa as funções regulatórias de crescimento celular, causa a perda da atividade supressora de tumor e, em alguns casos, confere uma função promotora do tumor, com a ativação de genes envolvidos na proliferação celular, no aumento da sobrevivência da célula e na angiogênese (CADWELL e ZAMBETTI 2001).

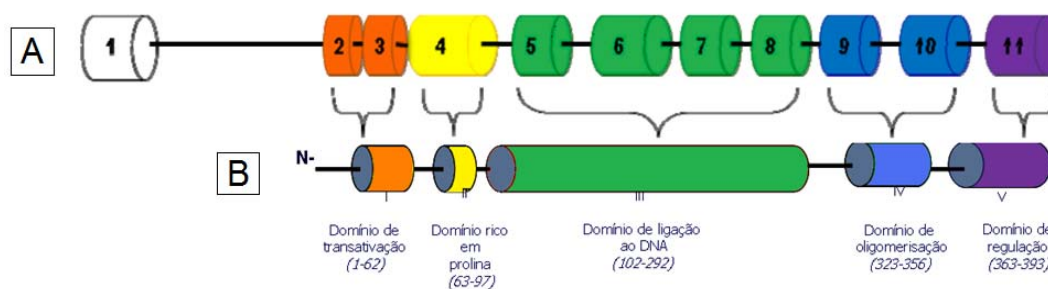
1.3.1 O gene *TP53*

O gene *TP53* foi identificado em 1979 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).

Por dez anos foi considerado um oncogene devido à expressão elevada de seu produto na maior parte dos tumores humanos. Entretanto entre os anos de 1988 e 1989 foi demonstrado que a proteína selvagem p53

poderia inibir a transformação de células em cultura (FINLAY et al. 1989). Desta forma, foi classificado como gene pertencente à família dos genes supressores de tumor (LEVINE et al. 1991).

O gene *TP53* (*P53/LFS1/TRP53/FLJ92943*) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD que contém 393 aminoácidos (SOUSSI et al. 1990). 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). 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 (LIN et al. 1994). 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 (MAY e MAY 1999). O domínio de oligomerização (aminoácidos 323 a 356) é fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela dimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros. O domínio final é o de regulação transcricional que regula a sequência específica de ligação ao DNA (aminoácidos 363 a 393) (WANG e PRIVES 1995) (Figura 1).



Fonte: Adaptado de HAINAUT e OLIVER (2011)

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 1 - O gene *TP53* e a proteína p53

1.3.2 A proteína p53

Segundo LANE e CRAWFORD (1979) os animais que possuíam tumores induzidos pelo vírus SV40 também produziam anticorpos contra a proteína p53 e anticorpos monoclonais para o antígeno T do vírus SV40, formando um complexo entre a proteína p53 e o antígeno T, sendo assim, propuseram que a p53 era um antígeno tumoral. Na primeira década de estudos sobre a proteína p53 verificou-se que sua atividade principal era a de supressão tumoral e não como oncogene, como havia sido proposto anteriormente (ZAMBETTI 2005).

Na segunda década da investigação, a função do p53 foi identificada como fator de transcrição induzido pelo estresse, que pode promover a parada do ciclo celular, apoptose e senescência. Após três décadas de sua descoberta foram descobertas novas funções que estão relacionadas à

regulação dos processos metabólicos e das citocinas, que são necessárias para a implantação do embrião (LEVINE e OREN 2009).

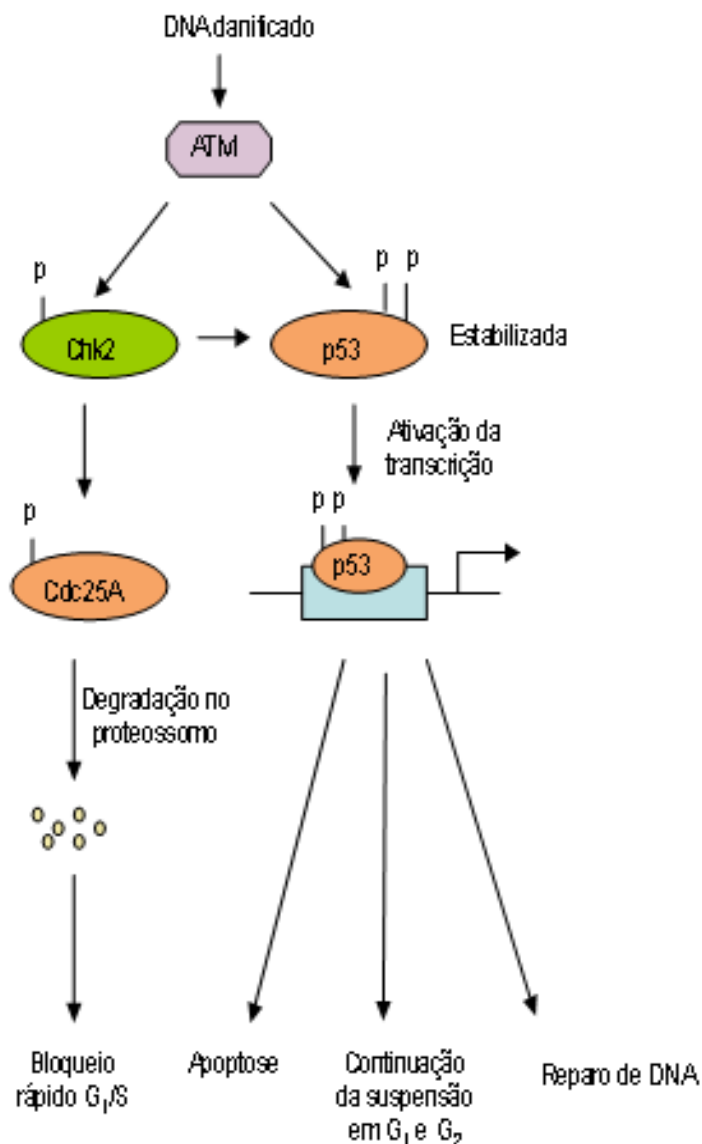
A forma ativa da p53 é um tetrâmero formado por dímeros constituídos por quatro subunidades idênticas. Uma mutação em ponto de troca de sentido em um dos dois alelos do gene *TP53* em uma célula pode anular quase toda a atividade da p53, porque praticamente todos os oligômeros irão conter pelo menos uma subunidade com defeito, impedindo-o de atuar como fator de transcrição. As mutações oncogênicas no *TP53* atuam como dominantes negativas, em que as mutações em um único alelo causam a perda da função (WEINBERG et al. 2004).

Uma característica fundamental no controle do ciclo celular é o ponto de verificação na G1, que impede que as células com o DNA danificado entrem na fase S. A proteína p53 é um sensor fundamental no controle de verificação, que leva a parada do ciclo celular nas células com DNA danificado em G1. Embora a p53 tenha várias funções, sua capacidade de ativar a transcrição de determinados genes é a mais relevante para a sua função de supressão de tumores (CRAWFORD et al. 1984).

As células com p53 funcional são mantidas em G1 quando expostas a radiação que danificam o DNA, enquanto as células que não possuem a p53 funcional não o são. A expressão do gene *TP53* é elevada somente em situações de estresse, como radiação ultravioleta ou raio-γ, calor e baixos níveis de oxigênio. A lesão no DNA causada por radiação γ ou outros estresses leva, de alguma forma, à ativação da ATM, uma serino-quinase que fosforila e estabiliza a p53, resultando em um aumento considerável na

sua concentração. A proteína p53 estabilizada ativa a expressão do gene que codifica p21^{CIP}, que se liga aos complexos de ciclina-CDK da G₁ em mamíferos, inibindo sua função. Como resultado, as células com DNA danificado são mantidas em G₁, para que o DNA seja reparado. Se o reparo for realizado com sucesso, os níveis de p53 e p21^{CIP} diminuem e as células progridem para a fase S (HARPER et al. 1993).

Em condições de estresse, a ATM quinase também fosforila e, assim, ativa a Chk2, uma proteína-quinase que fosforila a proteína fosfatase Cdc25A, marcando-a para degradação mediada por ubiquitina. Essa fosfatase remove o fosfato inibidor na CDK2, um pré-requisito para que as células entrem na fase S. O nível reduzido de Cdc25A, portanto, bloqueia a progressão para a fase S (MAILAND et al. 2000; FALCK et al. 2001) (Figura 2).



Fonte: Adaptado de LODISH et al. (2005).

Legenda: A atividade de quinase de ATM é ativada em resposta a lesões no DNA causadas por vários estresses (por exemplo, radiação UV, calor). A ATM ativada desencadeia duas vias que resultam na suspensão em G₁. A fosforilação da p53 a estabiliza, permitindo a expressão de genes ativados pela p53, que codificam as proteínas que (1) causam a suspensão em G₁ e, em alguns casos, em G₂; (2) promovem a apoptose; e (3) participam no reparo de DNA. Na outra via, a Chk2 fosforilada, por sua vez, fosforila a Cdc25A, marcando-a para degradação e bloqueando sua função na ativação de CDK2.

Figura 2 - Suspensão em G₁ em resposta a lesões no DNA

Quando o controle de verificação pela p53 na fase G₁ não opera corretamente, o DNA danificado pode ser replicado, perpetuando mutações e rearranjos de DNA que serão passados para as células-filhas, contribuindo para sua transformação em células metastáticas. Além disso, a p21^{CIP} e outras duas proteínas induzidas pela p53 inibem o complexo ciclina B- CDK necessário à entrada na mitose, segurando as células em G₂. A p53 também reprime a expressão dos genes que codificam a ciclina B e a topoisomerase II, que são necessárias para a transição de G₂ para a próxima fase da mitose. Assim, se o DNA for danificado após sua replicação, o bloqueio em G₂, induzido pela p53 irá impedir a sua transmissão para as células-filha (SMITS e MEDEMA 2001).

A atividade da p53, normalmente, é mantida reduzida pela proteína Mdm2. Quando a Mdm2 está ligada à p53, inibe a capacidade de ativação da transcrição da p53, e catalisa a adição de moléculas de ubiquitina, marcando a p53 para degradação no proteossomo (ASHCROF e VOUSDEN 1999). A fosforilação da p53 pela ATM remove a Mdm2 ligada na p53, estabilizando a proteína p53. Como o gene *MDM2* é, por sua vez, ativado pela p53, Mdm2 atua como uma alça de retroalimentação auto-reguladora com a p53, talvez impedindo o excesso da função da p53 (WU et al. 1993).

Determinados alelos mutantes frequentemente produzem altos níveis de proteína p53 mutante que acumula na célula. Essa 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 função. Este fenômeno é denominado efeito dominante-negativo (SRIVASTAVA et al. 1993).

1.4 MUTAÇÕES NO GENE *TP53*

A proteína do gene *TP53* desempenha um papel central na manutenção da integridade genômica. A inativação funcional do gene *TP53* é o evento mais comum em tumores humanos e ocorre em pelo menos 50% de todos os cânceres (NIGRO et al. 1989; ZAMBETTI 2005).

A inativação mutacional de *TP53* é um mecanismo comum e ocorre em um amplo espectro de cânceres, tanto esporádicos como hereditários. Na versão 2009 do banco de dados da Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (*International Agency for Research on Cancer – IARC*) (*TP53 Database R14*) para o gene *TP53* foram descritas 26.597 mutações somáticas e 535 mutações germinativas. Na última versão (*TP53 Database R15*), atualizada em novembro de 2010, esse número aumentou para 27.580 mutações somáticas e 597 mutações germinativas descritas (PETITJEAN et al. 2007).

Uma alteração somática clássica encontrada é a deleção de um alelo acompanhada por uma mutação *missense* no alelo remanescente, ambas localizadas no domínio de ligação ao DNA. Análises no espectro mutacional revelam que somente 5% das mutações ocorrem no domínio N-terminal e C-

terminal, enquanto os 95% restantes ocorrem no domínio de ligação ao DNA (ZAMBETTI 2005).

As raras mutações somáticas que ocorrem no domínio N- e C-terminal são do tipo *nonsense* e *frameshift* (levando a uma proteína truncada e alteração no quadro de leitura, respectivamente). Já as mutações situadas no domínio de ligação ao DNA são predominantemente do tipo *missense*, levando a troca de aminoácidos, o que permite que níveis da proteína p53 mutada sejam detectáveis, evento este que não é visto para outros genes supressores tumorais que carregam predominantemente mutações *nonsense*, *frameshifts* e deleções (OLIVIER et al. 2002).

Segundo revisão de VARLEY (2003) mutações somáticas e germinativas ocorrem na mesma proporção nos códons 175, 245, 248, 273 e 282. Outros sítios de mutações germinativas freqüentes são os códons 125, 152, 158, 213, 220. Mutações em sítios de *splicing* são mais frequentemente detectadas em linhagens germinativas do que em tumores, representando cerca de 8% de todas as mutações (PETITJEAN et al. 2007).

1.4.1 p.R337H: mutação específica da população brasileira

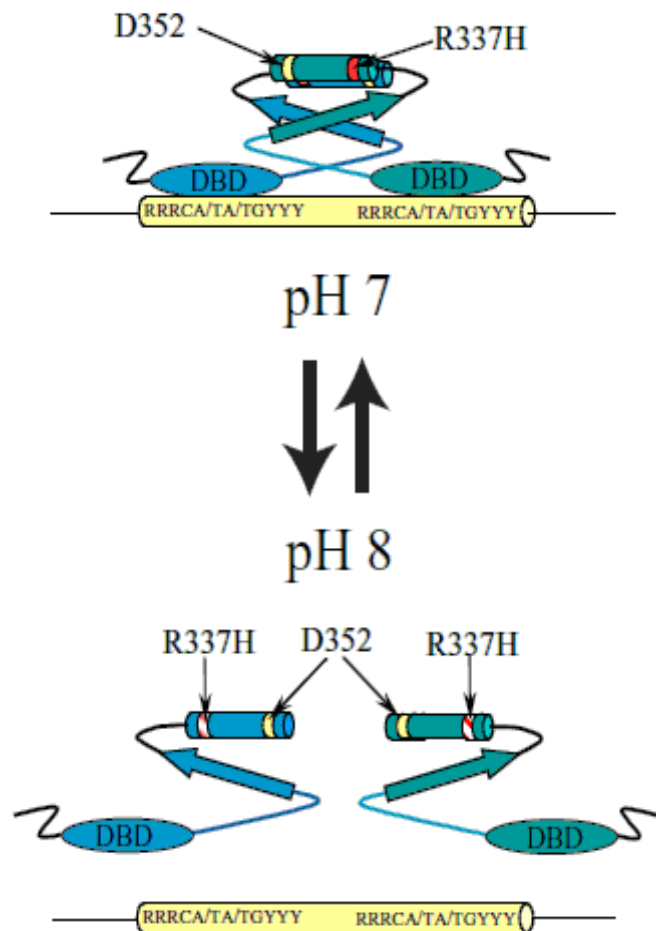
O gene *TP53* apresenta alta penetrância e expressividade variada. Em estudo realizado em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico da LFS/LFL foi possível determinar o padrão e prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* e o perfil de 45 famílias LFS/LFL brasileiras (ACHATZ et al. 2007). 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 histidina (R337H – CGC para CAC no códon 337) foi verificada em 13,3% das famílias e correspondeu a 46,1% de todas as mutações encontradas. As famílias portadoras da mutação p.R337H apresentavam um espectro tumoral amplo, que incluía a alta incidência de câncer da tireóide e câncer renal além de tumores típicos da LFS. Com a intenção de verificar a prevalência desta alteração em um grupo de pacientes assintomáticos da região sul do Brasil, 750 mulheres foram avaliadas quanto a presença da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* (PALMERO et al. 2008). A ocorrência do mutante p.R337H foi verificada em 0,3% da população feminina de Porto Alegre. O grupo liderado por Bonald Figueiredo realizou um estudo populacional visando à avaliação da ocorrência da mutação p.R337H em todos os recém nascidos da cidade de Curitiba, no estado do Paraná. Dados referentes ao primeiro ano do estudo foram publicados na forma de dissertação por PIOVEZAN (2006), indicando que a mutação foi identificada em 64 RNs (64/300098), gerando uma prevalência média de 2,12/1000. A prevalência foi estimada com maior precisão em sete regionais de saúde do estado do Paraná (1,52 a 3,9/1000). No entanto, essas famílias não participam de estratégias de rastreamento de tumores relacionados à síndrome.

1.4.2 Propriedades bioquímicas e biológicas do p.R337H

A mutação p.R337H ocorre em um domínio estrutural bem definido, composto por uma alfa-hélice que é determinante na oligomerização da proteína (MCLURE 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. 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. 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 átomos de hidrogênio a D352 em condições fisiológicas. No entanto, a histidina tem um pK_a inferior à arginina e, em condições de pH aumentado (pH 8,3), 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 (DIGIAMMARINO et al. 2002). Logo, o p.R337H é um exemplo único de um mutante que é dependente de características bioquímicas, sendo inativado frente ao aumento de pH.



Fonte: HAINAUT (2002).

Legenda: A mutação no domínio de oligomerização sensível à alterações no pH. Na parte superior, um dímero de R337H ligado ao DNA. Na faixa de pH fisiológico, a histidina na posição 337 recebe um próton (vermelho), e mantém a ponte de sal com Asp352. Com o pH fisiológico aumentado (pH 8,0), a histidina doa um próton e a ponte de sal com Asp352 se desfaz, induzindo o dímero R337H a se desenrolar. Este provoca a perda de alta afinidade de ligação ao DNA. DBD: domínio de ligação ao DNA (*DNA-binding domain*).

Figura 3 - Esquema das alterações sofridas pela proteína mutante p53-p.R337H de acordo com a variação do pH.

1.5 LFS E TUMORES TÍPICOS DA SÍNDROME

De acordo com um dos critérios diagnósticos da LFS/LFL publicados em 2008 e 2009, portadores de múltiplos tumores primários, pacientes com câncer de mama antes dos 36 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, indivíduos com carcinoma adrenocortical ou carcinoma do plexo coróide podem ser caracterizados como pacientes que devem ser testados para mutações germinativas em *TP53* (BOUGEARD et al. 2008; TINAT et al. 2009).

1.5.1 Múltiplos Tumores Primários

A ocorrência de múltiplos tumores primários pode ser devido a vários fatores. Malignidades subsequentes podem ocorrer após as terapias para o tratamento do primeiro tumor que podem induzir a carcinogênese, no entanto eles também podem ocorrer devido a fatores de risco comum, incluindo exposição ambiental, estilos de vida e aos genes herdados de predisposição à maior suscetibilidade (ROSSO et al. 2009).

A ocorrência de mais de um tumor primário em um mesmo indivíduo é um evento incomum na população geral e que pode ser verificado em diversas SPHC. A ocorrência de câncer colorretal e câncer de endométrio em uma mesma paciente é verificado em portadores de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) (AARNIO et al. 1995; DUNLOP et al. 1997), assim como tumores malignos de mama e ovário em pacientes com a Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário (CMOH) (NCCN 2011).

O mesmo ocorre em diversas outras síndromes, a citar: Síndrome de Câncer de Mama e Cólon Hereditário (CMCH) (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2003), Câncer gástrico difuso hereditário (BROOKS-WILSON et al. 2004), Melanoma Familiar (MF), (GREENE 1999), Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 e 2 (SPIEGEL et al. 1998; BRANDI et al. 2001), Doença de Von Hippel-Lindau (LONSER et al. 2003), Síndrome de Cowden (BOTMA et al. 2002) e Retinoblastoma Hereditário (KLEINERMAN et al. 2005). Na Síndrome de Li-Fraumeni (HISADA et al. 1998) a ocorrência de múltiplos tumores em um mesmo indivíduo é frequente e compõe um dos critérios recentemente revistos para o diagnóstico da síndrome (TINAT et al. 2009).

Múltiplos tumores primários são comuns em indivíduos portadores de mutações germinativas no gene *TP53*, acometendo até 21% de todos os pacientes portadores da síndrome de LFS/LFL (HISADA et al. 1998).

Em um estudo realizado com 24 famílias portadoras da LFS/LFL, nas quais 200 membros haviam desenvolvido câncer, 30 (15%) indivíduos desenvolveram um segundo câncer, oito indivíduos (4%) tiveram um terceiro tumor primário, enquanto quatro (2%) desenvolveram um quarto câncer primário. Paciente portador de LFS/LFL que já desenvolveu um tumor possui uma probabilidade cumulativa de desenvolver um segundo tumor, após 30 anos do diagnóstico do primeiro, de 57% (+/- 10%), Separando por faixa etária, o risco relativo (RR) de ocorrência de um segundo tumor em famílias com a LFS/LFL, foi de 83,0 (IC 95% = 36,9-187,6) para indivíduos com o primeiro tumor em idade inferior a 19 anos, valor de RR igual a 9,7 (IC 95%= 4,9-19,2) em pacientes que desenvolveram o primeiro tumor entre 20 e 44

anos, e RR de 1,5 (IC 95%= 0,5-4,2) para indivíduos com 45 anos ou mais (HISADA et al. 1998).

1.5.2 Câncer de mama em idade jovem

Uma das principais características de câncer de mama hereditário é a ocorrência em idade jovem. A principal síndrome hereditária envolvida com o câncer de mama em idade precoce é a Síndrome do câncer de mama e ovário hereditário relacionado a mutações germinativas nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (MIKI et al. 1994; WOOSTER et al. 1994).

A síndrome do câncer de mama e ovário hereditário juntamente com a síndrome de Li-Fraumeni constituem a maior parte das alterações hereditárias ligadas aos tumores mamários em idade jovem (NAROD e FOULKES 2004). Desta forma, pacientes com câncer de mama em idade jovem, antes dos 30 anos de idade sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* devem ser testados para o gene *TP53*, especialmente se possuírem histórico familiar de sarcoma, tumor de sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical ou carcinoma do plexo coróide (NCCN 2011).

Em estudo realizado por LALLOO et al. (2003) para a detecção de mutações germinativas no gene *TP53* em 99 pacientes diagnosticadas com câncer de mama antes dos 30 anos de idade, foram encontradas duas mutações em 36 familiares que preenchiam critérios para LFS e LFL e uma alteração foi encontrada em uma paciente que não possuía antecedentes familiares. O teste genético foi realizado nos pais, no entanto o resultado foi negativo, sugerindo se tratar de uma mutação *de novo*. Outra paciente

dentro do grupo não familiar era portadora de uma mutação *missense* previamente não descrita, com suscetibilidade de ser patogênica, sua mãe havia desenvolvido carcinoma de bexiga aos 61 anos e também era portadora da alteração.

WALSH et al. (2003) estudaram 300 pacientes com câncer de mama invasivo e histórico familiar de câncer de mama, as quais eram negativas para mutações em *BRCA*. Somente três dos 300 (1%) casos deste estudo tinham mutação em *TP53*.

Devido a ausência de alteração no gene *TP53* em 95 mulheres com câncer de mama antes dos 30 anos de idade, GINSBURG et al. (2009), sugerem que o teste genético para o gene *TP53* só deve ser indicado para mulheres com câncer de mama com critérios clínicos para a síndrome de Li-Fraumeni.

1.5.3 Tumor Adrenocortical

A ocorrência de tumores adrenocorticais é um evento raro. A incidência de tumores adrenocorticais é de 0,3 casos por milhão, em crianças abaixo de 15 anos, e 1,7 casos por milhão em adultos, enquanto que na população Li-Fraumeni, atinge até 5 a 10% das crianças portadoras de mutações germinativas (BIRCH et al. 2001) e corresponde a 3% de todos os tumores ocorridos em qualquer idade em pacientes LFS/LFL e 10% dos tumores ocorridos na infância (VARLEY et al. 1999)

Em estudo realizado em crianças com tumores adrenocorticais foi demonstrada a ocorrência de mutações germinativas no gene *TP53* em

aproximadamente 50% a 80% dos casos (VARLEY et al. 1999; RIBEIRO et al. 2010).

Apesar dos tumores adrenocorticais não serem uma doença comum, no sul do Brasil a prevalência é 15 vezes maior de que em outras partes do mundo. A maioria das crianças com ADR, provenientes desta região, é portadora da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* (MARQUES-PEREIRA et al. 2006).

A incidência de tumores adrenocorticais pode ser também verificada em outras síndromes de predisposição hereditária ao câncer, decorrentes de anormalidades em genes que codificam fatores de transcrição implicados na proliferação celular, diferenciação, senescência, apoptose e instabilidade genômica. Entre estes genes estão inclusos *TP53*, *MEN1*, *APC* e *PRKAR1A* (RIBEIRO et al. 2010)

Estudo realizado por MICHALKIEWICZ et al. (2004) com crianças cadastradas no Registro Internacional de Tumores Adrenocorticais Pediátricos (*International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* - IPACTR), revelou que não há diferença nas características de apresentações clínicas dos pacientes portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e naqueles que não as têm. Neste estudo cerca de 80% dos pacientes tinham mutação germinativa em *TP53*. A idade média ao diagnóstico foi aos 3,2 anos. Menos de 15% dos pacientes tinham 13 anos de idade ou mais no momento do diagnóstico. A incidência foi maior entre as meninas do que em meninos na razão de 1,6:1.

1.5.4 Carcinoma do Plexo-Coróide

Enquanto astrocitomas (40-55%), meduloblastomas (20-30%), e ependimomas (10-15%), representam a maioria dos tumores de sistema nervoso central em crianças menores de 15 anos de idade, tumores do plexo coróide representam 1-5% dos tumores SNC na população em geral e tem uma incidência ainda maior em pacientes abaixo dos dois anos de idade (WOLFF et al. 2002).

O carcinoma do plexo coróide é um tumor muito agressivo, com um prognóstico desfavorável e maior ocorrência na primeira década de vida (38%) (MELO et al. 2003)

Pacientes com carcinoma do plexo coróide tem um índice de sobrevida de 71, 41 e 35% em um, cinco e 10 anos respectivamente (WOLFF et al. 2002). De acordo com os critérios de Chompret modificado, pacientes portadores de carcinoma de plexo coróide, independente de histórico familiar de câncer, preenchem critérios para LFS/LFL (BOUGEARD et al. 2008; TINAT et al. 2009).

Em um estudo realizado por CUSTODIO et al. (2011) com crianças admitidas no Hospital Pequeno Príncipe, (Curitiba/PR- Brasil) que desenvolveram carcinoma do plexo coróide, foi encontrada a presença da mutação p.R337H em 63,3% (14/22) das crianças analisadas. Os familiares relataram ainda histórico familiar de câncer, sendo o de mama, estômago, próstata e adrenocortical os mais referidos.

Considerando que a mutação p.R337H no gene *TP53* esta presente em frequência semelhante em outros estados do sul do Brasil, é provável

que o número real de carcinomas do plexo coróide em crianças, como também outros tumores do espectro da síndrome, ocorridos devido à alteração, seja superior ao anteriormente divulgado de 0,3 por milhão (BERGER et al. 1998).

A determinação da frequência de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes com múltiplos tumores primários e em pacientes com certas neoplasias do espectro da Síndrome de Li-Fraumeni, pela avaliação dos tumores adrenocorticais e de carcinomas do plexo coróide, além dos cânceres de mama em mulheres jovens sem mutações em *BRCA1* e *BRCA2*, permitirá compreender a importância de investigação de alterações frente à ocorrência isolada destes tumores. A melhor caracterização dos critérios da síndrome e a identificação de indivíduos portadores poderão permitir a definição de protocolos de rastreamento e acompanhamento clínico para o paciente afetado e seus familiares.

2 JUSTIFICATIVA

Em centros de referência no tratamento de indivíduos com câncer, pacientes com características incomuns, como múltiplos tumores primários, ou tumores habitualmente raros, são acompanhados em maior número. Isto cria um contexto único que proporciona a análise de tumores pouco frequentes em um grupo de pacientes raros.

Recentemente os critérios da LFL foram revistos (Chompret versão 2009) e passaram a incluir indivíduos que desenvolveram tumores isolados como critérios únicos para a síndrome de LFS/LFL. No entanto, não se conhece a parcela deste grupo que tem efetivamente mutações em *TP53*.

Frente à dificuldade de diagnóstico e alta incidência da mutação p.R337H em pacientes com a síndrome de Li-Fraumeni, justifica-se a necessidade de incluir critérios mais eficazes capazes de identificar estes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste projeto é avaliar mutações germinativas no gene *TP53* em indivíduos com múltiplos tumores e em pacientes com tumores isolados típicos da LFS/LFL para verificar a possibilidade de identificação de critérios e manifestações clínicas mais específicas presentes nestes portadores.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Caracterização clínica e molecular da LFS/LFL em portadores de múltiplos tumores;
- 2 Determinação da prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* em portadores de tumores adrenocorticais e em amostras de carcinoma de plexo coróide isolados;
- 3 Determinação da frequência de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes com câncer de mama em idade jovem e sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*;
- 4 Correlação dos genótipos e fenótipos encontrados com os dados de outros portadores de mutações germinativas no banco de mutações em *TP53*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DE PACIENTES

Inicialmente foi realizada a busca ativa nos prontuários registrados no Serviço de Arquivo Médico (*SAME*) do Hospital A.C. Camargo, nos períodos de 1990 até os dias de hoje, como também colaboração com o Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC), São Paulo, SP; Hospital de Câncer Pio XII, Barretos, SP; Hospital Sara Rolim Caracante (GPACI), Sorocaba, SP; e Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC; para seleção dos pacientes (Anexo 1).

Neste projeto foram incluídas 109 amostras divididas em quatro grupos (1) sangue periférico de pacientes com múltiplos tumores primários (MP=54), (2) sangue periférico de pacientes com diagnóstico de câncer de mama antes dos 35 anos e sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* (CM=41), (3) sangue periférico de pacientes portadores de tumor adrenocortical (ADR=11) e (4) amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina de carcinomas do plexo coróide (PC=3)

As amostras de sangue periférico de pacientes que desenvolveram tumores de plexo coróide não estavam disponíveis devido à raridade e alta letalidade. Assim foram selecionados do Banco de Tumores do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, amostras fixadas em formalina e em blocos de parafina de carcinomas do plexo

coróide (PC=3), para a extração do DNA das margens não tumorais e avaliação de mutações no gene *TP53*.

Quadro 4 - Critérios de inclusão.

Critérios de inclusão (pelo menos 1 dos itens)
– Pacientes com múltiplos tumores primários: • Pacientes portadores de mais de um tumor primários que preencham os critérios de Chompret 2009. • Pacientes com múltiplos tumores primários com pelo um deles ocorrido antes dos 46 anos de idade. • Paciente com três ou mais tumores primários, independente de idade ou sítio. • Paciente com múltiplos tumores primários independente de idade, sendo um deles tumor adrenocortical.
- Paciente portador de câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i> , independente da história familiar
- Paciente portador de tumor adrenocortical independente da história familiar;
- Paciente portador de carcinoma do plexo coróide independente da história familiar

Os pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos de idade e que eram negativos para mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram testados para o gene *TP53*. O projeto de rastreamento dos genes *BRCA1* e *BRCA2* é coordenado pela Dra Maria Mitzi Brentani, vice-chefe do Laboratório de Oncologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo FMUSP.

De acordo com os critérios de inclusão propostos, os pacientes com múltiplos tumores primários se dividiram em quatro grupos, sendo estes: MP 1 - Pacientes portadores de mais de um tumor primário que preencham os critérios de Chompret 2009; MP 2 - Pacientes com múltiplos tumores primários com pelo um deles ocorrido antes dos 46 anos de idade; MP 3 -

Paciente com três ou mais tumores primários, independente de idade ou localização anatômica; e MP 4 - Paciente com múltiplos tumores primários independente de idade, sendo um deles adrenocortical (Tabela 1).

Tabela 1 - Divisão dos grupos dos pacientes com múltiplos tumores primários de acordo com os critérios de inclusão.

Grupos	Critérios de inclusão	N	Frequência
MP 1	Pacientes portadores de mais de um tumor primários que preencham os critérios de Chompret 2009.	6	11,1%
MP 2	Pacientes com múltiplos tumores primários com pelo um deles ocorrido antes dos 46 anos de idade.	30	55,6%
MP 3	Paciente com três ou mais tumores primários, independente de idade ou sítio.	15	27,8%
MP 4	Paciente com múltiplos tumores primários independente de idade, sendo um deles tumor adrenocortical.	3	5,6%
Total		54	

Os critérios de exclusão são pacientes com múltiplos tumores de mama e pacientes portadores de tumores de mama e ovário, por ser esta associação característica de portadores de mutações germinativas em *BRCA1* e *BRCA2* (Quadro 5).

Quadro 5 - Critérios de exclusão.

Critérios de exclusão
- Paciente portador de múltiplos tumores de mama na ausência de outras neoplasias malignas
- Pacientes portadores de tumores de mama e ovário, por ser esta associação característica de portadores de mutações germinativas em <i>BRCA1</i> e <i>BRCA2</i>

Todos os pacientes recrutados do Hospital A.C. Camargo e dos demais centros colaboradores foram submetidos ao aconselhamento genético pré-teste por um médico geneticista treinado do departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo. Os pacientes que quiseram participar, voluntariamente, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

4.2 EXTRAÇÃO DO DNA

4.2.1 Sangue Periférico

Amostras de 8 mL de sangue periférico foram coletadas de maneira convencional em tubos contendo EDTA (Ácido etilenodiamino tetra-acético) e estocadas a 4° C. O sangue foi encaminhado para o Laboratório de Ácidos Nucléicos, coordenado pela Dra. Dirce Maria Carraro, onde foi processado para a purificação do DNA. A separação dos linfócitos ocorreu em um período inferior a sete dias após a data da coleta. O precipitado linfocitário foi obtido a partir das amostras de sangue após de centrifugação por 10-30 minutos a 1000 rcf a temperatura ambiente (18°C), sendo o plasma sobrenadante transferido para tubos de 1,5mL e estocados a -70°C. O restante do sangue foi transferido para um tubo falcon de 50mL, o qual foi completado com TE 1x (pH 8,0) até 40 mL. O tubo falcon foi vortexado por 2 minutos, até a solução ficar homogênea e centrifugado a 3500 rpm por sete minutos. Após a centrifugação aspirou-se 35mL e deixou-se 5mL no tubo falcon, vortexou-se o restante e foi adicionado 35mL de TE até completar

40mL no tubo falcon de 50mL. O tubo foi vortexado por mais dois minutos e centrifugado por sete minutos a 3500 rpm. Repetiu-se a lavagem com TE até o *pellet* ficar livre de hemácias. Aspirou-se 38mL do lisado, vortexou-se os 2mL restantes, após esse procedimento o conteúdo foi distribuído em dois tubos de 1,5mL, sendo 1mL o conteúdo de cada tubo. O tubo foi centrifugado por cinco minutos na velocidade máxima (13200 rpm), desprezou-se o sobrenadante e o tubo contendo o *buffy coat* seguiu para extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada por meio do Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen) a partir de um tubo de 1,5mL contendo o *buffy coat*. O tubo foi completado com 600µL da Cell Lysis Solution, os leucócitos foram ressuspensos e o tubo foi levado ao banho à 55°C por 12 horas sob agitação.

Adicionou-se 140µL de *Protein Precipitation Solution*, homogeneizou-se por 20 segundos. O tubo foi incubado no gelo por 5 a 15 minutos. Centrifugou-se o tubo após a incubação, a 14000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente. Transferiu-se o sobrenadante para um novo tubo e adicionou-se 600µL de isopropanol 100% e misturou-se por inversão. O tubo foi centrifugado à 14000 rpm por 30 minutos a 4°C. Após a centrifugação desprezou-se o sobrenadante. Foi adicionado 1mL de etanol 70% e misturou-se por inversão. O tubo foi novamente centrifugado, 14000 rpm por 2 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e lavou-se a amostra mais uma vez. Cuidadosamente, foi retirado com uma pipeta o sobrenadante e o excesso de etanol e o tubo foi seco à temperatura ambiente. Adicionou-se

100µL de água *Sigma* e este foi levado ao banho à 55°C para dissolver o *pellet* por 20 minutos. Deixou-se à 4°C *overnight*.

A pureza do DNA foi quantificada e avaliada no Nanodrop, e a integridade em gel de agarose 0,8%.

Após a extração, alíquotas de DNA foram distribuídas para realização do rastreamento e o restante armazenado a -20°C.

4.2.2 Amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina

Os blocos de parafina com carcinoma do plexo coróide foram analisados pela Dra Isabela Werneck da Cunha, médica patologista do Departamento de Patologia Molecular aplicada ao Diagnóstico Oncológico do Hospital AC Camargo, a qual delimitou a localização das margens não tumorais para a extração do DNA. Pequenos cilindros de 1mm retirados com *punch*, foram obtidos dos blocos de parafina.

Nos blocos nos quais não foi possível diferenciar os tecidos, foram feitos cinco cortes de 5µm nos quais realizou-se a microdissecção a laser (LCM), técnica para seleção e captura de uma única célula ou população de células puras em meio a um tecido heterogêneo.

Após a obtenção de tecido normal os materiais foram tratados em um tubo de 1,5mL com 1mL de xilol para remoção da parafina. Agitou-se por inversão e o tubo foi incubado por 5 minutos a 57°C. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13200 rpm. Removeu-se o sobrenadante com a pipeta. Repetiu-se mais uma vez o procedimento e o xilol foi descartado em lixo orgânico. Foi adicionado 500µL de etanol 100% à amostra. Homogeneizou-

se por inversão até dissolver o *pellet*. O tubo foi centrifugado por 15 minutos a 13500 rpm. O sobrenadante foi removido com uma pipeta. Repetiu-se o procedimento com etanol 100% mais duas vezes. Foi adicionado 600µL de tampão de digestão, *Cell Lysis Solution* (Gentra Puregene Blood Kit – Qiagen), no *pellet* gerado. Incubou-se a 55°C em agitação por 18 horas. Nos casos em que o tecido não dissolveu por completo foi adicionado mais 10-15µL de Proteinase K.

A amostra do tubo de 1,5mL foi transferido para um tubo *Phase Lock Gel* (PLG) após este ter sido centrifugado por um minuto a 13200 rpm, para que toda resina descesse para o fundo. Após a transferência da amostra foi adicionado 600µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico. Homogeneizou-se por inversão por um minuto. O tubo foi centrifugado por 10 minutos a 13200 rpm. A parte aquosa, acima da resina do tubo, foi transferida para um novo tubo PLG. Adicionou-se 600µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (na proporção 25:24:1). O tubo contendo a amostra foi homogeneizado e centrifugado por 10 minutos a 13200 rpm.

Foi adicionado a esse tubo PLG a quantia de 600µL de clorofórmio, o qual foi homogeneizado por inversão por um minuto e centrifugado por 10 minutos a 13200 rpm.

A fase aquosa deste tubo foi transferida para um tubo de 2mL e adicionou-se 0,5µL de glicogênio (20mg/mL), 100µL de acetato de amônio 7,5M e 800µL de etanol 100% gelado. Homogeneizou-se bem por inversão. O tubo ficou incubado por uma hora a -20°C e depois centrifugado por 30 minutos a 14000 rpm a 4°C. Removeu-se o sobrenadante. Lavou-se o *pellet*

três vezes com 1mL de etanol 70% gelado. O *pellet* foi ressuspendido na primeira lavagem. O tubo foi centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm a 4°C. Removeu-se o sobrenadante com uma pipeta. O *pellet* foi seco a temperatura ambiente e o tubo foi incubado a 55°C por 10 minutos. O *pellet* foi ressuspendido em aproximadamente 30µL de água. A amostra foi deixada a 4°C por 12 horas.

A integridade do DNA foi avaliada com 0.5µg em gel de agarose 0,8% ou por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (β -actina – íntron). As amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

4.3 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES NO GENE *TP53* A PARTIR DO SEQUENCIAMENTO

Todas as amostras foram submetidas à detecção de mutações germinativas no gene *TP53*. O DNA das amostras foi amplificado pela PCR e os éxons codificantes, éxons 2 ao 11, do gene *TP53* foram analisado. Esses DNAs foram amplificados a partir da utilização de *primers* intrônicos específicos, padronizados no Laboratório de Patologia Diagnóstica Molecular no serviço de diagnóstico do Hospital AC Camargo, sob coordenação da Dra. Dirce Maria Carraro, a partir de 50ng de DNA genômico, na presença de enzima Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen). As condições da PCR foram: 2,0mM de MgSO₄, 0,2mM de dNTP, 0,2µM de cada *primer*, 0,5U de Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2,0µL de tampão de reação para *Taq* High Fidelity 10x

(concentração final de 1x) e água autoclavada para completar 20µL de reação.

Para todos os éxons a reação de amplificação foi iniciada a partir de uma etapa de desnaturação inicial de 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 45 segundos, pareamento a 57°C por 45 segundos e extensão a 68°C por 1 minuto, com uma etapa final de extensão a 68°C por 5 minutos.

Para o rastreamento de alterações na sequência de DNA a técnica empregada consiste no sequenciamento automático, em ambas as direções, direta e reversa pelo Sequenciador automático *ABI Prism 3130XL* (Applied Biosystems®). A reação de amplificação para o sequenciamento foi realizada utilizando-se 5pmol (0,5µM) de primer direto ou reverso para cada éxon e o kit *BigDye 1.1* (Applied Biosystems). Utilizou-se 0,5µL de *BigDye*, 1,5µL do tampão *Save Money* (5x), 200ng/µL de DNA amplificado por PCR e água autoclavada para completar 10µL da reação.

A reação de sequenciamento iniciou-se com etapa de desnaturação inicial a 95° por 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 18 segundo, pareamento a uma temperatura de 57°C por 18 segundos e extensão a 60°C por 4 minutos. Foi realizada então a etapa de precipitação na qual se adicionou 1µL de EDTA 125mM pH 8,0 e 1µL de AcNa (acetato de sódio) 3M pH 5,2 às amostras, realizou-se um *spin* na placa contendo as amostras e adicionou-se 25µL de etanol 100% sendo a mistura mantida por 15 minutos a temperatura ambiente, sem contato com a luz. Em seguida as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm por 30 minutos a 4°C, o

sobrenadante foi descartado, as amostras foram submetidas à um *spin* invertido a aproximadamente 500 rpm por 10 segundos na centrífuga. Foi adicionadas as amostras 35µL de etanol 70%. Novamente as amostras foram centrifugadas, 4000 rpm por 25 minutos a 4°C, o sobrenadante foi novamente descartado, seguido de *spin* invertido. Com as amostras já secas foi adicionado 15µL de formamida Hi-Dy e depois estas foram incubadas a 95°C por 5 minutos para desnaturação. Após esse procedimento as amostras foram colocamos no gelo por 3 minutos para bloquear o processo de desnaturação e colocadas no sequenciador posteriormente. O produto de sequenciamento foi analisado pelo software Sequence Scanner e CLC Main Workbench 5, comparando com uma sequência referência (NM_000546.4) (PETITJEAN et al. 2007).

4.4 PREDIÇÃO DA PATOGENICIDADE MEDIANTE OS PROGRAMAS *IN SILICO*, POLYPHEN E SIFT

As mutações que levam a alteração de aminoácido na proteína e que não estavam descritas no banco de dados do IARC (*TP53 Database R15*) (PETITJEAN et al. 2007) foram analisadas segundo programas de predição de patogenicidade, por algoritmos computacionais, estes tentam correlacionar à substituição do aminoácido e a consequência dessa alteração na estrutura e função da proteína. *Softwares* disponíveis *online*, como o *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) e *Polymorphism Phenotyping* (Polyphen), para análise de alterações *missense* (COUCH et al. 2008). O

SIFT prevê se a substituição de um aminoácido afeta a função da proteína com base na homologia da sequência e nas propriedades físicas dos aminoácidos para calcular os escores de patogenicidade (NG e HENIKOFF 2003). Enquanto que o *Polyphen* utiliza de comparações físicas entre a sequência original e alterada (COUCH et al. 2008).

Os valores do SIFT são de 0 a 1, escores $\leq 0,05$ foram considerados como “Affect protein function” (afeta a função protéica), enquanto escores $\geq 0,05$ foram considerados como “tolerantes”, seguindo as recomendações do programa (NG e HENIKOFF 2001)

Os valores do Polyphen são de 0 a 3.37, escores >2.0 foram considerados como “provavelmente patogênicos”, enquanto escores de 1.50-1.99 indicaram que a variante poderia ser “possivelmente patogênica” e os escores de 0 a 1.49 como “benignos”, seguindo as recomendações do programa (RAMENSKY et al. 2002).

4.5 PÓS-TESTE

Após os resultados positivos serem confirmados em segunda amostra independente e o teste passar por todos os critérios estabelecidos pelo Laboratório de Patologia Diagnóstica Molecular no serviço de diagnóstico do Hospital AC Camargo, estes foram liberados e todos os pacientes foram convocados para a realização do aconselhamento pós-teste e entrega dos resultados no departamento de Oncogenética dessa instituição. O aconselhamento genético pós-teste foi realizado por um médico geneticista e

permitiu ao indivíduo rever informações fornecidas no aconselhamento pré teste para melhor compreender o significado do resultado. Estas informações incluem o diagnóstico e risco pessoal de desenvolver câncer; compreender o modo de herança das SPHC e seu risco de recorrência individual e/ou familiar; facilitando as decisões sobre opções disponíveis de manejo mais apropriada para seu caso individual e aceitando melhor o diagnóstico.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS

Neste estudo foram incluídos 54 pacientes com múltiplos tumores primários, sendo referida a ocorrência de 148 tumores primários, destes 79,1% (117/148) confirmados por laudos anatomopatológicos ou relatórios médicos.

Dentre estes pacientes, 35,2% (19/54) apresentaram pelo menos dois tumores primários, 55,5% (30/54) indivíduos apresentaram três tumores primários e 9,3% (5/54) indivíduos desenvolveram quatro tumores primários. A média de tumores por paciente foi de 2,7. A maioria dos indivíduos com múltiplos tumores primários era do sexo feminino, 79,6% (43/54).

O tumor mais frequente em portadores de múltiplos tumores primários foi o câncer de mama (27,7%) que é um tumor típico da LFS/LFL. No grupo de pacientes com múltiplos tumores, 32 mulheres desenvolveram o câncer de mama, sendo que 28,1% (9/32) apresentaram acometimento bilateral, além de outras neoplasias malignas. A idade média de ocorrência de câncer de mama verificada foi aos 49,1 anos e a ocorrência dos tumores mamários foi mais frequente entre 31 a 45 anos. É interessante notar a ocorrência de um caso de tumor Phyllodes maligno de mama em uma paciente com 15 anos de idade, que desenvolveu outros tumores malignos, sendo

osteossarcoma de fêmur direito aos nove anos, osteossarcoma em tíbia esquerda aos 13 anos e leucemia aos 16 anos.

O câncer da tireóide foi o segundo tumor mais referido, representando 10,8% (16/148) do total de tumores ocorridos nos pacientes com múltiplos tumores. Acometeu em sua maioria pacientes antes dos 45 anos de idade. No entanto, pôde-se observar a presença do câncer da tireóide em 43,8% dos pacientes acima de 46 anos de idade (Tabela 2).

O melanoma foi o terceiro tumor mais frequente (15/148) acometendo pacientes acima dos 45 anos. O quarto tumor mais referido foi o sarcoma (14/148), com ocorrência predominante em pacientes antes dos 45 anos. Foi verificada a presença de quatro casos de tumores adrenocorticais nos pacientes MP, sendo que nenhum foi diagnosticado antes dos 15 anos de idade, ocorrendo principalmente em adultos, em média de idade de 52 anos e mediana de 54 anos.

Apenas um paciente (MT-9/MP) que desenvolveu tumor adrenocortical aos 58 anos, teve como outro tumor primário um câncer do espectro típico da LFS/LFL, um sarcoma de partes moles aos 64 anos.

Dois pacientes que desenvolveram o tumor adrenocortical tiveram como outros tumores primários, cânceres que não correspondiam ao espectro da LFS/LFL, mas que já foram referidos em famílias portadoras da síndrome, câncer de próstata e câncer colorretal.

O paciente do grupo MP que desenvolveu o tumor adrenocortical em idade mais jovem aos 26 anos, desenvolveu um segundo tumor primário

indeterminado que foi diagnosticado devido à metástase pulmonar de sítio primário desconhecido.

Tabela 2 - Perfil Tumoral de Pacientes com Múltiplos Tumores Primários.

Tumores	N	0-15 anos	16-30 anos	31-45 anos	46-60 anos	Acima de 60 anos
Total	148 (100%)					
Mama	41 (27,7%)	1 (2,4%)	0	18 (43,9%)	16 (39%)	6 (14,6%)
Tireóide	16 (10,8%)	0	2 (12,5%)	7 (43,8%)	5 (31,3%)	2 (12,5%)
Melanoma	15 (10,1%)	0	3 (20%)	4 (26,7%)	6 (40%)	2 (13,3%)
Sarcoma	14 (9,5%)	3 (21,4%)	3 (21,4%)	6 (42,9%)	1 (7,1%)	1 (7,1%)
Colorretal	12 (8,1%)	0	0	5 (41,7%)	4 (33,3%)	3 (25%)
Trato genital feminino	10 (6,8%)	1 (10%)	0	2 (20%)	3 (30%)	4 (40%)
CEC	9 (6,1%)	0	2 (22,2%)	4 (44,4%)	1 (11,1%)	2 (22,2%)
Linfoma	9 (6,1%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)	3 (33,3%)	1 (11,1%)
Adrenocortical	4 (2,7%)	0	1 (25%)	0	2 (50%)	1 (25%)
Sarcoma ósseo	4 (2,7%)	2 (50%)	2 (50%)	0	0	0
GIST	3 (2,0%)	0	0	1 (33,3%)	1 (33,3%)	1 (33,3%)
Leucemia	2 (1,4%)	0	1 (50%)	0	1 (50%)	0
Retinoblastoma	2 (1,4%)	2 (100%)	0	0	0	0
Bexiga	1 (0,7%)	0	0	0	1 (100%)	0
Gástrico	1 (0,7%)	0	0	0	1 (100%)	0
Indeterminado	1 (0,7%)	0	0	1 (100%)	0	0
Pâncreas	1 (0,7%)	0	0	0	1 (100%)	0
Próstata	1 (0,7%)	0	0	0	1 (100%)	0
Pulmão	1 (0,7%)	0	0	1 (100%)	0	0
Sistema nervosos central	1 (0,7%)	0	1 (100%)	0	0	0

Legenda: CEC: Carcinoma Espinocelular; GIST: Tumor estromal gastrointestinal.

A idade média de aparecimento do primeiro tumor primário foi aos 37,8 anos. O primeiro tumor primário mais referido foi o câncer de mama, correspondendo a 24% (13/54) de todos os tumores, seguido do sarcoma

com 16,6% (9/54), melanoma e tireóide, os dois com uma frequência de 13% (7/54).

A presença do câncer de mama foi observada na maioria dos pacientes, sendo assim a maioria das associações de múltiplos tumores continha o tumor de mama. A associação mais frequentemente encontrada em um único indivíduo foi câncer de mama junto ao câncer da tireóide, correspondendo a 18,5% (10/54) das associações observadas. Destes 10 pacientes observados com tumor de mama e tireóide, sete apresentaram um terceiro tumor primário (7/10) e dois destes tumores eram câncer colorretal (2/7).

A presença de melanoma e câncer de mama foi a segunda associação mais verificada, ocorrendo em 14,8% (8/54) dos pacientes com múltiplos tumores primários. Três indivíduos (3/8) desenvolveram um terceiro tumor primário que foram dois cânceres colorretais e um câncer de bexiga.

A presença de câncer de mama, câncer colorretal e um terceiro tumor primário, não sendo este um câncer da tireóide, ocorrido em um mesmo paciente foram verificados em 7,4% (4/54) dos indivíduos portadores de múltiplos tumores primários. Foi também observada a presença linfoma e câncer de mama em 7,4% (4/54) dos pacientes do grupo MP.

Em 5,6% (3/54), foram verificadas a associação sarcoma de partes moles e câncer de mama; e sarcoma de partes moles e câncer da tireóide.

Todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos ao aconselhamento genético, quando foi avaliada a história pessoal de tumores

ocorridos no paciente, assim como a história familiar de tumores e elaboração do heredograma.

Quando analisados os heredogramas dos pacientes do grupo MP, 31,5% (17/54) não referiram ter histórico familiar de câncer. Dentre os pacientes MP que tinham história familiar de câncer, 51,9% (28/54) preenchiam critérios para a LFL, de acordo com os critérios de Eeles 1, critérios Birch e Chompret. Outros pacientes com histórico pessoal de múltiplos tumores primários e histórico familiar de câncer preenchiam critérios para outras SPHC, como Síndrome de câncer de mama e ovário hereditário, síndrome de câncer de mama e cólon hereditário, Câncer Colorretal hereditário sem Polipose, Xeroderma Pigmentoso e Melanoma Familiar (Tabela 3).

Tabela 3 - Critérios Clínicos dos pacientes do grupo MP.

Critérios	Pacientes (n)	Frequência (%)
Múltiplos Tumores isolados	17	31,5
LFL	28	51,9
Outros	9	16,6
Total:	54	100

Legenda: LFL: Síndrome de Li-Fraumeni *like* (Vide Quadro 1).

5.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA ANTES DOS 35 ANOS SEM MUTAÇÃO NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2*

Foram incluídas 41 pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos que tinham sido previamente investigadas por sequenciamento direto das regiões codificantes dos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sem mutação germinativa detectada pelo método. Dentre os casos incluídos, 90,24% (37/41) eram pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo, 7,31% (3/41) desenvolveram carcinoma lobular invasivo e 2,44% (1/41) carcinoma papilífero de mama. Nenhuma paciente tinha desenvolvido câncer de mama bilateral.

Dentre as 41 pacientes com câncer de mama, 15 desenvolveram câncer de mama antes dos 30 anos de idade (CMMJ=15) e 26 correspondiam a pacientes que desenvolveram câncer de mama entre 31 e 35 anos de idade (CMJ=26). A idade média ao diagnóstico foi aos 30,8 anos.

Dentre as 41 pacientes, 58,5% (24/41) não referiram histórico familiar de câncer enquanto que 17,1% (7/41) das pacientes possuíam histórico familiar compatível apenas com a síndrome de Li-Fraumeni *like*. Observou-se em 7,3% (3/41) das pacientes a sobreposição de duas síndromes, a LFL e a CMOH. Dentre as 41 pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutações germinativas no gene *BRCA1* e *BRCA2*, 17,1% (7/41) receberam a hipótese diagnóstica de Síndrome de Câncer de Mama e Ovário hereditário pelos critérios da *American Society of Clinical Oncology*

ASCO e NCCN (PALMERO et al. 2009) e Síndrome de Mama Cólon hereditário (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2003) (Tabela 4) (Anexo 3).

Tabela 4 - Critérios Clínicos das pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*.

Critérios	Pacientes (n)	Frequência (%)
Esporádicos	24	58,5
LFL	7	17,1
LFL/CMOH	3	7,3
Outros	7	17,1
Total:	41	100

Legenda: LFL-E1: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Eeles1, LFL-CM: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Chompret Modificado (Vide Quadro 1).

5.3 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM TUMOR ADRENOCORTICAL

Foram incluídos neste estudo 11 pacientes com tumores adrenocorticais. Dos indivíduos afetados 72,7% (8/11) correspondiam ao sexo feminino e 27,3% (3/11) ao sexo masculino, formando uma razão de um menino para 2,6 meninas. A idade do surgimento do tumor adrenocortical variou de sete meses a 52 anos de idade. A idade média da ocorrência do tumor foi aos 17,6 anos. Mais que a metade dos pacientes (54,5%) foi acometida pelo tumor adrenocortical antes dos 15 anos de idade (Tabela 5).

Dos 11 pacientes incluídos 63,6% (7/11) foram diagnosticados com carcinoma adrenocortical, os demais pacientes (36,3%), tiveram como laudo anatomopatológico um tumor adrenocortical.

Tabela 5 - Faixa etária de acometimento do grupo de pacientes com tumores adrenocorticais.

Faixa Etária	(n) (%)
0-15 anos	6 (54,5%)
16-30 anos	2 (18,2%)
31-45 anos	2 (18,2%)
46-60 anos	1 (9,1%)
Acima de 60 anos	0
Total de Pacientes	11

Todos os pacientes do grupo ADR preenchem critérios para a síndrome de Li-Fraumeni variante Chompret modificado e versão 2009 para os critérios de Chompret, que incluem tumor adrenocortical em qualquer idade independente da história familiar. Em um total de 11 pacientes, 45,5% (5/11), referiram ter um histórico familiar de câncer característicos da síndrome.

O paciente MT-7/ADR, que desenvolveu um tumor adrenocortical aos 44 anos, referiu história familiar de câncer, sendo que o pai desenvolveu leucemia aos 74 anos, a tia paterna com câncer de mama aos 80 anos, um tio paterno com mieloma múltiplo aos 67 anos, duas primas paternas, uma com tumor de sistema nervoso central aos 33 anos e outra com câncer de pulmão aos 45 anos, não tabagista. Como histórico familiar materno, um tio com câncer hepático aos 50 anos.

O paciente MT-14/ADR desenvolveu o tumor adrenocortical aos 7 meses e tinha história familiar de câncer sendo uma tia e a avó paterna com câncer de mama aos 40 e 60 anos respectivamente.

O paciente MT-34/ADR teve o tumor adrenocortical com um ano de idade, o pai e o tio paterno desenvolveram câncer de próstata aos 63 e 56 anos respectivamente.

O paciente MT-41/ADR desenvolveu aos 53 anos um tumor adrenocortical. Referiu o histórico familiar de câncer com o acometimento de câncer de útero aos 50 anos em uma tia materna, câncer na faringe em um tio materno tabagista aos 50 anos. Em sua família paterna, uma tia desenvolveu câncer de fígado aos 82 anos e sua avó paterna um câncer gástrico aos 63 anos de idade.

O paciente LFS-256/ADR desenvolveu um tumor adrenocortical aos 42 anos de idade, e seu irmão desenvolveu um câncer de pulmão aos 62 anos. Uma sobrinha neta, neta do irmão com câncer de pulmão, desenvolveu um tumor de Wilms aos três anos de idade. A mãe do paciente teve um câncer de mama aos 50 anos.

5.4 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES COM CARCINOMA DO PLEXO CORÓIDE

Na busca ativa a pacientes portadores de tumores do plexo coróide, foram encontrados três casos de pacientes nos registros do SAME, no

entanto foi verificado que todos os indivíduos com este diagnóstico tinham ido a óbito.

Na ausência de sangue periférico, foram incluídos neste estudo os três tumores provenientes destes pacientes com carcinoma do plexo coróide. Dois eram do sexo feminino (66,6%), e um do sexo masculino (33,3%). A idade de acometimento foi aos três, quatro e 53 anos de idade.

5.5 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS, PERFIL FAMILIAL E TUMORAL DOS PACIENTES

5.5.1 Múltiplos Tumores

Mutações germinativas no gene *TP53* foram encontradas em 13% (7/54) dos 54 pacientes avaliados. Das sete alterações encontradas seis eram substituições do tipo *missense* (85,7%) e uma substituição silenciosa (sinônima) em região exônica, localizada próxima ao sítio de *splicing*, que segundo o banco de dados do gene *TP53* (*TP53* Database R15) possui efeito de *splicing*. A alteração mais frequente, foi a transição de guanina (G) por adenina (A), verificada em 71,4% (5/7) dos pacientes. A transição de guanina (G) por citosina (C) e citosina (C) por timina (T) corresponderam a 14,3% das mutações (Tabela 6).

Dentre os quatro tipos de alteração, a substituição de um G por um A no códon 337 do gene *TP53*, resultando na troca do aminoácido arginina por uma histidina (p.R337H) no domínio de oligomerização da proteína p53, foi a mais frequentemente encontrada presente 57,1% (4/7) dos pacientes

mutados. Ainda no códon 337 foi detectada a troca de uma arginina por uma cisteína, p.R337C, em uma paciente.

Outro paciente avaliado apresentou a mutação p.M271I, na qual ocorre a troca de um nucleotídeo G por C, esta troca resulta na substituição do aminoácido metionina por isoleucina no códon 237, no domínio de ligação da proteína p53.

A única mutação que correspondia a uma substituição silenciosa, foi a mutação p.T125T, no qual a troca de um G por um A no último nucleotídeo do último códon do éxon 4, não resulta na substituição do aminoácido treonina, no entanto pela sua localização esta alteração tem um efeito de *splicing* (TP53 Database R15).

As mutação p.T125T, p.M237I, p.R337H, e p.R337C encontradas em pacientes com múltiplos tumores primários já foram descritas como mutações patogênicas em famílias com a LFS/LFL no banco de dados no IARC (TP53 Database R15) (PETITJEAN et al. 2007).

Tabela 6 - Perfil de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes do grupo MP.

Paciente	Alteração		Localização	Efeito	Domínio	Classificação
	Nucleotídica	Protéica				IARC (<i>TP53</i> Database R15)
MT-20/MP	c.375G>A (ACG>ACA)	p.T125T	éxon 4	Substituição/Silenciosa Efeito de splicing	ligação	Patogênica
MT-24/MP	c.1010G>A (CGC>CAC)	p.R337H	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica
MT-35/MP	c.711G>C (ATG>ATC)	p.M237I	éxon 7	Substituição/Missense	ligação	Patogênica
MT-43/MP	c.1010G>A (CGC>CAC)	p.R337H	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica
MT-57/MP	c.1010C>T (CGC>TGC)	p.R337C	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica
MT-60/MP	c.1010G>A (CGC>CAC)	p.R337H	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica
Y0131/MP	c.1010G>A (CGC>CAC)	p.R337H	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica

5.5.2 Câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*

Foram incluídas 41 pacientes com câncer de mama em idade jovem que não tinham mutação deletéria detectada nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. As pacientes foram classificadas em dois grupos: pacientes portadoras de câncer de mama em idade jovem (entre os 31 e 35 anos) (CMJ=26) e pacientes portadoras de câncer de mama em idade muito jovem (abaixo dos 31 anos) (CMMJ=15). Das 41 pacientes incluídas, apenas uma (2,4%) paciente que desenvolveu um carcinoma ductal invasivo aos 24 anos, que estava alocada no grupo CMMJ, foi diagnosticada com uma alteração germinativa no gene *TP53* (p.V143M).

Se considerados os dois grupos, CMJ e CMMJ, a frequência de mutações encontradas no grupo CMMJ foi de 6,7% (1/15) e nenhuma

Tabela 7 - Perfil da alteração germinativa no gene *TP53* em paciente do grupo CM.

Alteração			Localização	Efeito	Domínio	Classificação	Referência
Paciente	Nucleotídica	Protéica				Programa Sift/Poliphen	IARC (R15)
	c.427G>A (<u>G</u> TG> <u>A</u> TG)	p.V143M	éxon 5	Substituição/ missense	Ligação	Deletéria / provavelmente patogênica	Não descrita
MJ02039T							

5.5.3 Tumor Adrenocortical

Mutações germinativas no gene *TP53* foram encontradas em 54,5% (6/11) dos pacientes portadores de tumor adrenocortical.

A mutação p.R337H que é caracterizada pela troca do nucleotídeo guanina por uma adenina no segundo par de bases do códon 337 do éxon 10, foi a única mutação detectada em todos os pacientes do grupo ADR (Tabela 8).

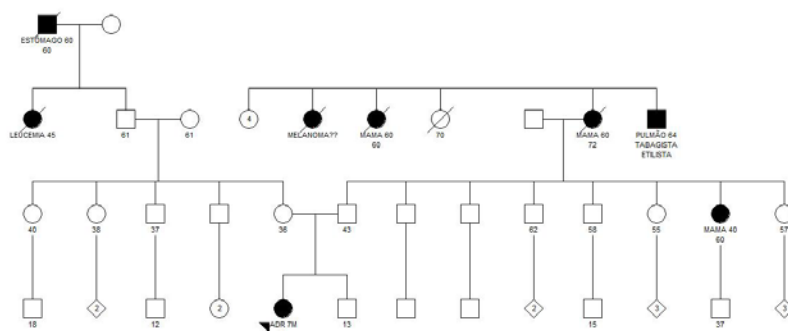
Tabela 8 - Perfil da mutação germinativa no gene *TP53* em pacientes do grupo ADR.

Alteração		Localização	Efeito	Domínio	Classificação
					IARC (TP53 Database R15)
Nucleotídica	Protéica				
c.1010G>A (CGC>CAC)	p.R337H	éxon 10	Substituição/Missense	oligomerização	Patogênica

Todos os pacientes portadores de mutação germinativa em *TP53* deste estudo eram do sexo feminino. O diagnóstico do tumor ocorreu na infância em 83,3% (5/6) dos casos, entre sete meses a sete anos. Apenas uma paciente desenvolveu carcinoma adrenocortical em idade adulta, aos 42 anos.

O paciente MT-14/ADR foi acometida por um carcinoma adrenocortical aos 7 meses de idade. Tem histórico familiar de câncer com uma tia paterna acometida com câncer de mama na pré-menopausa, aos 40 anos, e uma avó paterna com câncer de mama aos 60 anos (Figura 5).

MT-14-ADR



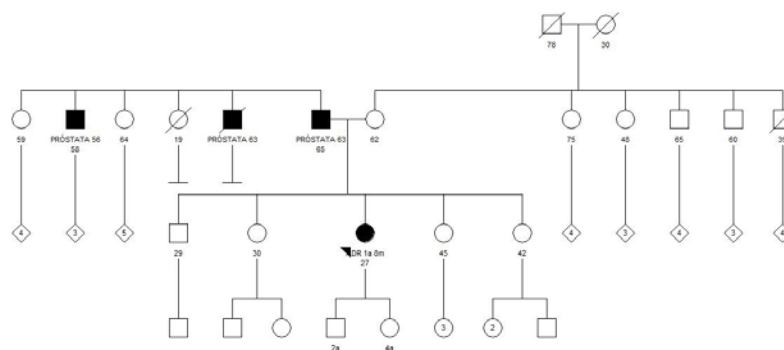
Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem à idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 5 Heredograma da paciente MT-14/ADR, portadora da mutação p.R337H.

A paciente MT-19/ADR teve como diagnóstico no anatomopatológico um tumor do córtex da suprarrenal com 1 ano de idade. Não foi referido histórico familiar de câncer.

A paciente MT-34/ADR, com diagnóstico de tumor sólido na suprarrenal com 1 ano e 8 meses de idade. O histórico familiar de câncer incluía o pai e mais dois tios paternos que desenvolveram câncer de próstata aos 63, 56 e 63 anos respectivamente (Figura 6).

MT-34/ADR



Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 6 - Heredograma da paciente MT-34/ADR, portadora da mutação p.R337H.

Os pacientes MT-63/ADR e MT-65/ADR são naturais do estado do Paraná, onde há alta incidência do tumor ADR e da mutação detectada, p.R337H. Desenvolveram carcinoma adrenocortical aos sete anos e aos sete meses respectivamente e sem histórico familiar referido.

Aos 42 anos de idade a paciente LFS256/ADR teve o diagnóstico de carcinoma adrenocortical. Com um irmão que desenvolveu um câncer de pulmão aos 62 anos, uma sobrinha neta com tumor de Wilms aos 3 anos e a mãe com câncer de mama aos 50 anos de idade (Figura 7).

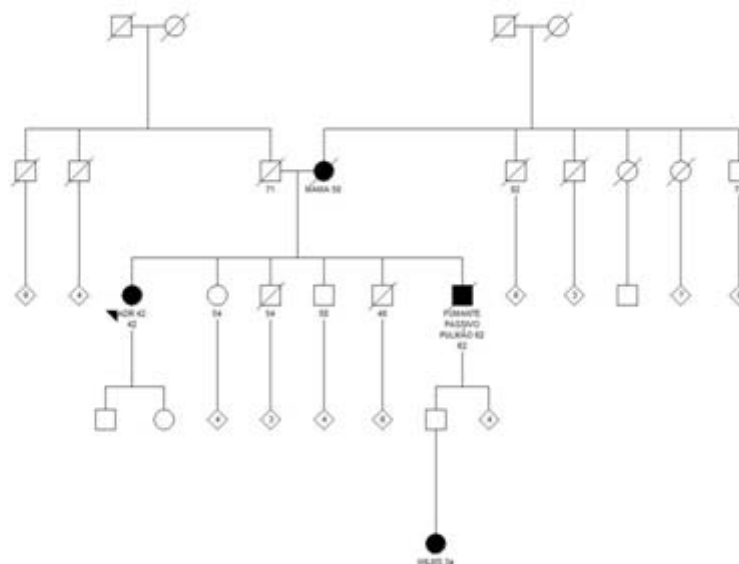


Figura 7 - Heredograma da paciente LFS256/ADR, portadora da mutação p.R337H.

Foi realizada a extração de DNA a partir da margem não tumoral de blocos de tumores de carcinoma do plexo coróide. No entanto, não foi possível a extração de DNA em grande quantidade para a realização do sequenciamento de toda região codificante do gene *TP53* nestas amostras. Desta forma, optamos em avaliar apenas o éxon 10, devido a alta incidência do mutante p.R337H. Para estes três tumores esta alteração não foi encontrada.

5.6 ESPECTRO TUMORAL E FAMILIAL EM PACIENTES COM MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS E MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *TP53*

O espectro tumoral de pacientes do grupo MP com mutações germinativas no gene *TP53* foi amplo, incluindo tumores já relatados em famílias LFS/LFL, mas que não compõem os tumores clássicos da síndrome.

O tumor que ocorreu em um maior número de pacientes foi o tumor de mama, acometendo todas as seis mulheres portadoras de mutações (6/6). Duas pacientes desenvolveram tumor Phyllodes maligno, aos 15 e 45 anos.

Duas pacientes apresentaram câncer de mama bilaterais, sendo que a paciente MT-57/MP desenvolveu os dois tumores na pré-menopausa, aos 32 e aos 40 anos, enquanto que a paciente MT-60/MP desenvolveu ambos tumores na pós menopausa, aos 60 e aos 63 anos.

Houve a ocorrência de sarcoma ósseo em dois pacientes sendo estes de tipos histológicos diferentes, dois osteossarcomas osteoblásticos em um paciente do sexo feminino aos nove e 13 anos e um condrossarcoma em um paciente também do sexo feminino aos 23 anos.

Dois pacientes apresentaram carcinoma papilífero da tireóide aos 43 e 46 anos, tumor não clássico da síndrome de LFS, mas já referidos em famílias brasileiras com a síndrome. Houve a ocorrência ainda de ADR, câncer de próstata, melanoma, leucemia, sarcoma de partes moles e linfoma não Hodgkin (Tabela 9).

A associação tumoral de sarcoma ósseo e câncer de mama ocorreu em duas pacientes portadoras de múltiplos tumores primários com mutação germinativa no gene *TP53*. Interessante notar que as duas pacientes que desenvolveram sarcomas ósseos, uma aos nove e 13 anos e outra aos 23 anos, desenvolveram o mesmo tipo de tumor de mama, o Phyllodes maligno aos 15 anos e 45 anos.

Outra associação ocorrida entre os pacientes portadores de mutações foi o câncer de mama e o câncer da tireóide, além de câncer de mama e melanoma.

A idade de acometimento dos diferentes tumores referidos pelos pacientes deste estudo foi predominantemente em idade jovem (antes dos 46 anos), com exceção do tumor ADR, próstata e linfoma não Hodgkin que acometeram pacientes após os 50 anos de idade. A idade média de aparecimento do primeiro tumor primário destes pacientes foi aos 34,3 anos.

Foram descritos 10 tumores nos quatro pacientes p.R337H, sendo que o tumor mais prevalente foi o câncer de mama (40%). O segundo prevalente foi o câncer papilífero da tireóide (20%). Os demais tumores, tumor adrenocortical, câncer de próstata, linfoma não Hodgkin e sarcoma ósseo, de pacientes com mutação p.R337H tiveram uma prevalência de 10%.

Interessante notarmos que quando avaliados pelo histórico familiar e não só pessoal, 85,7% (6/7) dos pacientes portadores de mutações no gene *TP53* preenchiam critérios para a síndrome de Li-Fraumeni-like de acordo com a ultima versão proposta para a síndrome, Chompret 2009 (Tabela 9).

Tabela 9 - Espectro tumoral dos pacientes portadores de múltiplos tumores primários com mutação detectada no gene *TP53*.

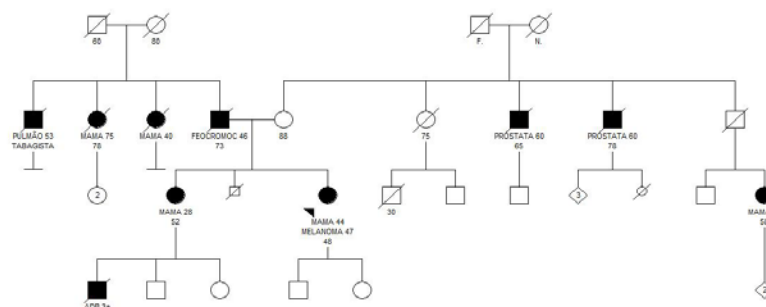
Paciente	Gênero	Éxon	Mutação	Tumores	Classificação clínica
MT-20/MP	F	éxon 4	p.T125T	Mama (44), Melanoma (47)	LFL-C2009
MT-24/MP	M	éxon 10	p.R337H	ADR (50), Próstata (50)	LFL-C2009
MT-35/MP	F	éxon 7	p.M237I	OS (9), OS (13), Mama (15), Leucemia (16)	LFL-C2009
MT-43/MP	F	éxon 10	p.R337H	OS (23), Tireóide (43), Mama (45)	LFL-C2009
MT-57/MP	F	éxon 10	p.R337C	SPM (21), Mama (32, 40)	LFL-C2009
MT-60/MP	F	éxon 10	p.R337H	Mama (60,63), Linfoma (60)	LFL-E1
Y0131/MP	F	éxon 10	p.R337H	Mama (44), Tireóide (46)	LFL-C2009

Legenda: ADR: tumor adrenocortical; OS: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; M: masculino; F: feminino; LFL-E1: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Eeles1, LFL-C2009: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Chompret versão 2009.

5.6.1 Pacientes MP e história familiar de câncer

O paciente MT-20/MP, portadora da mutação germinativa p.T125T, sexo feminino, desenvolveu um tumor de mama aos 44 anos e um melanoma aos 47 anos. Como histórico familiar, a paciente tem uma irmã que desenvolveu um câncer de mama aos 28 anos e uma sobrinha com tumor adrenocortical aos três anos de idade, além do pai que desenvolveu um feocromocitoma aos 46 anos, e outros familiares com câncer. Com o histórico referido, esta paciente preenche critérios para a LFL-C2009 (Figura 8).

MT - 20 MP

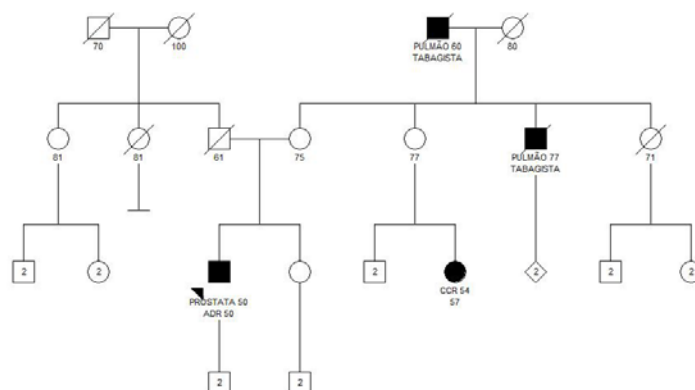


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem à idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 8 - Heredograma da paciente MT-20/MP, portadora da mutação p.T125T.

O paciente MT-24/MP, portador da mutação germinativa p.R337H, sexo masculino, desenvolveu sincronicamente uma neoplasia do córtex adrenal e um câncer de próstata aos 50 anos. Frente a ocorrência do tumor ADR, este paciente preenche critérios para a LFS/LFL segundo os critérios de Chompret versão 2009. Segundo histórico familiar referido, o paciente teve um tio materno tabagista com câncer de pulmão aos 77 anos, um avô materno também tabagista com câncer de pulmão aos 60 anos e uma prima de primeiro grau (para a genética corresponde a um familiar de terceiro grau) com câncer colorretal aos 54 anos de idade (Figura 9)

MT - 24 MP

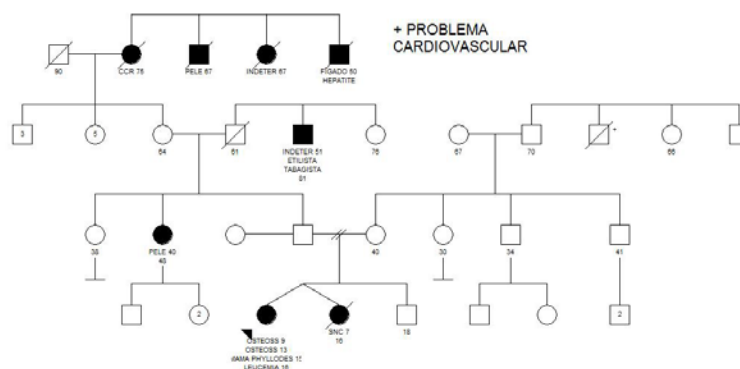


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 9 - Heredograma da paciente MT-24/MP, portadora da mutação p.R337H.

O paciente MT-35/MP, com a mutação p.M237I, do sexo feminino, desenvolveu dois osteossarcomas osteoblásticos, um aos nove anos em fêmur direito, outro aos 13 anos em tíbia esquerda, tumor de mama Phyllodes maligno aos 15 anos e leucemia aos 16 anos de idade. A paciente tinha uma irmã gêmea univitelina que desenvolveu tumor de sistema nervoso central aos sete anos de idade. A paciente e sua irmã preenchem critérios para LFL-C2009 (Figura 10). Os pais da paciente realizaram o teste molecular para a verificação da mutação e ambos não são portadores da alteração que caracteriza a síndrome de Li-Fraumeni na filha. Sugerindo ser uma mutação *de novo*.

MT - 35 MP

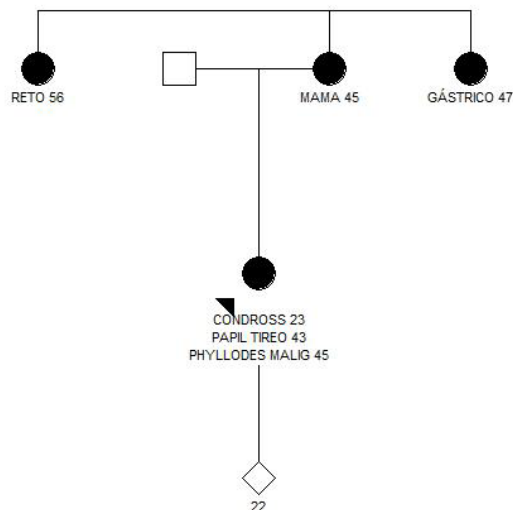


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 10 - Heredograma da paciente MT-35/MP, portadora da mutação p.M237I

O paciente MT-43/MP, no qual foi detectada a alteração patogênica p.R337H, apresentou um sarcoma ósseo, o condrossarcoma, aos 23 anos, carcinoma papilífero da tireóide aos 43 anos e tumor de mama Phyllodes maligno aos 45 anos. A presença de múltiplos tumores do espectro típico da LFS/LFL inclui a pacientes nos critérios LFL-C2009. Ao avaliarmos o histórico familiar de câncer verificamos a presença de câncer de mama em sua mãe aos 45 anos, uma tia materna com câncer gástrico aos 47 anos, e outra tia materna com câncer colorretal aos 56 anos de idade (Figura 11).

MT - 43 MP

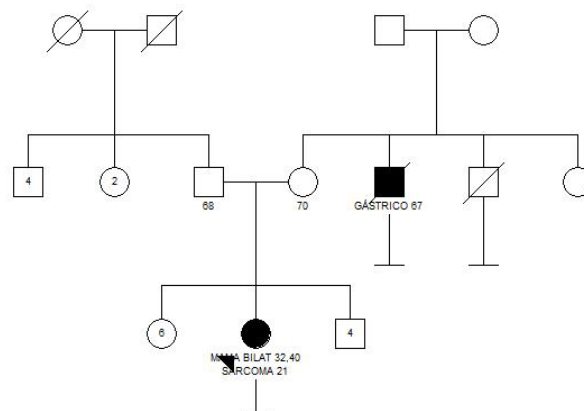


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 11 - Heredograma da paciente MT43/MP, portadora da mutação p.R337H.

A paciente MT-57/MP, portadora da mutação p.R337C, desenvolveu um sarcoma de partes moles (sarcoma de histogênese indeterminada em perna direita) aos 21 anos de idade, além de dois tumores de mama, um carcinoma ductal invasivo de mama esquerda aos 32 anos e outro carcinoma ductal “in situ” em mama direita aos 40 anos. A partir dos tumores ocorridos nesta paciente, esta preenche critérios clínicos de LFL segundo Chompret versão 2009 e como histórico familiar, um tio materno desenvolveu um câncer gástrico aos 67 anos (Figura 12).

MT - 57 MP

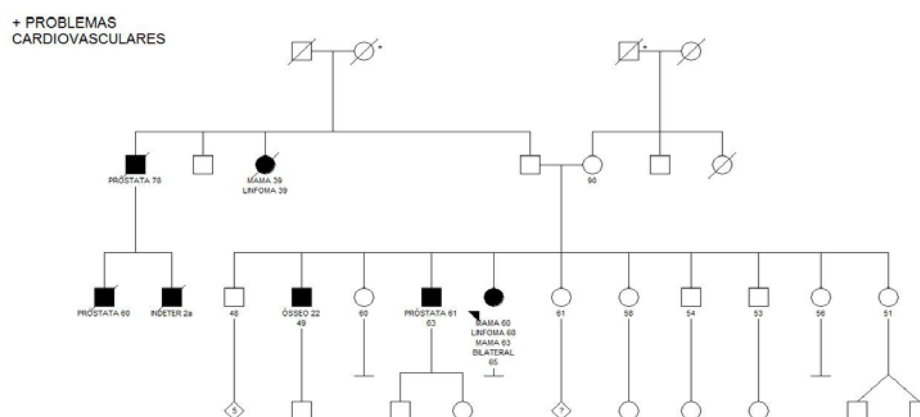


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 12 - Heredograma da paciente MT057/MP, portadora da mutação p.R337C.

A presença de câncer de mama bilateral também foi verificada na paciente MT-60/MP aos 60 e 63 anos, sendo um carcinoma ductal invasivo em mama esquerda aos 60 anos e um carcinoma ductal "in situ" em mama direita aos 63 anos. A paciente desenvolveu ainda sincronicamente com um dos tumores de mama um linfoma não Hodgkin aos 60 anos de idade. Pela avaliação do gene *TP53*, a paciente é portadora da mutação germinativa p.R337H. Esta referiu um irmão com sarcoma ósseo aos 22 anos, outro irmão com câncer prostático aos 61 anos, uma tia paterna que havia desenvolvido múltiplos tumores primários, linfoma e câncer de mama antes dos 40 anos de idade, além de outros relatos de câncer na família (Figura 13).

MT - 60 MP

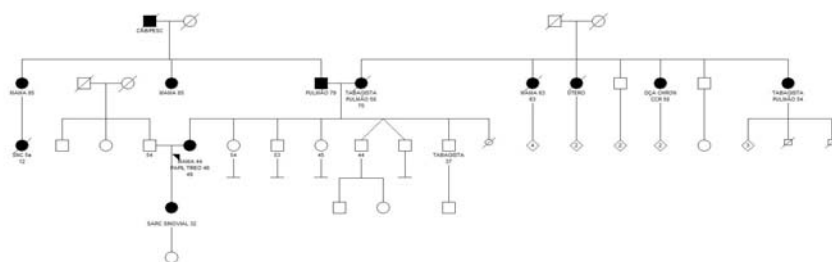


Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 13 - Heredograma da paciente MT060/MP, portadora da mutação p.R337H.

A paciente Y0131/MP portadora da mutação p.R337H, desenvolveu câncer de mama aos 44 anos e câncer papilífero da tireóide aos 46 anos. A paciente possui histórico familiar de câncer, uma filha que desenvolveu um sarcoma sinovial em coxa aos 32 anos, esta também é portadora da mutação p.R337H que caracteriza a síndrome na família (Figura 14).

Y0131



Legenda: Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo.

Figura 14 - Heredograma da paciente Y0131/MP, portadora da mutação p.R337H.

5.7 ESPECTRO TUMORAL E FAMILIAL EM PACIENTES COM MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS SEM A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *TP53*

Em 20 pacientes que preencheram pelo menos um critério para a LFL (LFL-E1, LFL-B, LFL-C2009) quando analisado o histórico familiar, não foi detectada a mutação no gene *TP53*. O perfil tumoral destes indivíduos era, em sua maioria, de tumores relacionado à síndrome, como mama e sarcoma de partes moles, e as idades de acometimento dos tumores eram precoces, antes dos 46 anos (Quadro 6).

A idade média de surgimento do primeiro tumor em pacientes que não eram portadores de mutação foi aos 39,4 anos.

Frente ao grande espectro tumoral encontrada em pacientes portadores de múltiplos tumores primários, alguns destes podem ser classificados como portadores de outras síndromes de predisposição

hereditária ao câncer. No paciente MT-4/MP, na qual a mutação no gene *TP53* não foi detectada, foram relatados dois tumores colorretais, sendo os dois em idade jovem, mais duas irmãs e mãe afetadas com câncer colorretal entre outros relatos de câncer em familiares de primeiro grau. Pela construção do heredograma e análise do histórico familiar este paciente preencheu critérios para a síndrome do Câncer Colorretal Hereditário não Poliposo segundo os critérios de Amsterdã (VASEN 2005). Este paciente havia participado de outro estudo no qual foi avaliado mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2*, que predisõem indivíduos à síndrome de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose, no entanto nenhuma alteração foi encontrada (VALENTIN et al. 2011)

A paciente MT-16/MP desenvolveu um adenocarcinoma de retosigmoide aos 37 anos, câncer de mama aos 39 anos e câncer de endométrio aos 45 anos, esta paciente possui uma irmã com câncer colorretal, o que sugere o diagnóstico da Síndrome de Câncer de Mama e Cólon Hereditário segundo NASEEM et al. (2006).

Quadro 6 - Espectro tumoral de 47 pacientes portadores de múltiplos tumores primários sem detecção de mutação no gene *TP53*.

Pacientes	Gênero	Tumores	Hipótese diagnóstica
MT - 1/MP	M	SPM (43), GIST (48)	LFL-B
MT - 2/MP	F	SPM (15), SPM (29), Mama (45)	LFL-C2009
MT - 4/MP	M	CCR (39), CCR (40), CEC (41)	HNPCC
MT - 5/MP	F	Mama (36), Mama (42), Melanoma (48), CCR (58)	LFL-E1
MT - 6/MP	M	CCR (69), ADR (71)	LFL-C2009
MT - 9/MP	F	ADR (58), SPM (64)	LFL-C2009
MT - 10/MP	F	Mama (58), Linfoma NH (63), CEC (65)	LFL-E1
MT - 11/MP	F	Tireóide (51), CEC (52), Mama (53)	LFL-E1
MT - 12/MP	F	ADR (26), Indeterminado (31)	LFL-C2009
MT - 13/MP	F	Melanoma (40), Mama (43), Bexiga (47)	CMOH
MT - 15/MP	F	Melanoma (42), Mama (43)	LFL-E1
MT - 16/MP	F	CCR (37), Mama (39) Endométrio (45)	CMCH
MT - 17/MP	F	Tiróide (42), CEC (41), Mama (43).	Esporádico
MT - 18/MP	F	Colo de útero (33), Tireóide (60), Mama (61)	LFL-E1
MT - 21/MP	F	Linfoma H (21), CEC (27)	Esporádico
MT - 22/MP	F	SPM (13), Mama (36)	LFL-C2009
MT - 23/MP	F	Mama (33), Melanoma (48), Mama (56)	LFL-E1
MT - 25/MP	F	Endométrio (77), CEC (73), Tireóide (74).	Esporádico
MT - 26/MP	F	Linfoma H (12), Ovário (15), SPM (18)	Esporádico
MT - 27/MP	M	RB (1), RB (3) SO (23), SPM (31)	RB
MT - 28/MP	M	Mama (65), CCR (62), Ovário (62)	CMOH
MT - 30/MP	F	Mama (49), Endométrio (50), Pâncreas (51), linfoma MALT (58)	Esporádico
MT - 31/MP	M	Melanoma (22), CEC (38), Gástrico (50)	XP
MT - 32/MP	F	CCR (40), Mama (43), GIST (44)	LFL-E1
MT - 33/MP	M	SPM (42), CCR (45)	Esporádico
MT - 39/MP	F	Mama (69), CCR (71), Tireóide (77)	Esporádico
MT - 42/MP	F	Mama (42), Melanoma (50), CCR (55)	LFL-E1
MT - 45/MP	F	Linfoma H (21), Mama (52), Mama (52)	Esporádico
MT - 48/MP	F	SPM (7), Tireóide (31)	Esporádico
MT - 49/MP	M	Melanoma (27), SNC (27)	Esporádico
MT - 50/MP	F	Linfoma H (22), Tireóide (39), Mama (40)	LFL-E1
MT - 52/MP	F	Ovário (47), Linfoma NH (57), Melanoma (63)	MF
MT - 54/MP	F	Tireóide (41), Pulmão (43)	Esporádico
MT - 55/MP	F	Leucemia (58), Mama (68), Mama (71)	Esporádico
MT - 56/MP	F	Mama (59), Vulva (63), Endométrio (64)	Esporádico
MT - 58/MP	M	Tireóide (35), SPM (40)	LFL-B
MT - 59/MP	F	Mama (48), Tireóide (52), Mama (60)	Esporádico
MT - 61/MP	F	SPM (33) Linfoma (33)	LFL-E1
MT - 62/MP	F	Mama (44), Melanoma (48), Melanoma (50)	Adoção
MT -66/MP	F	Tireóide (47), Mama (53), Mama (58)	LFL-E1
MT-67/MP	F	Mama (55), Mama (55), CCR (56) Tireóide (60)	CMCH
MT-70/MP	F	Endométrio (52), CCR (54), Mama (57)	CMCH
LFS 217/MP	F	Tireóide (29), SPM (35)	Esporádico
LFS 231/MP	F	Melanoma (41), Melanoma (43), CEC (44)	LFL-E1
LFS 293/MP	M	Tireóide (18), CEC (27)	Esporádico
LFS 322/MP	M	Melanoma (67), SPM (67), GIST (73)	Esporádico
SM 49/MP	F	Melanoma (29), Mama (38)	LFL-C2009

Legenda: ADR: tumor adrenocortical; CEC: carcinoma espinocelular GIST: tumor estromal gastrointestinal, CCR: câncer colorretal; Linfoma H: Linfoma de Hodgkin; Linfoma NH: Linfoma não Hodgkin; RB: retinoblastoma; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; M: masculino; F: feminino; CMCH: Câncer de Mama e Cólon Hereditário; CMOH: Câncer de Mama e Ovário Hereditário; LFL-B: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Birch; LFL-E1: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Eeles1, LFL-C2009: Síndrome de Li-Fraumeni *like*, critérios de Chompret versão 2009; HNPCC: Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose; MF: Melanoma Familiar; XP: Xeroderma Pigmentoso

Três pacientes portadores de tumor adrenocortical (MT-6/MP, MT-9/MP, MT-12/MP) com mais um tumor primário independente do sítio, preenchiem critérios de LFL-C2009, no entanto não foram diagnosticados com mutação no gene *TP53*.

O paciente MT-2/MP foi diagnosticado com fibrossarcoma aos 15 anos, angiofibrossarcoma aos 29 anos e câncer de mama aos 45 anos. Esses tumores são clássicos tumores do espectro LFS, no entanto nenhuma alteração foi encontrada. Mediante o perfil tumoral encontrado mesmo sem confirmação molecular, esta paciente recebeu a hipótese diagnóstica de LFL de acordo com os critérios de Chompret versão 2009.

5.8 ACONSELHAMENTO GENÉTICO PÓS-TESTE E ESTRATÉGIAS DE RASTREAMENTO

Todos os pacientes convocados para este projeto foram submetidos ao aconselhamento genético pré-teste, e após esclarecimento sobre a LFS/LFL, risco e benefícios da realização do teste genético, assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Os resultados dos testes genéticos foram comunicados aos pacientes a partir de laudos redigidos de forma a incluir os resultados provenientes da análise das mutações, além de informações referentes ao teste genético. Informações a respeito das alterações encontradas na literatura científica relacionado as mutações detectadas também foram incluídas nos laudos. Os pacientes que não tiveram nenhuma alteração encontrada receberam um

laudo que esclareceu que de acordo com a técnica empregada, o sequenciamento direto das regiões codificantes, nenhuma alteração foi encontrada, no entanto não é possível definir este paciente como negativo para alteração no gene *TP53*, pois existem rearranjos e deleções genômicas que são impossibilitados de serem identificadas pelo sequenciamento direto. Para isso seria necessário o emprego de outros métodos, tais como PCR quantitativo, PCR de longo alcance, CGH array (*Comparative Genomic Hybridization*), além do MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que é empregado para identificação de deleções e duplicações.

O resultado de teste genético negativo só pode ser divulgado quando há uma alteração que caracteriza a síndrome na família, e o paciente testado não é portador desta alteração.

Aos pacientes maiores de 18 anos o resultado foi divulgado de forma confidencial individualizada e sem presença de acompanhante. Para os pacientes menores de 18 anos, o resultado do teste genético foi divulgado ao responsável legal que assinou o TCLE no momento do convite para participação do estudo.

No momento da entrega de resultado os pacientes receberam aconselhamento genético pós teste com médico geneticista e foram informados quanto aos conceitos de risco, penetrância, herança autossômica dominante, formas de rastreamento, visando uma melhor compreensão do significado do resultado do teste molecular e das implicações no seguimento clínico do indivíduo.

Os pacientes serão acompanhados clinicamente pelo protocolo proposto pelo NCCN (Tabela 1) e pelo protocolo adaptado do NCCN para a população brasileira (Tabela 2).

6 DISCUSSÃO

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) e sua variante Li-Fraumeni *like* (LFL) foram descritas até o presente como uma síndrome rara no mundo. Desde a primeira descrição de Li e Fraumeni, foram feitos vários relatos isolados de pacientes e famílias portadoras da síndrome. Em 2005, no banco de dados do IARC (*TP53 Database R10*) haviam sido descritas 280 famílias portadoras de mutações germinativas no gene *TP53*. Após seis anos esse número aumentou para 597 (*TP53 Database R15*). Este aumento ocorreu principalmente devido a inclusão de famílias brasileiras portadoras da mutação germinativa p.R337H. A ocorrência de um efeito fundador nas famílias com diagnóstico da mutação p.R337H no gene *TP53* foi descrita recentemente pelo nosso grupo (GARRITANO et al. 2010), após a realização da genotipagem de 29 *TAG SNPs* intragênicos em doze indivíduos provenientes de oito famílias aparentemente não relacionadas e portadoras da mutação p.R337H. O estudo demonstrou que todas as famílias foram detectadas com o mesmo haplótipo. A probabilidade de estes indivíduos terem, ao acaso, o mesmo genótipo foi estimada em $3,8 \times 10^{-6}$, estabelecendo a existência de efeito fundador para a mutação p.R337H no sul e sudeste brasileiro.

Assim, esta síndrome mostra-se cada vez mais frequente no Brasil, podendo existir um número muito maior de portadores, que não possuem conhecimento do alto risco para desenvolver tumores, mesmo pertencendo a

famílias com indivíduos aparentemente saudáveis. Indivíduos nesta situação podem se beneficiar com o diagnóstico da síndrome uma vez que o rastreamento implantado inicialmente tem implicação direta no prognóstico de pacientes LFS/LFL.

6.1 ASPECTOS INOVADORES DESTE ESTUDO

No presente estudo foi possível verificar qual grupo de indivíduos com múltiplos tumores e quais tumores estes desenvolveram que caracterizam possíveis portadores de mutações germinativas no gene *TP53* e consequentemente portadores de LFS/LFL.

O critério atualizado proposto para a LFS/LFL (TINAT et al. 2009) recomenda que paciente-índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro LFS e o primeiro antes dos 46 anos deve ser testado para mutações germinativas no gene *TP53*. Somando-se a este fato, a alta incidência de mutações detectadas nestes pacientes no presente estudo denota a importância em se testar mutações germinativas no *TP53* em indivíduos com pelo menos um tumor do espectro da síndrome de Li-Fraumeni. Também no grupo MP todos os indivíduos do sexo feminino com mutação detectada tinham desenvolvido pelo menos um câncer de mama, independente da idade. Com isso, a partir deste estudo pode-se sugerir que pacientes com múltiplos tumores primários sendo um deles o câncer de mama devem ser testados para mutações germinativas no gene *TP53*.

Pacientes com tumores ADR tiveram uma alta taxa de detecção de mutações. Esse dado já era esperado como verificado por RIBEIRO et al.

(2001) e FIGUEIREDO et al. (2006) assim, este estudo confirma a importância de sequenciamento para o gene *TP53* em indivíduos, principalmente em crianças, que desenvolverem o tumor.

Pacientes com câncer de mama em idade jovem sem mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* são possíveis portadores de mutações germinativas no gene *TP53* independente do histórico familiar. Estes casos devem ser considerados como suspeitos para serem portadores de mutações germinativas no *TP53*, no entanto é importante ressaltar que mais estudos são necessários para determinar a real frequência de mutações neste grupo.

6.2 MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS

Um aspecto inédito deste estudo é a realização de teste genético para detecção de mutações germinativas no gene *TP53* em um grupo de pacientes que desenvolveram múltiplos tumores primários independente da idade ou do histórico familiar destes pacientes. O grupo analisado foi o maior descrito em literatura até o momento. Outro trabalho que incluiu indivíduos portadores de múltiplos tumores primários foi realizado por MALKIN et al. (1992), no entanto foram incluídos apenas crianças e adultos jovens, no total 59 pacientes foram avaliados para a presença de mutações germinativas do éxon cinco ao nove do gene *TP53*, sendo 6,8% (4/59) portadores de mutações. Outros relatos deste tipo de análise foram feitos em indivíduos com múltiplos tumores provenientes de famílias previamente testadas (LI et al. 1988, HISADA et al. 1998, Chompret et al. 2000 e GONZALEZ et al.

2009b), ou individualmente, como relato de caso (SPEISER et al. 1996; NADAV et al. 1998; YAMADA et al. 2009).

Segundo a definição do IARC (1994), o tumor primário é aquele que se origina em um sítio ou tecido primário e não é extensão, recidiva nem metástase de outro tumor. De acordo com o Programa de Vigilância, Epidemiologia e Resultados Finais (*Surveillance, Epidemiology and End Results-SEER*), para a caracterização de múltiplos tumores primários, o profissional não deve usar características topográficas para decidir se o paciente desenvolveu uma recorrência de um câncer anterior ou um novo primário. A análise do material por um patologista é de fundamental importância para que este compare os tumores e confirme diferenças ou semelhanças histológicas para julgar que se trata de um novo tumor primário ou de uma recorrência (SEER 2010). Dentre os 148 tumores referidos por 54 pacientes com múltiplos tumores primários, 79,1% tiveram confirmação de laudos anatomopatológicos ou relatórios médicos evitando a inclusão de tumores metastáticos ou recidivas.

6.2.1 Detecção de mutações em indivíduos com múltiplos tumores primários

Mutações germinativas no gene *TP53* foram verificadas em 13% (7/54) dos pacientes portadores de múltiplos tumores primários deste estudo. Estes dados são compatíveis com os achados encontrados em outros estudos. Diversos trabalhos foram realizados com indivíduos selecionados devido ao desenvolvimento de múltiplos tumores primários que

demonstraram a ocorrência de mutações germinativas no gene *TP53* em 7% a 20% destes pacientes (MALKIN et al. 1992; SHISEKI et al. 1993; RUSSO et al. 1994). No estudo de MALKIN et al. (1992), que realizou sequenciamento da região considerada “hotspot”, incluindo os éxons cinco ao nove do gene *TP53*, entre 59 indivíduos que desenvolveram dois tumores primários, apenas 6,8% (4/59) foram detectados como portadores de mutação em *TP53*. Se a análise de mutações germinativas no gene *TP53* deste estudo fosse realizada apenas nos éxons cinco ao nove a taxa de detecção de mutações seria 3,7% demonstrando a importância da análise de toda região codificante do gene *TP53*.

Em trabalho realizado por CHOMPRET et al. (2001) foram incluídas crianças que haviam desenvolvido pelo menos dois tumores primários com ou sem histórico familiar de câncer referido. Apenas 6,2% (1/16) das crianças sem histórico familiar eram portadores de mutação no gene *TP53* enquanto 42% (5/12) das crianças com histórico familiar de câncer eram portadoras de mutação. No presente estudo 25% (7/28) dos pacientes que apresentaram histórico familiar condizente com LFS/LFL eram portadores de mutação. Nenhuma alteração foi encontrada no grupo MP sem histórico familiar.

Dentre os 54 pacientes com múltiplos tumores primários deste estudo que realizaram o teste genético, 12 preenchiam os critérios de Chompret versão 2009, sendo seis destes diagnosticados como portadores de mutação no gene *TP53*. Desta forma, foi obtida uma taxa de detecção de 50% e uma sensibilidade de 85,7% para os critérios de LFL-C2009. Dados

semelhantes foram observados em 180 famílias holandesas com critérios clínicos de LFS/LFL. Quando utilizados apenas os critérios de Chompret versão 2009 a taxa de detecção correspondeu a 21% (22/105) com uma sensibilidade de 92% (22/24) (RUIJS et al. 2010). Valores semelhantes também foram observados em outro trabalho com pacientes que preenchem critérios clínicos de Chompret versão 2009, onde a taxa de detecção foi de 35% (GONZALEZ et al. 2009b).

No presente estudo pacientes que desenvolveram múltiplos tumores primários foram incluídos independente da idade de acometimento e do sítio tumoral. No entanto dentre os sete pacientes com múltiplos tumores primários que foram detectados como portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, 42,9% (3/7) desenvolveram dois tumores do espectro da síndrome, sendo o primeiro antes dos 46 anos, sendo assim estes pacientes preenchem os critérios propostos atualizados para a síndrome, os critérios de Chompret versão 2009 (TINAT et al. 2009).

Dos quatro indivíduos restantes, portadores de mutações germinativas no gene *TP53*, todos desenvolveram pelo menos um tumor do espectro clássico da síndrome, sendo que dois indivíduos tiveram os tumores antes dos 46 anos e os outros dois foram acometidos pelos tumores após a idade proposta pelos critérios, após os 46 anos de idade. O acometimento do primeiro tumor aos 50 e em outro paciente aos 60 anos de idade os exclui dos critérios de Chompret versão 2009 para indivíduos com múltiplos tumores. De acordo com este critério o indivíduo deve ser portador de múltiplos tumores (exceto múltiplos tumores de mama) sendo pelo menos

dois do espectro LFS e o primeiro antes dos 46 anos. No entanto estes pacientes não apresentaram o primeiro tumor antes dos 46 anos e também não tinham dois tumores do espectro da síndrome, mesmo assim foram diagnosticados como portadores de mutações no gene *TP53*. Embora o número amostral seja baixo, os dados deste estudo sugerem que pacientes com múltiplos tumores primários, sendo pelo menos um do espectro clássico da síndrome, independente da idade de acometimento, devam ser testados para mutações no gene *TP53*.

Dos 13% (7/54) dos pacientes com múltiplos tumores portadores de mutação germinativa no gene *TP53*, apenas um era do sexo masculino. A baixa frequência de homens portadores de mutação em *TP53* já havia sido descrita por CHOMPRET et al. (2004). Neste estudo, o pesquisador refere que a penetrância é incompleta nos homens portadores de mutação no gene *TP53*. A penetrância incompleta pode resultar no maior número de portadores assintomáticos que nunca desenvolverão tumores.

6.2.2 Espectro tumoral de indivíduos com múltiplos tumores primários

No grupo de pacientes com múltiplos tumores primários o câncer de mama correspondeu a 27,7% dos tumores referidos, com uma idade média de 49,1 anos, variando dos 15 aos 71 anos. Foi verificada a alta incidência de tumores de mama na pré-menopausa, sendo que 43,9% das mulheres foram acometidas pelo câncer de mama entre os 31 e 45 anos. Dentro da casuística estudada esses dados foram relevantes, no entanto por se tratar de pacientes provenientes de instituições de referência no acompanhamento

e tratamento de indivíduos com câncer a associação com a população geral não deve ser feita sendo que na população geral, apenas 10,2% das mulheres com câncer de mama são diagnosticadas entre 35 e 44 anos de idade (SEER 2011).

O câncer de mama foi o tumor mais frequente em pacientes com múltiplos tumores primários e acometeu todas as mulheres portadoras de mutação detectadas neste estudo. No grupo de 54 indivíduos que desenvolveram múltiplos tumores primários, 32 mulheres desenvolveram câncer de mama, destas 18,8% (6/32) foram detectadas com mutações no gene *TP53*. Isso pode sugerir que para os critérios de pacientes isolados com múltiplos tumores primários, preferencialmente um tumor deve ser o de mama.

A alta ocorrência de câncer de mama foi descrita em um dos primeiros relatos a respeito da síndrome. Em um estudo com 24 famílias que preenchiam critérios para LFS/LFL, foi observado que o câncer de mama ocorria predominantemente em mulheres, mães de crianças com sarcomas, em indivíduos portadores de múltiplos tumores primários e em mulheres jovens em ambas as mamas (LI et al. 1988).

Em 83,3% (5/6) das mulheres portadoras de mutação germinativa no gene *TP53* observaram-se tumores de mama em idade pré-menopausal (entre 15 e 45 anos). A alta proporção de tumores ocorridos nesta idade é atípica e deve levantar a suspeita de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer.

Três pacientes do grupo de indivíduos com múltiplos tumores primários apresentaram um tumor Phyllodes maligno, destas, duas eram portadoras da mutação no gene *TP53*. Além da alta taxa de detecção de mutações nos tumores Phyllodes malignos de mama, este tumor correspondeu a 25% dos tipos histológicos que acometeram pacientes portadoras de mutação no gene *TP53*. O tumor Phyllodes maligno não é um tumor epitelial como o carcinoma mamário, trata-se um tumor bifásico onde o estroma é maligno e o epitélio é benigno (BELLOCQ e MAGRO 2003). BIRCH et al. (2001) em estudo com 28 famílias portadoras de mutação em *TP53* observou que o tumor Phyllodes maligno compreendeu 1,4% dos cânceres na LFS/LFL.

O espectro tumoral típico da síndrome de Li-Fraumeni inclui o câncer de mama, sarcomas de partes moles, tumores cerebrais, sarcomas ósseos, leucemia e carcinoma adrenocortical (LI et al. 1988). De acordo com os dados publicados pelo IARC, os tumores de mama, sarcomas de partes moles, tumores do sistema nervoso central, adrenocortical e ósseo totalizam aproximadamente três quartos (74%) de todos os tumores associados a mutações germinativas no gene *TP53* (PETITJEAN et al. 2007).

Entre os 19 tumores que acometeram pacientes com múltiplos tumores primários com mutação germinativa no gene *TP53*, 73,7% (14/19) correspondiam aos tumores clássicos da síndrome. É interessante notar que tumores de sistema nervoso central não foram observados nestes pacientes. Valores muito semelhantes foram observados entre 738 tumores de famílias com LFS/LFL, sendo que 77% correspondiam a um dos seis tipos tumorais,

câncer de mama, ADR, SO, SPM, tumores cerebrais e leucemia (NICHOLS et al. 2001).

Neste estudo verificou-se também a ocorrência de tumores malignos como o melanoma, câncer de próstata, câncer da tireóide e linfoma em quatro diferentes portadores de mutação no gene *TP53*. Estes tumores já haviam sido descritos como parte do espectro LFS/LFL, mas não compõem os tumores clássicos da síndrome.

A ocorrência de um espectro tumoral mais amplo foi verificada, em vários relatos sobre portadores de mutação germinativa no gene *TP53*. Foram descritos em portadores o melanoma, tumores de células germinativas, tumor de Wilms, carcinoma gástrico e de pâncreas, câncer de pulmão e câncer colorretal (HARTLEY et al. 1987; HARTLEY et al. 1989; STRONG et al. 1987; VARLEY et al. 1995; VARLEY et al. 1997a; RUIJS et al. 2010).

Neste estudo, o melanoma e o câncer prostático acometeram pacientes em idade adulta, aos 47 e 50 anos respectivamente. O melanoma e o câncer prostático foram relatados por GONZALEZ et al. (2009b) em indivíduos portadores de mutação germinativa no gene *TP53* como tumores que não ocorrem em idade jovem.

O melanoma não faz parte dos tumores componentes da LFS, apesar de evidências que sugerem uma alta frequência em famílias clinicamente definidas como LFS/LFL (GARBER et al. 1991; BIRCH et al. 2001). Em estudo de OLIVIER et al. (2003) 43,5% dos pacientes com melanoma que preenchiam critérios para LFS/LFL eram portadores de mutação em *TP53*.

Pode-se observar em nosso estudo e em outros que rastreiam famílias ou pacientes isolados com critérios para a síndrome que o melanoma pode estar associado a mutações em *TP53* e que este tumor deve ser considerado em famílias com histórico para a síndrome.

No Brasil a neoplasia maligna primária mais frequente em homens é o câncer de próstata, seguido do câncer de traquéia, brônquio, pulmão, e estômago (Ministério da Saúde 2009). O câncer prostático não é um tumor típico da síndrome, no entanto segundo os critérios de LFL-E1 o câncer de próstata está incluído entre os tumores dos critérios (EELES 1995).

O câncer de próstata pode estar presente em algumas famílias com a síndrome de Li-Fraumeni (GARBER et al. 1990; FREBOURG et al. 1995). Em um estudo que totalizou 119 tumores provenientes de famílias, na qual o probando era portador de mutação germinativa em *TP53*, 3,4% (4/119) correspondiam a câncer de próstata (ACHATZ et al. 2007).

A ocorrência em idade avançada e relato de baixa associação do tumor com a síndrome (BIRCH et al. 2001) sugerem uma atenção maior em famílias acometidas pelo tumor prostático para evitar a inclusão de tumores fenocópias.

Câncer da tireóide acometeu duas pacientes do sexo feminino, portadoras de mutação germinativa no gene *TP53*. Este tumor já foi descrito em um estudo brasileiro com 45 famílias com critérios clínicos para LFS/LFL no qual foi verificada a ocorrência de dois casos de câncer da tireóide em pacientes portadores de mutação (ACHATZ et al. 2007)

O linfoma esteve presente em apenas uma paciente que desenvolveu um linfoma não Hodgkin. Este tumor já havia sido relatado por MALKIN et al. (1992) em um paciente que havia desenvolvido como segundo tumor primário um câncer colorretal. No entanto mutações no gene *TP53* não foram identificadas em 38 indivíduos com linfoma não Hodgkin provenientes de 252 casos familiares de LFS/LFL e 16 indivíduos com múltiplos tumores (CHOMPRET et al. 2000).

Os tumores do sistema hemotopoiéticos correspondem a 3,1% dos tumores associados a mutações no gene *TP53*, estando à frente de tumores de pele, pulmão, ovário, estômago, rim, testículos, laringe, próstata, tumores de cabeça e pescoço e fígado (*TP53 Database R15*). Frente aos relatos, estes tumores podem estar associados a mutações germinativas no gene *TP53*.

Neste estudo indivíduos que desenvolveram múltiplos tumores primários e foram detectados como portadores de mutação germinativa no gene *TP53* apresentaram na associação tumoral ao menos um tumor típico da LFS/LFL. Os tumores clássicos do espectro LFS/LFL, como o câncer de mama, ADR, SO, SPM e leucemia, corresponderam a 55,5% dos tumores que acometeram os indivíduos portadores de mutação. Os tumores descritos como menos frequentes em literatura, como o melanoma, câncer de próstata, câncer da tireóide e linfoma, corresponderam a 44,5% dos tumores em portadores de mutação. As principais associações tumorais encontradas no estudo de MALKIN et al. (1992) foram: (1) câncer de mama e tumor de SNC, (2) sarcoma de partes moles (lipossarcoma) e sarcoma ósseo

(osteossarcoma condroblástico), (3) sarcoma de partes moles (sarcoma de células fusiformes) e câncer gástrico e (4) linfoma não Hodgkin e câncer colorretal. No presente estudo as associações encontradas em pacientes com múltiplos tumores primários portadores de mutações germinativas no gene *TP53* foi o câncer de mama e câncer da tireóide (2/7) e o câncer de mama e sarcoma, ósseo e de partes moles. Em ambos os estudos estiveram presentes associações tumorais com neoplasias do espectro LFS/LFL como também foi observado tumores não clássicos da síndrome.

6.2.3 Idade de acometimento tumoral em pacientes com múltiplos tumores primários

O primeiro tumor ocorreu 5,1 anos mais cedo em pacientes com múltiplos tumores primários portadores de mutações germinativas em *TP53* (34,3 anos) do que em pacientes que não foram detectados como portadores de alterações (39,4 anos). A idade precoce no aparecimento do primeiro tumor em portadores de múltiplos tumores primários também foi verificada em outros grupos. GONZALEZ et al. (2009b) verificaram em pacientes portadores de múltiplos tumores primários que a idade média de aparecimento do primeiro tumor primário entre os pacientes com mutação germinativa em *TP53* foi de 21,9 anos contra uma média de 31,6 anos em pacientes sem mutação no gene *TP53*.

Os dados de Gonzalez corroboram com um dos primeiros relatos da síndrome realizado por Li et al. (1988), no qual o primeiro câncer em pacientes com múltiplos tumores primários foi diagnosticado em idade

precoce (mediana: 22 anos). Segundo VARLEY et al. (1997a), em famílias com critérios para LFS, 56% dos casos de cânceres são diagnosticados antes dos 30 anos de idade e 100% abaixo dos 50 anos; em famílias LFL, como é o caso do presente estudo, 44% dos cânceres são diagnosticados antes dos 30 anos e 78% abaixo dos 50 anos.

6.2.4 Tratamento radioterápico em pacientes com múltiplos tumores primários

Desde o início da convocação de pacientes com múltiplos tumores primários tentou-se incluir apenas pacientes nos quais os múltiplos tumores não haviam ocorrido em área de irradiação por tratamento radioterápico. No entanto, alguns pacientes deste estudo foram tratados com radioterapia em região torácica após terem desenvolvido câncer de mama (n=15) ou outros tumores, como linfoma e sarcoma, nesta região (n=2). Estudos realizados por HISADA et al. (1998) reportaram que múltiplos tumores primários ocorrem com alta frequência em pacientes LFS e que sarcomas radioinduzidos eram comuns entre os tumores subsequentes. Nos indivíduos do presente estudo os sarcomas referidos em pacientes com múltiplos tumores primários correspondiam ao primeiro tumor primário, e não a um tumor subsequente a radioterapia.

Em um estudo realizado por HENDERSON et al. (2010) com mais de 14.000 mulheres, das quais 7.000 foram tratadas com radioterapia em região torácica por um câncer pediátrico ou adulto jovem, 422 mulheres desenvolveram câncer de mama posteriormente. Os autores concluíram que

mulheres tratadas de câncer na infância ou em idade adulta jovem com moderada ou alta dose de radiação terapêutica em região torácica ($\geq 20\text{Gy}$) têm uma suscetibilidade elevada de desenvolver câncer de mama em idade jovem e o risco não se estabiliza com a idade. Dentre os 54 pacientes portadores de múltiplos tumores primários 17 foram submetidos à radioterapia em região torácica, e o câncer de mama esteve presente em 41,2% (7/17) como tumor subsequente ao tratamento.

Dos sete pacientes portadores de mutação, apenas um não tinha informações no prontuário a respeito do tratamento com radioterapia, dos seis pacientes restantes três não realizaram radioterapia como tratamento para nenhum tumor e os outros três foram submetidos a este tratamento em região torácica devido a câncer de mama, uma realizou a radioterapia em apenas uma das mamas, mas desenvolveu tumor na outra; a segunda paciente com câncer de mama foi tratada com radioterapia e desenvolveu outro câncer de mama contralateral e também foi submetida ao mesmo tipo de tratamento e a terceira paciente realizou radioterapia na mama, no entanto o segundo tumor primário foi o câncer da tireóide. O câncer da tireóide foi relatado como um dos tumores radioinduzidos após o tratamento de câncer de mama com radioterapia em mulheres portadoras de mutações germinativas no gene *TP53* (HEYMANN et al. 2010).

6.3 CÂNCER DE MAMA ANTES DOS 35 ANOS SEM MUTAÇÃO NOS GENES *BRCA1* E *BRCA2*

Neste estudo, foram avaliadas 41 pacientes com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Após a análise por sequenciamento do gene *TP53* observou-se a presença de apenas uma paciente (2,4%) portadora de mutação. No presente estudo a paciente portadora da mutação não apresentava histórico familiar condizente com a LFS/LFL. Em estudo realizado por TINAT et al. (2009), foram avaliados 128 pacientes portadores de câncer de mama antes dos 35 anos para mutações no gene *TP53*, previamente testados para mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e sem alterações detectadas. Foram verificadas mutações no gene *TP53* em 4% (5/128) dos pacientes. O grupo considerou como baixa a detecção de mutação. Devido a esses achados os autores concluíram que seria apropriado evitar o teste no gene *TP53* em pacientes com câncer de mama sem história familiar de câncer ou múltiplos tumores primários.

Interessante notar que a paciente portadora da alteração em *TP53* apresentou câncer de mama em idade muito jovem, aos 24 anos. Mesmo sendo a única mutação encontrada, se considerarmos somente o grupo de pacientes que desenvolveram câncer de mama antes dos 30 anos de idade a taxa de detecção é de 6,7%. Recentemente GONZALEZ et al. (2009b) sugeriram que mutações no gene *TP53* podem estar presentes em até 7% dos pacientes que desenvolveram câncer de mama unilateral antes dos 30 anos de idade e sem parente de primeiro ou segundo grau.

Neste sentido, em pacientes com câncer de mama entre 31 e 35 anos de idade sem mutação detectada nos genes *BRCA1* e *BRCA2* nenhuma alteração foi detectada no gene *TP53*. Nossos resultados corroboram com o estudo que não identificou nenhuma alteração em pacientes com câncer de mama entre os 30 e 49 anos e sem histórico familiar (RUIJS et al. 2010).

Apesar de ser uma taxa de detecção baixa, é fundamental que a síndrome de LFS/LFL seja um diagnóstico diferencial a ser feito nestas mulheres sem a mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, já que esta síndrome predispõe ao alto risco para o desenvolvimento de múltiplos tumores primários e ao amplo espectro de tumores.

É importante ressaltar que a Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditário, caracterizada por mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* e a Síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada por mutações no gene *TP53* não são as únicas síndromes de predisposição hereditária ao câncer de mama, sendo que outras síndromes como a Síndrome de Cânceres de Mama e Cólon hereditário, Síndrome de Peutz-Jeghers, Síndrome de câncer gástrico difuso hereditário, Síndrome de Saerhre-Chotzen e a Síndrome de Ataxia-Telangiectasia, também predispõem os portadores a esse tipo de neoplasia.

6.4 TUMORES ADRENOCORTICAIS

Segundo os critérios de Weiss menos de 10% dos tumores adrenocorticais se comportam de forma maligna e nenhuma característica ou um grupo de características é capaz de separar lesões de supra renal

benignas de malignas. O diagnóstico de malignidade só pode ser feito na ocorrência de metástase (WEISS 1984). Desta forma selecionamos para o estudo pacientes com tumores adrenocorticais independente da classificação maligno ou benigno.

Segundo estudos de WAGNER et al. (1994) e VARLEY et al. (1999), crianças com carcinoma adrenocortical têm uma alta taxa de detecção de mutação no gene *TP53*, variando de 50 a 80%.

O grupo de 11 pacientes ADR que foram testados para mutações germinativas no gene *TP53* era composto por 54,5% (6/11) de crianças e 45,4% de adultos (5/11). Dentre as seis crianças testadas, cinco eram portadoras de mutações no gene *TP53*, correspondendo a 83,3% das crianças portadoras de tumor adrenocortical. Apenas um adulto (20%) foi detectado como sendo portador de mutação no gene *TP53*.

A incidência do tumor adrenocortical foi maior entre as meninas do que em meninos na razão de 1:2,6. A predominância de meninas afetadas também foi vista em outros estudos nos quais a predominância variou de 1:3,5 e 1:1,6 (MICHALKIEWICZ et al. 2004; MARQUES-PEREIRA et al. 2006).

A estimativa da penetrância de 9,9% para tumores adrenocorticais, em indivíduos portadores da mutação p.R337H no gene *TP53*, sugere que 1 a cada 10 destes indivíduos desenvolverá o ADR até a idade de 10 anos (FIGUEIREDO et al. 2006). Como este cálculo de penetrância foi baseado em famílias nas quais pelo menos uma criança apresentou ADR, este dado deve ser interpretado com cautela.

Todos os pacientes do grupo ADR neste estudo foram diagnosticados como portadores da mutação p.R337H. Dentre estes, 50% possuíam histórico familiar de câncer compatível com LFL. Poucos relatos de câncer na família foram observados em um estudo realizado por (FIGUEIREDO et al. 2006), que verificou que apenas três de 37 pais e apenas um de 86 irmãos de 40 crianças portadoras da mutação p.R337H tinham desenvolvido câncer.

VARLEY et al. (1999) e CHOMPRET et al. (2001) consideram que a pesquisa de mutações no gene *TP53* deve ser considerada nos pacientes com ADR esporádicos, neste estudo 50% dos pacientes detectados com mutações germinativas no gene *TP53* não possuíam histórico familiar e foram diagnosticados como portadores de mutação.

6.5 CARCINOMAS DO PLEXO CORÓIDE

Pacientes pediátricos com tumores do plexo coróide podem ter um aumento da incidência de mutações germinativas no gene *TP53* (KRUTILKOVA et al. 2005). Neste estudo, o DNA da margem não tumoral de três blocos de parafina de carcinomas do plexo coróide foi extraído e analisado apenas para o éxon 10 do gene *TP53*. Nenhuma alteração foi detectada no DNA dos três blocos de tumores de carcinoma do plexo coróide, provenientes de duas crianças e um adulto.

Em um estudo recente realizado no Hospital Pequeno Príncipe, (Curitiba/PR- Brasil) com crianças que desenvolveram carcinoma do plexo

coróide, a mutação p.R337H presente no éxon 10 do gene *TP53* foi detectada em 63,6% das crianças. As famílias dos pacientes relataram ainda histórico familiar de câncer, sendo o de mama, estômago, próstata e adrenocortical os mais referidos respectivamente (CUSTODIO et al. 2011).

Infelizmente o número muito baixo de casos de carcinomas do plexo coróide (n=3) não permite uma associação clara dos dados encontrados neste estudo com o estudo de CUSTODIO et al. (2011).

6.6 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Verificamos a alta incidência da correlação da mutação p.R337H e de tumores adrenocorticais, como descrita em estudos anteriores (RIBEIRO et al. 2001; FIGUEIREDO et al. 2006). Apesar desta correlação genótipo fenótipo, é importante ressaltar que o espectro tumoral ligado a mutação p.R337H é muito amplo. Há relatos de pacientes portadores da mutação p.R337H com câncer da tireóide, câncer de próstata, pâncreas, estômago, melanoma, câncer de mama, câncer renal, câncer de fígado, câncer de útero, leucemia, tumores de cabeça e pescoço, sarcomas ósseos e de partes moles. No presente estudo esta mutação foi identificada em três pacientes com múltiplos tumores primários, que desenvolveram tumor adrenocortical, câncer prostático, sarcoma ósseo, câncer de tireóide, câncer de mama e linfoma. No banco de dados de mutações germinativas no gene *TP53* (*TP53* Database R15) a mutação p.R337H esta relacionada também a pacientes com tumores hematopoiéticos, no entanto não há nenhum relato

de pacientes portadores da mutação p.R337H que desenvolveram linfoma, o que foi encontrado neste estudo.

Neste estudo, não foi possível estabelecer outra correlação genótipo fenótipo. Nenhuma outra mutação germinativa detectada no gene *TP53* neste estudo pode ser relacionada a um tipo específico tumoral. No entanto é importante ressaltar que os tumores de mama são muito presentes na população brasileira e devem ser rastreados em portadores como o tumor de maior risco no sexo feminino.

6.7 MUTAÇÕES GERMINATIVAS DETECTADAS NO GENE *TP53*

Mutações germinativas no gene *TP53* estão relacionadas à LFS/LFL (MALKIN et al. 1990). Neste estudo, realizamos o sequenciamento direto de toda a região codificante do gene *TP53*. Este método junto à busca por rearranjos é reconhecido como *gold standard* até o momento.

Todas as mutações encontradas foram comparadas ao Banco de dados para mutações germinativas no gene *TP53* da Agência Internacional de Pesquisa para o Câncer (IARC). Apesar de existirem outros bancos de dados para o gene *TP53*, como (1) o Banco de Dados do Gene *TP53*, administrado pelo Dr. Thierry Soussi, (2) o Banco de Dados de Mutações Germinativas no Gene *TP53* de Praga e (3) a Base de conhecimentos do gene *TP53* em Singapura, os dados são originários do banco do IARC, que é constantemente atualizado.

Todas as alterações encontradas no gene *TP53* eram trocas de bases, sendo 80% (4/5) substituições *missense* e 20% (1/5) silenciosas. As mutações pontuais como troca de bases correspondem a 88,8% das mutações germinativas descritas no gene *TP53*, sendo que as substituições *missense* correspondem a 72,8% das alterações germinativas encontradas no gene *TP53*, enquanto as silenciosas não chegam nem a 1% das mutações descritas (*TP53* Database R15) (PETITJEAN et al. 2007).

6.7.1 Mutações germinativas no domínio de ligação

Dois pacientes portadores de múltiplos tumores primários e a paciente portadora de câncer de mama antes dos 35 sem mutação germinativa no gene *BRCA1* e *BRCA2*, foram detectados como portadores de mutações germinativas no domínio de ligação ao DNA. Duas destas alterações correspondem a mutações *missense*, p.M237I e p.V143M, sendo esta última pela primeira vez descrita em linhagem germinativa. A outra mutação encontrada corresponde a uma mutação silenciosa, p.T125T, mas devido a sua localização próxima ao sitio de *splicing* do íntron 4 tem efeito patogênico (*TP53* Database R15).

Nenhuma das alterações encontradas em pacientes portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA correspondia a um dos seis códons “hotspot” para mutações germinativas presentes neste domínio. Estudos de sequenciamento mostraram que mais de 30% das mutações germinativas que ocorrem no domínio de ligação ao DNA encontram-se nos códons 175, 245, 248, 249, 273 e 282 (PETITJEAN et al. 2007).

O domínio de ligação ao DNA corresponde à região central da proteína p53 e compreende dos aminoácidos 102 a 292 (MAY e MAY 1999).

Uma das principais funções da proteína p53 é a capacidade de estimular a transcrição de genes que contêm um elemento de ligação em seu promotor (SELIVANOVA e WIMAN 1995). Portanto mutações no domínio de ligação ao DNA, que impedem que esta ligação ocorra inativa a atividade de supressão tumoral da proteína p53 (SOUSSI et al. 2000).

▪ Patogênese da mutação p.Thr125Thr

A mutação p.T125T, que compreende a troca de um G por um A no códon 125, é uma mutação exônica que não altera o aminoácido treonina, no entanto possui um efeito *splicing* devido a sua localização no último nucleotídeo do éxon 4.

Mutações exônicas que não mudam a sequência de aminoácidos nem sempre são neutras. Análises de RNA, da mutação no códon 125 (ACG>ACA, p.T125T) localizada na extremidade 3' do éxon 4, revelam que o *splicing* do gene *TP53* é totalmente aberrante (WARNEFORD et al. 1992).

WARNEFORD et al. (1992) descreveu pela primeira vez a transição de uma guanina por uma adenina na posição -1 na sequência consenso do sítio doador de *splicing*. Esta base não é essencial para que o *splicing* ocorra, ao contrário do dinucleotídeo GT, que correspondem as duas primeiras bases do íntron (JACOB e GALLINARO 1989). Mas a sequência do sítio doador do íntron 4 é atípica, tendo uma citosina na posição 3 na sequência consenso de *splicing*, em vez de uma adenina ou guanina. Isto

significa que o tipo selvagem do sítio doador de *splicing* do íntron 4 possui apenas sete dos nove bases correspondentes a sequência consenso. Com a transição da guanina para adenina na posição -1, a sequência é reduzida para seis de nove bases, o que provavelmente é suficiente para interromper o *splicing* neste sítio (WARNEFORD et al. 1992).

▪ **Patogênese da mutação p.Val143Met**

O presente estudo identificou uma alteração *missense* no éxon 5 do gene *TP53*, p.V143M. Avaliação *in silico* da patogenicidade desta mutação, primeiramente descrita por este estudo, por meio das ferramentas de predição *SIFT* e *PolyPhen*, revelou que possivelmente a troca de aminoácidos modifique a função da proteína. Para que de fato sua patogenicidade seja comprovada, esta observação deve ser validada por ensaios funcionais.

Esta alteração permanece com sua patogênese inconclusiva.

▪ **Patogênese da mutação p.Met237Ile**

A mutação *missense* do éxon 7 do gene *TP53*, p.M237I corresponde a troca de uma guanina por uma citosina no códon 237, gerando a substituição do aminoácido metionina por isoleucina.

Estudos de sensibilidade à radiação em linhagem celular com a mutação p.M237I indicaram que estas células não são capazes de sofrer apoptose radioinduzida e assim são relativamente radorresistentes (ZHEN et al. 1995).

Outro estudo que avaliou a sensibilidade à radiação verificou que a linhagem celular que tinha a mutação p.M237I após o ensaio com raio X apresentou um aumento da mutagenese do gene TK1, levando a expressão elevada de proteínas antiapoptóticas, BCL-2 ou BCL-XL, resultando na supressão da morte celular programada (CHERBONNEL-LASSERRE et al. 1996).

Em estudo realizado por WIESE et al. (2001), que comparou a resposta de linhagem celular selvagem e mutada (p.M237I) após exposição à íons de ferro de alta energia, mostrou que as células mutadas eram menos sensíveis a morte celular e mais propensas a mutagenese após a exposição a esse tipo de radiação ionizante; e que a recombinação entre cromossomos homólogos foi elevada em células com a mutação, especulando assim que o tipo selvagem da p53 desempenha um papel na limitação da recombinação e que a forma mutante p.M237I facilita a recombinação desregada.

6.7.2 Patogênese de mutações no domínio de oligomerização

Em sua forma ativa a proteína p53 é tetramérica e o domínio de oligomerização, que compreende os aminoácidos 323 ao 356, é responsável por esta conformação (CHÈNE 2001). Mutações no domínio de oligomerização alteram a conformação tetramérica necessária para uma eficiente ligação ao DNA (LOMAX et al. 1997; KATO et al. 2003).

Onze pacientes, sendo seis do grupo ADR e cinco do grupo MP, foram detectados como portadores de mutações germinativas no domínio de oligomerização da proteína p53. Dez pacientes apresentaram a mutação

p.R337H e um deles apresentou a mutação p.R337C. A mutação *missense* do éxon 10 do gene *TP53*, p.R337H, correspondeu a 71,4% de todas as mutações detectadas neste estudo.

- **Patogênese da mutação p.Arg337His**

A alteração p.R337H é caracterizada pela troca do nucleotídeo guanina por uma adenina no segundo par de bases do códon 337 do éxon 10.

Estudos bioquímicos mostraram que a mutação p.R337H se localiza em uma alfa-hélice crítica para a estabilidade de dímeros de proteína p53 (DIGIAMMARINO et al. 2002). A arginina 337 tem 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 8,9 leva ao desdobramento do dímero, prevenindo por conseguinte uma ligação de DNA de alta afinidade e, presumivelmente, a atividade de transcrição da p53. Apesar da proteína mutada permanecer idêntica à proteína selvagem, com os domínios de ligação ao DNA e da transativação intactos, a alteração torna não estável a formação do tetrâmero que é a conformação que possibilita a p53 ter afinidade ao DNA e agir como fator de transcrição.

▪ Patogênese da mutação p.Arg337Cis

A mutação *missense* p.R337C, resulta na troca do aminoácido arginina por cisteína no códon 337 do gene *TP53*. A mutação p.R337C foi caracterizada funcionalmente como patogênica por meio de dois ensaios que avaliaram a capacidade de indução de apoptose e um ensaio de separação de alelos em leveduras (em inglês *Functional Analysis of Separated Allele in Yeast* - FASAY). CAMPLEJOHN et al. (1995) descreveram que linfócitos do sangue periférico (PBL) não estimulados de pacientes com mutações na linhagem germinativa de p53 tem resposta reduzida a sinais apoptóticos com irradiação de 4 Gy quando comparados a PBL de indivíduos normais. LOMAX et al. (1997), descreveram que pacientes com a mutação p.R337C tiveram uma redução na resposta a apoptose, quando comparados ao controle (tipo selvagem), após irradiação com 4Gy.

O FASAY utiliza o ADE2 como gene repórter localizado próximo ao promotor de elemento responsivo a p53, para permitir a seleção de transformantes positivos e a análise funcional da proteína p53. Leveduras com mutação no gene ADE2 endógeno quando cultivadas em meio com baixas concentrações de adenina (5ug/ml), acumulam um pigmento vermelho, um produto da síntese de adenina. Portanto, leveduras transformadas com p53 selvagem ou funcional, são capazes de sintetizar leucina e por causa da transativação de ADE2, sintetizam adenina, desta maneira formando colônias brancas. Sendo assim, p53 mutante e não funcional, não são capazes de ativar o gene repórter, originando colônias

vermelhas. Mutantes de p53 com atividade parcial são capazes de originar colônias rosas. LOMAX et al. (1997), demonstraram que a mutação p.R337C origina colônias rosas, tendo então essa mutação capacidade de ativar parcialmente o gene repórter.

6.7.3 Mutações *de novo*

A frequência de mutações *de novo* em indivíduos LFS/LFL está entre 7% e 20% (GONZALEZ et al. 2009c). Cerca de 70% das mutações são identificadas entre os éxons 5-8, esta porcentagem aumenta para 90% quando a análise é expandida, incluindo do éxon 4 ao 9.

Uma das pacientes deste estudo desenvolveu dois osteossarcomas osteoblásticos, um aos 9 anos em fêmur direito, outro aos 13 anos em tíbia esquerda, além de tumor de mama Phyllodes maligno aos 15 anos e leucemia aos 16 anos de idade somado a um histórico familiar de uma irmã gêmea univitelina que desenvolveu tumor de sistema nervoso central aos seis anos de idade. A paciente foi detectada portadora da mutação germinativa p.M237I, localizada no éxon 7 do gene *TP53*. Foi proposto aos pais da paciente a realização do teste genético que demonstrou que ambos não são portadores da alteração que caracteriza a síndrome de Li-Fraumeni na filha. O material do tumor da irmã não estava disponível e, como a menor tinha ido a óbito, não foi possível testá-la. Este fato é muito interessante pois como duas irmãs gemias univitelinas tiveram tumores típicos da LFS/LFL e uma delas foi diagnosticada como portadora da mutação p.M237I, provavelmente a alteração aconteceu no período antes da fecundação

possivelmente na gametogênese. Este relato é compatível com uma mutação *de novo*.

6.8 PACIENTES COM MÚLTIPLOS TUMORES SEM MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *TP53*

A ocorrência de mais de um tumor primário em um mesmo indivíduo é um evento raro na população geral e que pode ser verificado em diversas SPHC. Sendo assim indivíduos que não foram detectados como portadores de mutações germinativas no gene *TP53*, característica da LFS/LFL podem ser portadores de outras mutações, não sendo sua caracterização o objetivo deste estudo.

Em pacientes com critérios clínicos para a LFS/LFL não portadores de mutação germinativa deve-se considerar a possibilidade da busca da mutação no gene *TP53* a partir de outros métodos, visando à busca da detecção de grandes deleções, de alteração na região promotora incluindo o éxon 1, não codificador. A análise do gene *MDM2*, um dos principais reguladores da p53, poderia determinar alterações que levariam ao funcionamento anômalo desta proteína. Outra possibilidade para não detecção de mutação no gene *TP53* naqueles pacientes com LFS/LFL é que outros genes, como o *CHEK2*, que já foi descrito como mutado em algumas famílias com a LFS/LFL, possam estar alterados contribuindo para o desenvolvimento de tumores do fenótipo LFS (RUIJS et al. 2009).

6.9 PONTOS A SEREM ELUCIDADOS

Seria interessante a realização de ensaio funcional para verificar o potencial patogênico da alteração encontrada na paciente com câncer de mama antes dos 35 anos sem mutação nos genes *BRCA1* e *BRCA2*, a mutação p.V143M.

A realização de estudos de segregação das mutações encontradas nos familiares e um método indireto de definição da patogenicidade da alteração encontrada. Estes estudos são importantes para verificar a prevalência de mutações *de novo* e acompanhar os familiares em risco.

A realização da técnica de MLPA nos pacientes que não foram detectados como portadores de mutações no gene *TP53* pela técnica de sequenciamento, serviria talvez para elucidar a ocorrência de múltiplos tumores primários, câncer de mama em idade jovem e tumores adrenocorticais em indivíduos que não possuem uma alteração pontual.

Outro ponto que seria necessário esclarecer é a correlação entre carcinomas do plexo coróide e mutações no gene *TP53*. No entanto devido a quantidade insuficiente de DNA não foi possível a análise de toda região codificante do gene *TP53*.

7 CONCLUSÕES

- Pacientes com múltiplos tumores primários, sendo pelo menos um do espectro da síndrome de Li-Fraumeni, devem realizar o teste genético para identificação de mutações germinativas no gene *TP53*, devido à alta ocorrência de mutações neste grupo - 13% (7/54).
- Crianças com tumores adrenocorticais, independente do histórico familiar, devem ser testados para mutações no gene *TP53*.
- Mutações no gene *TP53* podem estar presentes em pacientes com câncer de mama antes dos 30 anos sem mutação detectada em *BRCA1* e *BRCA2*.
- A alteração p.V143M foi descrita pela primeira vez em linhagem germinativa. Ensaios funcionais são necessários para elucidar a relação causal entre esta alteração e a síndrome de Li-Fraumeni.
- A mutação p.R337H correspondeu a 71,4% (10/14) de todas as alterações detectadas neste estudo indicando que o rastreamento nestes grupos deve ser iniciado pela mutação fundadora brasileira.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Achatz MIW. **Diagnóstico molecular da Síndrome de Li-Fraumeni em famílias brasileiras**. São Paulo: 2006. [Dissertação de mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Achatz MIW, Oliver M, Le Calvez F, et al. The *TP53* mutation, p.R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett** 2007; 245:96-102.

Achatz MIASW. **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**. São Paulo; 2008. [Tese de doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo].

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. **Int J Cancer** 1995; 64:430-3.

Ashcrof M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. **Oncogene** 1999; 18:7637-43.

Bellocq JP, Magro G. Fibroepithelial tumors. In: Tavassoli FA, Devilee P editor. World Health Organization Classification of Tumors. **Pathology and Genetics of Tumors of the breast and female genital organs**. IARC Press. Lyon: 2003. p. 100-3.

Berger C, Thiesse P, Lellouch-Tubiana A, et al. Choroid plexus carcinoma in childhood: clinical features and prognostic factors. **Neurosurgery** 1998; 42:470-5.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancer in carriers of germline *TP53* mutations. **Oncogene** 2001; 20:4621-8.

Bougeard G, Sesboüé R, Baert-Desurmont S, et al. 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.

Botma M, Russell DI, Kell RA. Cowden's disease: a rare cause of oral papillomatosis. **J Laryngol Otol** 2002; 116:221-3.

Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:5658-71.

Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, et al. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. **J Med Genet** 2004; 41:508-17.

Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. **Gene** 2001; 277:15-35.

Camplejohn RS, Perry P, Hodgson SV, et al. A possible screening test for inherited p53-related defects based on the apoptotic response of peripheral blood lymphocytes to DNA damage. **Br J Cancer** 1995; 72:654-62.

Cherbonnel-Lasserre C, Gauny S, Kronenberg A. Suppression of apoptosis by Bcl-2 or Bcl-xL promotes susceptibility to mutagenesis. **Oncogene** 1996; 13:1489-97.

Chène P. The role of tetramerization in p53 function. **Oncogene** 2001; 20:2611-7.

Chompret A, Brugières L, Ronsin M, et al. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. **Br J Cancer** 2000; 82:1932-7.

Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet** 2001; 38:43-7.

Chompret A, Brugières L, Bonaiti-Pellié C, Feunteun J. Sex differences in cancer risk among germline p53 mutation carriers. **Br J Cancer** 2004; 91:603-4.

Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, et al. Unclassified Genetic Variants Working Group. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. **Hum Mutat** 2008; 29:1314-26.

Crawford LV, Pim DC, Lamb P. The cellular protein p53 in human tumours. **Mol Biol Med** 1984; 2:261-72.

Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline *TP53* p.R337H Mutation in Southern Brazil. **PLoS One** 2011; 6:18015.

DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol** 2002; 9:12-6.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. **Hum Mol Genet** 1997; 6:105-10.

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. **Cancer Surv** 1995; 25:101-24.

Falck J, Mailand N, Syljuasen RG, Bartek J, Lukas J. The ATM-Chk2-Cdc25A checkpoint pathway guards against radioresistant DNA synthesis. **Nature** 2001; 410:842-7.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet** 2006; 43:91-6.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell** 1989; 57:1089-93.

Frebourg T, Barbier N, Yan YX, et al. Germ-line p53 mutations in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. **Am J Hum Genet** 1995; 56:608-15.

Garber JE, Burke EM, Lavally BL, et al. Choroid plexus tumors in the breast cancer-sarcoma syndrome. **Cancer** 1990; 66:2658-6.

Garber JE, Goldstein AM, Kantor AF, Dreyfus MG, Fraumeni JF Jr, Li FP. Follow-up study of twenty-four families with Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res** 1991; 51:6094-7.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Ginsburg OM, Akbari MR, Aziz Z, et al. The prevalence of germ-line TP53 mutations in women diagnosed with breast cancer before age 30. **Fam Cancer** 2009; 8:563-7.

Gonzalez KDF, Buzin CH, Weitzel JN, Sommer SS. Reply to J. Tinat et al. **J Clin Oncol** 2009a; 22:8353.

Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li-Fraumeni syndrome Clinical characteristics of families with *p53* germline mutations. **J Clin Oncol** 2009b; 27:1250-6.

Gonzalez KD, Buzin CH, Noltner KA, et al. High frequency of de novo mutations in Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet** 2009c; 46:689-93.

Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 update. **Cancer**. 1999; 86:2464-77.

Hainaut P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. **Nat Med** 2002; 8:21-3.

Hainaut P, Oliver M. **Slide-show on TP53 mutations in human cancer: TP53 genetic variations in human cancer**. Available from: <URL:<http://www.p53.iarc.fr>> [2011 mai 12]

Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. **Cell** 1993; 75:805-16.

Hartley AL, Birch JM, Marsden HB, Harris M. Malignant melanoma in families of children with osteosarcoma, chondrosarcoma and adrenal cortical carcinoma. **J Med Genet** 1987; 24:664-6.

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.

Hartley AL, Birch JM, Tricker K, et al. Wilm's tumor in the Li-Fraumeni cancer family syndrome. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 67:133-5.

Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. **Ann Intern Med** 2010; 152:444-55; W144-54.

Heymann S, Delaloge S, Rahal A, et al. Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. **Radiat Oncol** 2010; 5:104.

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.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. **Multiple primaries**. Lyon: IARC; 1994. (International Association of Cancer Registries-internal report n°. 94/003).

Jacob M, Gallinaro H. The 5' splice site: phylogenetic evolution and variable geometry of association with U1RNA. **Nucleic Acids Res** 1989; 17:2159-80.

Kato S, Han SY, Liu W, et al. 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.

Kleinerman RA, Tucker MA, Tarone RE, et al. Risk of new cancers after radiotherapy in long-term survivors of retinoblastoma: an extended follow-up. **J Clin Oncol** 2005; 23:2272-9.

Krutilkova V, Trkova M, Fleitz J, et al. Identification of five new families strengthens the link between childhood choroid plexus carcinoma and germline TP53 mutations. **Eur J Cancer** 2005; 41:1597–603.

Laloo F, Varley J, Ellis D, et al. 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 host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979; 278:261-3.

Lane DP. Cancer: p53, guardian of the genome. **Nature** 1992; 358:15-6.

Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. **Nature** 1991; 351:453-6.

Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:749-58.

Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. **Cancer Res** 1988; 48:5358-62.

Lin J, Wu X, Chen J, Chang A, Levine AJ. Functions of the p53 protein in growth regulation and tumor suppression. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol** 1994; 59:215-23.

Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility Syndromes Second Edition. **J Natl Cancer Instit Monographs** 2008; 381-93.

Linzer DI, Levine AJ. Characterization of 54K Dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. **Cells** 1979; 17:43-52.

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, et al. **Biologia celular e molecular**. 5ª ed. Trad. de R M Scheibe. Porto Alegre: Artmed; 2005. Câncer; p.958.

Lomax ME, Barnes DM, Gilchrist R, Picksley SM, Varley JM, Camplejohn RS. Two functional assays employed to detect an unusual mutation in the oligomerisation domain of p53 in a Li-Fraumeni like family. **Oncogene** 1997; 14:1869-74.

Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. von Hippel-Lindau disease. **Lancet** 2003; 361:2059-67.

Lynch HT, Guirgis HA. Childhood cancer and the SBLA syndrome. **Med Hypotheses** 1979; 5:15-22.

Mailand N, Falck J, Lukas C, et al. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. **Science** 2000; 288:1425-9.

Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990; 250:1233-8.

Malkin D, Jolly KW, Barbier N, et al. Germline mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. **N Engl J Med** 1992; 326:1309-15.

Marques-Pereira R, Delacerda L, Lacerda HM, Michalkiewicz E, Sandrini F, Sandrini R. Childhood adrenocortical tumours: a review. **Hered Cancer Clin Pract** 2006; 4:81-9.

Marx S, Spiegel AM, Skarulis MC, Doppman JL, Collins FS, Liotta LA. Multiple endocrine neoplasia type 1: clinical and genetic topics. **Ann Intern Med** 1998; 129:484-94.

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.

Melo ELA, Garcia MRT, Fernandes RY, et al. Lesões expansivas do plexo coróide. **Radiol Bras** 2003; 36:379-84.

Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of childhood with adrenocortical tumors: an analysis of 254 cases from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol** 2004; 22:838-45.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1308-14.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 7:66-71.

Nadav Y, Pastorino U, Nicholson AG. Multiple synchronous lung cancers and atypical adenomatous hyperplasia in Li-Fraumeni syndrome. **Histopathology** 1998; 33:52-4.

Naseem H, Boylan J, Speake D. Inherited association of breast and colorectal cancer: limited role of *CHEK2* compared with high-penetrance genes. **Clin Genet** 2006; 70:388-95.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2; 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:665-76.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Clinical practice guidelines in oncology: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian.** Version 1.2011. Available from: <URL:http://www.nccn.org/professionals/physian_gls/pdf/genetics_screening.pdf> [2011 maio 12].

Nichols KE, Malkin D, Garber JE, Fraumeni JF Jr, Li FP. Germ-line p53 mutations predispose to a wide spectrum of early-onset cancers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2001; 10:83-7.

Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature** 1989; 342:705-8.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res** 2001; 11:863-74.

Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. **Nucleic Acids Res** 2003; 31:3812-4.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. **Thompson & Thompson: genética médica.** 6ª ed. Trad. de P A Motta. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002. Informação genética e avaliação de risco; p.330-3.

Olivier M, Eels R, Hollstein M, et al. The IARC *TP53* database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mut** 2002; 19:607-14.

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. **Cancer Res** 2003; 63:6643-50.

Palmero EI, Schöler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Palmero EI, Ewaldb IP, Patricia Ashton-Prollac PA, Ribeiro PI. Cânceres de mama e ovário hereditários (HBOC). In: Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Rede nacional de câncer familiar: manual operacional**. Rio de Janeiro: INCA; 2009. p.77-89.

Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Hum Mutat** 2007; 28:622-9.

Piovezan GC. **Prevalência do alelo TP53 p.R337H no Estado do Paraná** Curitiba; 2006. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal do Paraná].

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:3894-900.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-5.

Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, et al. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. **Cancer Lett** 2007; 247:353-5; author reply 356-8.

Ribeiro RC, Pinto EM, Zambetti GP. Familial predisposition to adrenocortical tumors: clinical and biological features and management strategies. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2010; 24:477-90.

Rocha JCC; Kagohara LT. Oncogenética e farmacogenética. In: Guimarães JRQ, editor. **Manual de oncologia**. 2ª ed. São Paulo: BBS Editora, 2006. p.57-66.

Rocha JCC, Vargas FR, Aschton-Prolla P. **Câncer familiar**. Elaboração final: 14 de setembro de 2007. Disponível em: <URL:http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/027.pdf> [2011 jun 20].

Rosso S, Angelis R, Ciccolallo L, et al. Multiple tumours in survival estimates. **Eur J Cancer** 2009; 45:1080-94.

Ruijs MW, Broeks A, Menko FH, et al. The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. **Hered Cancer Clin Pract** 2009; 7:4.

Ruijs MW, Verhoef S, Rookus MA, et al. *TP53* germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. **J Med Genet** 2010; 47:421-8.

Russo CL, McIntyre J, Goorin AM, Link MP, Gebhardt MC, Friend SH. Secondary breast cancer in patients presenting with osteosarcoma: possible involvement of germline p53 mutations. **Med Pediatr Oncol** 1994; 23:354-8.

[SEER] Surveillance, Epidemiology and End Results. **Cancer statistics review, 1975-2008**. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2008/> [2011 maio 20].

[SEER] Surveillance, Epidemiology and End Results. **Multiple primary and histology coding rules manual**. Revised November 5, 2010. Available from: <URL:<http://www.seer.cancer.gov/tools/mphrules/download.html/>> [2011 maio 20].

Selivanova G, Wiman KG. p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. **Adv Cancer Res** 1995; 66:143-80.

Shiseki M, Nishikawa R, Yamamoto H, et al. Germ-line p53 mutation is uncommon in patients with triple primary cancers. **Cancer Lett** 1993; 73:51-7.

Smits VA, Medema RH. Checking out the G(2)/M transition. **Biochim Biophys Acta** 2001; 1519:1-12.

Soussi T, Caron de Fromental C, May P. Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. **Oncogene** 1990; 5:945-52.

Soussi T, Dehouche K, Bérout C. p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. **Hum Mutat** 2000; 15:105-13.

Speiser P, Gharehbaghi-Schnell E, Eder S, et al. A constitutional de novo mutation in exon 8 of the p53 gene in a patient with multiple primary malignancies. **Br J Cancer** 1996; 74:269-73.

Strong LC, Stine M, Norsted TL. Cancer in survivors of childhood soft tissue sarcoma and their relatives. **J Natl Cancer Inst** 1987; 79:1213-20.

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.

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 Version of Chompret Criteria for Li-Fraumeni Syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 10:108-9.

Tucker T, Friedman JM. Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the "two-hit" hypothesis. **Clin Genet** 2002; 62:345-57.

Valentin MD, Silva FC, Santos EM, et al. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. **Fam Cancer** 2011.

Vargas FR. Aconselhamento genético no câncer hereditário, pré-teste e pós-teste. In: Louro ID, Llerena Junior JC, Melo MSV, Prolla PA, editores. **Genética molecular do câncer**. São Paulo: MSG Produção Editorial; 2002. p.266-8.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. **J Med Genet** 1995; 32:946-95.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997a; 57:3245-52.

Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome--a molecular and clinical review. **Br J Cancer** 1997b; 76:1-14.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Are there low-penetrance *TP53* Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am J Hum Genet** 1999; 65:995-1006.

Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2003; 21:313-20. Erratum in: **Hum Mutat** 2003; 21:551.

Vasen HF. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. **Familial Cancer** 2005; 4:219-25.

Walsh T, Casadei S, Coats KH, et al. Spectrum of mutations in *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK2* and *TP53* in families at high risk of breast cancer. **JAMA** 2003; 295:1379-88.

Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:1707-10.

Wang Y, Prives C. Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. **Nature** 1995; 376:88-91.

Warneford SG, Witton LJ, Townsend ML, et al. Germ-line splicing mutation of the p53 gene in a cancer-prone family. **Cell Growth Differ** 1992; 3:839-46.

Weinberg RL, Freund SM, Veprintsev DB, et al. Regulation of DNA binding of p53 by its C-terminal domain. **J Mol Biol** 2004; 342:801–811.

Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol** 1984; 8:163-9.

Wiese C, Gauny SS, Liu WC, Cherbonnel-Lasserre CL, Kronenberg A. Different mechanisms of radiation-induced loss of heterozygosity in two human lymphoid cell lines from a single donor. **Cancer Res** 2001; 61:1129-37.

Wolff JEA, Sajedi M, Brant R, et al. Choroid plexus tumours. **Br J Cancer** 2002; 87:1086-91.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, et al. Localization of a breast cancer susceptibility gene, *BRCA2*, to chromosome 13q12-13. **Science** 1994; 30:2088-90.

Wu X, Bayle JH, Olson D, et al. The p53–mdm-2 autoregulatory feedback loop. **Genes Dev** 1993; 7:1126-32.

Yamada H, Shinmura K, Yamamura Y, et al. Identification and characterization of a novel germline p53 mutation in a patient with glioblastoma and colon cancer. **Int J Cancer** 2009; 125:973-6.

Zambetti GP. The p53 tumor suppressor pathway and cancer. **Protein Rev** 2005; 2:115-21.

Zhen W, Denault CM, Loviscek K, Walter S, Geng L, Vaughan AT. The relative radiosensitivity of TK6 and WI-L2-NS lymphoblastoid cells derived from a common source is primarily determined by their p53 mutational status. **Mutat Res** 1995; 346:85-92.

Anexo 1 - Centros colaboradores

Centros Colaboradores	Pacientes (n)			
	MP	ADR	CM	PC
Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP	53	9	20	3
Instituto Brasileiro de Controle ao Câncer (IBCC), São Paulo, SP			11	
Hospital de Câncer Pio XII, Barretos, SP			10	
Hospital Amaral Carvalho, Jaú, SP				
Hospital Sara Rolim Caracante (GPACI), Sorocaba, SP	1			
Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC		2		
Total	54	11	41	3

Anexo 2 - 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

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: DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *TP53* EM PACIENTES PORTADORES DE MÚLTIPLOS TUMORES PRIMÁRIOS OU TUMORES ISOLADOS TÍPICOS DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

2- PESQUISADOR: Marina de Camargo Cannavan
CARGO/FUNÇÃO: Aluna de Pós Graduação *Stricto Sensu* em Ciências - Área de Oncologia da
Fundação Antônio Prudente - Hospital AC Camargo.

3- Orientadora: Maria Isabel Alves Souza A. S. Waddington Achatz.
CARGO/FUNÇÃO: Médica Geneticista, diretora do Departamento de Oncogenética do Hospital A.C.
Camargo

4- Centro Colaborador: Programa de Oncogenética do Serviço de Genética Médica do Hospital de
Clínicas de Porto Alegre (HCPOA)

5. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA: RISCO MÍNIMO

6. DURAÇÃO DA PESQUISA: 2 anos

III - INFORMAÇÕES A(O) PACIENTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo pesquisar alterações genéticas que estejam associadas ao aumento de risco para o câncer. Assim, será avaliada a sequência de DNA do gene *TP53* de indivíduos que tiveram mais de um tipo de tumor ou que tiveram tumores relacionados à Síndrome de Li Fraumeni (câncer de mama antes dos 36 anos de idade sem alteração no teste dos genes *BRCA1* e *BRCA2*, tumor adrenocortical ou carcinoma do plexo coróide). Este documento fornece informações sobre o estudo para o qual está sendo convidado a participar.

IV - REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:

1- OBJETIVOS DA PESQUISA:

Você foi convidado (a) a participar deste estudo, pois a história de casos de câncer em você ou em sua família indica que você pode ser portador (a) de uma síndrome hereditária chamada de Síndrome de Li-Fraumeni que aumenta o risco para o desenvolvimento de câncer.

O objetivo deste estudo é a identificação de alterações genéticas que possam estar relacionadas com o diagnóstico da síndrome.

2- JUSTIFICATIVA DA PESQUISA

Para obter maior conhecimento clínico e científico do câncer, médicos e pesquisadores desta instituição desenvolvem estudos de pesquisa. Pela pesquisa é possível conhecer melhor os mecanismos das doenças e oferecer novas possibilidades de diagnósticos e tratamento.

A Síndrome de Li-Fraumeni é uma doença genética rara e hereditária, na qual o indivíduo apresenta alto risco para o desenvolvimento de câncer. Os tumores mais comuns nessa síndrome são sarcoma, tumores no cérebro (sistema nervoso central), tumores adrenocortical e câncer de mama de início em idade jovem. Esses cânceres podem surgir devido a uma falha em um dos genes que controlam o crescimento das células, como o gene *TP53*. Os genes contêm informações que determinam como as células do organismo devem funcionar. Quando ocorrem alterações nessa sequência desses genes (mutações) o risco para desenvolver tumores é maior.

Este estudo tem a intenção de investigar a presença de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes que tiveram mais de um tumor primário, ou em pacientes com tumores relacionados à Síndrome de Li-Fraumeni.

3- PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS:

Após a assinatura deste termo, você será encaminhado ao laboratório em que será coletada uma amostra de seu sangue (8 mL), dividida em dois tubos identificados. Parte do DNA extraído das células do sangue será armazenada e parte será enviada ao laboratório para análise. Uma parte de seu DNA será analisada por técnicas de biologia molecular para verificar se apresenta alteração (mutação). Quando o resultado estiver pronto (processo que pode demorar mais de dois anos, por se tratar de pesquisa), você receberá um contato por telefone para agendar uma consulta de retorno. Nesta consulta você saberá o resultado do teste genético e serão discutidas as implicações desse resultado para você e sua família. Contudo, você pode se recusar a receber o resultado. O teste não terá custo e você não receberá nenhum tipo de remuneração financeira pela participação neste estudo.

4- DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS

Os desconfortos envolvidos na coleta de sangue são mínimos e incluem dor local, sangramento e hematoma. O risco relacionado à realização de testes genéticos são principalmente psicológicos. Com o conhecimento do resultado do teste genético alguns pacientes podem desenvolver sintomas como ansiedade, raiva e depressão. O aconselhamento genético e psicológico tem como objetivo ajudá-lo(a) a lidar com a informação recebida.

5- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS

A realização do teste genético possibilitará a confirmação do diagnóstico clínico. O maior benefício obtido é a identificação da alteração genética responsável pela síndrome e a possibilidade de identificar outros portadores na família.

A realização de rastreamento em pacientes com diagnóstico molecular da síndrome de Li-Fraumeni permite o diagnóstico precoce de tumores, quando o acompanhamento é feito de maneira periódica.

6-CONFIDENCIALIDADE

A sua identidade será preservada, sendo que somente os membros da equipe médica e da Comissão de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros. A confidencialidade de suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas nesse estudo terão acesso às informações. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhum outro estudo de pesquisa. A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a bióloga Marina de Camargo Cannavan do Hospital AC Camargo de São Paulo pelo telefone (11) 2189-5180, ou com a Dra Patrícia Ashton-Prolla do Hospital de Clínicas de Porto Alegre pelo telefone (51)2101-7661.

Se o pesquisador principal não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital AC Camargo– SP, que aprovou o projeto, esse também pode auxiliá-lo a esclarecer algumas dúvidas que tiver, pelo telefone (11)2189-5020.

V - ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber, a qualquer tempo, resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos e benefícios ligados à pesquisa e ao tratamento e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM NÃO

2. Declaro estar ciente do meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade do meu tratamento.

SIM NÃO

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 viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrentes da pesquisa.

SIM NÃO

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

SIM NÃO

7. Declaro que autorizo que amostras de DNA sejam armazenadas no banco de macromoléculas do Hospital A.C. Camargo.

SIM NÃO

V. INFORMAÇÕES SOBRE O PESQUISADOR:

Pesquisadora responsável pelo acompanhamento da pesquisa:

Dra. Maria Isabel Waddington Achatz CRM – 105322

Departamento de Oncogenética do Hospital A.C. Camargo - São Paulo.

Endereço: Rua Professor Antonio Prudente, 211 – 1º subsolo/ Bloco A – São Paulo

TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES

ADVERSAS:(XX11) 2189-5181/ 2189-5180

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 ter compreendido os termos desse termo, consinto em participar do presente Protocolo de Pesquisa, autorizando a coleta, o armazenamento, e a análise de amostras sanguíneas e de DNA.

_____, ____ de _____ de 20 ____
(Cidade, dia, mês e ano)

assinatura do sujeito da pesquisa
ou responsável legal

assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo 3 - Caracterização clínica e molecular das pacientes do grupo CM

Código	Idade	Instituição	Tipo histológico	TNM	Receptor de Estrógeno	Receptor de Progesterona	cerb-b2	Classificação	Gene <i>TP53</i>	Hipótese diagnóstica
MJ01001T	33	IBCC	CDI	IIA T1N1M0	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ01004T	34	IBCC	CDI	IIA T1N1M0	POSITIVO (em 10% cels Tum.)	POSITIVO (em 70% cels Tum.)	POSITIVO (2+)	LUMINAL B	—	LFS-Eeles1
MJ01006T	32	IBCC	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO	POSITIVO (em 50% cels Tum.)	POSITIVO (2+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ01007T	25	IBCC	CDI	IV	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO (1+)	TR NEG	—	Esporádico
MJ01008T	33	IBCC	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ01009T	33	IBCC	CDI	IIB T2N1M0	NEG	NEGATIVO	NEGATIVO	TR NEG	—	Esporádico
MJ01010T	31	IBCC	CDI	IIB T2N1M0	20%	NEGATIVO	NEGATIVO	LUMINAL A	—	CMOH
MJ01011T	33	IBCC	CLI	I T1NOMO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ01012T	30	IBCC	CDI	TXN1M0	NEG	NEGATIVO	POSITIVO (3+)	HER 2	—	Esporádico
MJ01014T	29	IBCC	CLI	I T1NOMO	30% ++	40% ++	NEGATIVO	LUMINAL A	—	CMOH
MJ01015T	33	IBCC	CPAPILÍFERO	IIA T1N1M0	pos +++ (40%)	NEGATIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ02001T	28	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	CMOH
MJ02002T	30	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ02003T	26	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO (0)	TR NEG	—	LFS-Eeles1
MJ02004T	34	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO (em 60% das células)	POSITIVO (em 80% das células)	NEGATIVO (1+)	LUMINAL A	—	LFS-Eeles1/ LFS-Chompret/CMOH
MJ02005T	29	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	POSITIVO (em 90% das células)	NEGATIVO	NEGATIVO (1+)	LUMINAL A	—	LFS-Eeles1
MJ02006T	35	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	POSITIVO (em 30% das células)	POSITIVO (em 90% das células)	POSITIVO (2+)	LUMINAL B	—	CMOH
MJ02007T	29	AC Camargo	CDI	IIIA T2N2M0	POSITIVO (em 90% das células)	POSITIVO (em 70% das células)	POSITIVO (2+)	LUMINAL B	—	LFS Chompret/CMOH
MJ02008T	33	AC Camargo	CLI	IIIA T2N2M0	POSITIVO (em 20% das células)	NEGATIVO	NEGATIVO(0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ02013T	29	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	POSITIVO (em 10% das células)	POSITIVO (em 50% das células)	NEGATIVO (1+)	LUMINAL A	—	CMOH
MJ02014T	35	AC Camargo	CDI	TXN0M0	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (2+)	HER 2	—	CMCH

Cont/ Anexo 3

MJ02015T	34	AC Camargo	CDI	IIB T3N0M0	POSITIVO (em 100% das células)	POSITIVO (em 70% das células)	POSITIVO (2+)	LUMINAL B	—	LFS-Eeles1/CMOH
MJ02016T	35	AC Camargo	CD1	IIA T2N0M0	POSITIVO (em 80% das células)	POSITIVO (em 90% das células)	NEGATIVO (1+)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ02019T	34	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	POSITIVO (em 100% das células)	POSITIVO (em 90% das células)	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ02024T	35	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO(3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ02027T	34	AC Camargo	CDI	IIIA T2N2AM0	POSITIVO (em 50% das células)	POSITIVO (em 90% das células)	NEGATIVO(0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ02028T	32	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO(0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ02033T	34	AC Camargo	CDI	IIB T2N1M0	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO (0)	TR NEG	—	LFS-Eeles1
MJ02036T	26	AC Camargo	CDI	IIIA T2N2M0	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO(2+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ02038T	22	AC Camargo	CDI	IIA T2N0M0	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO (2+)	HER 2	—	Esporádico
MJ02039T	24	AC Camargo	CDI	IIIA T2N2M0	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO(0)	LUMINAL A	p.V143M	Esporádico
MJ04005T	29	Barretos	CDI	IIIA T3N2M0	POS	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ04011T	29	Barretos	CDI		POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ04012T	26	Barretos	CDI	IV	POS	POSITIVO	POSITIVO (3+)	LUMINAL B	—	Esporádico
MJ04013T	19	Barretos	CDI	I	POS	POSITIVO	NEGATIVO	LUMINAL A	—	CMOH
MJ04015T	31	Barretos	CDI	IIIA	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	LFS-Eeles1
MJ04019T	34	Barretos	CDI	IIA	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	LFS-Eeles1
MJ04020T	35	Barretos	CDI	IIIB	POS	POSITIVO	POS FRACO 2/3	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ04025T	30	Barretos	CDI	IIIB	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ04027T	34	Barretos	CDI	IIIA	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	Esporádico
MJ04028T	28	Barretos	CDI	IIA	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO (0)	LUMINAL A	—	LFS-Eeles1

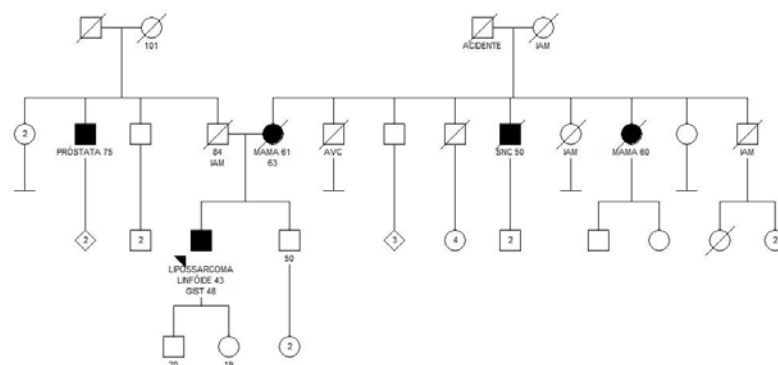
Classificação	TIPO
LUMINAL A	ER/PR+ HER-
LUMINAL B	ER/PR+ HER+
HER 2	ER/PR- HER+
TR NEG	ER/PR- HER-

Anexo 4 – Heredogramas grupo MP

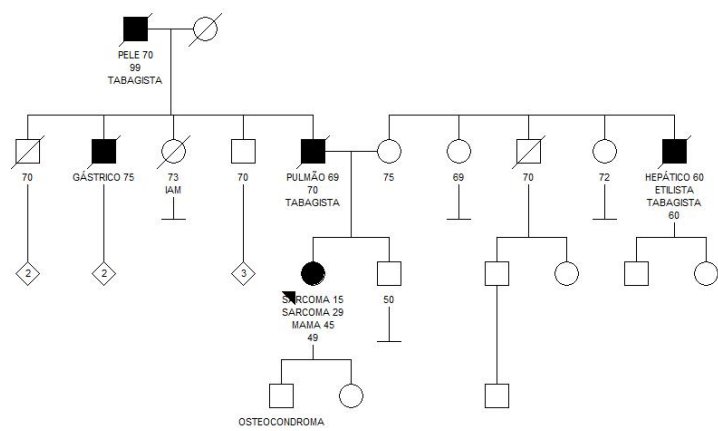
Paciente índice identificado por uma seta. Os números correspondem a idade de acometimento tumoral e idade atual do indivíduo



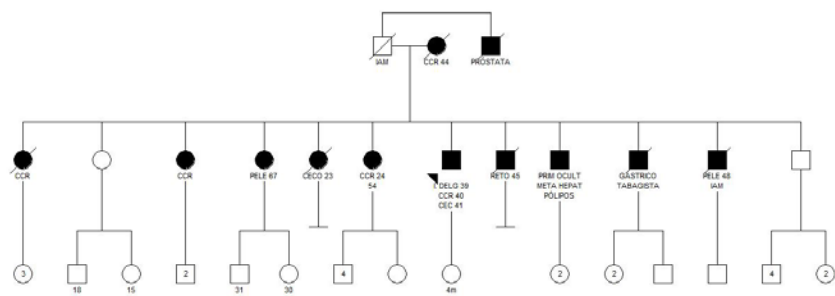
MT - 01



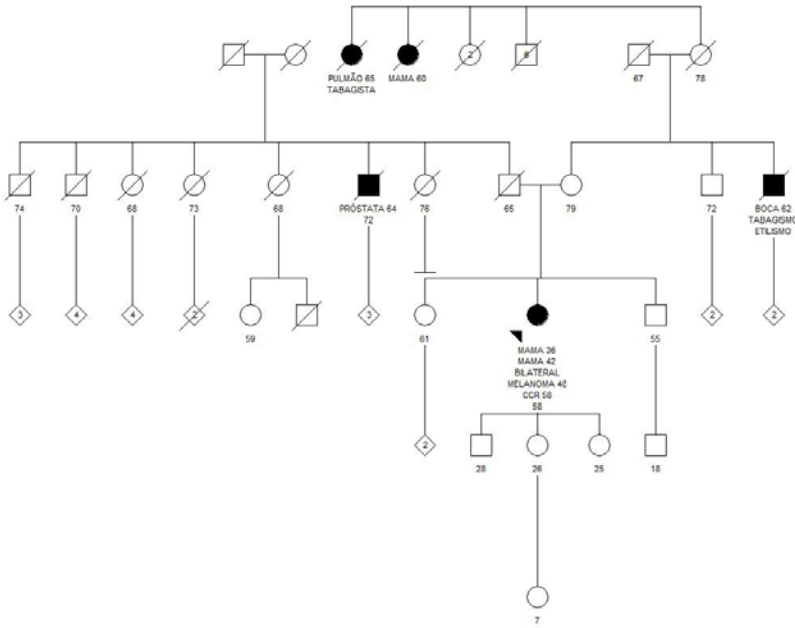
MT - 02



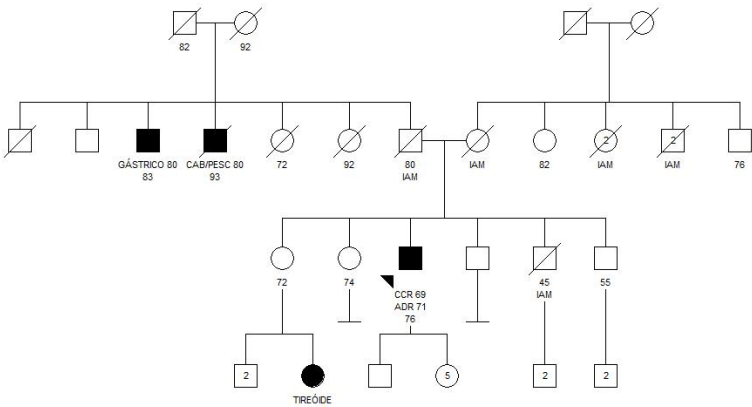
MT - 04



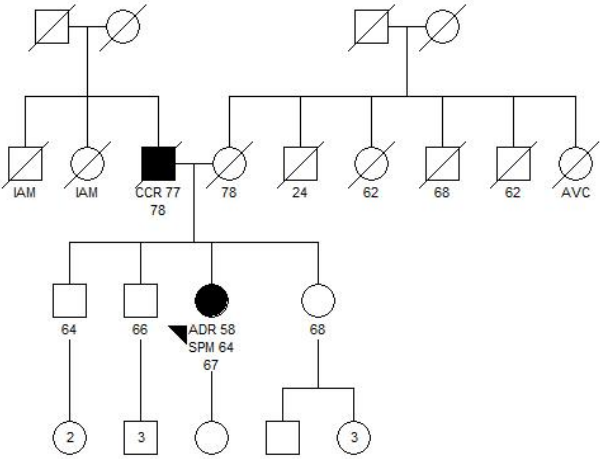
MT - 05



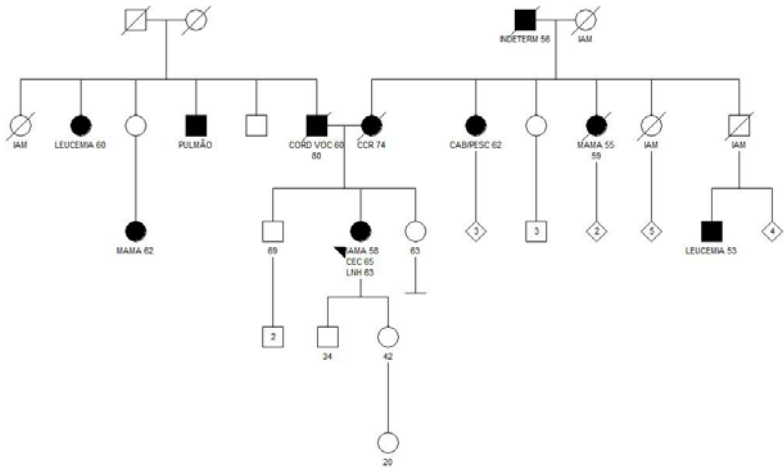
MT - 06



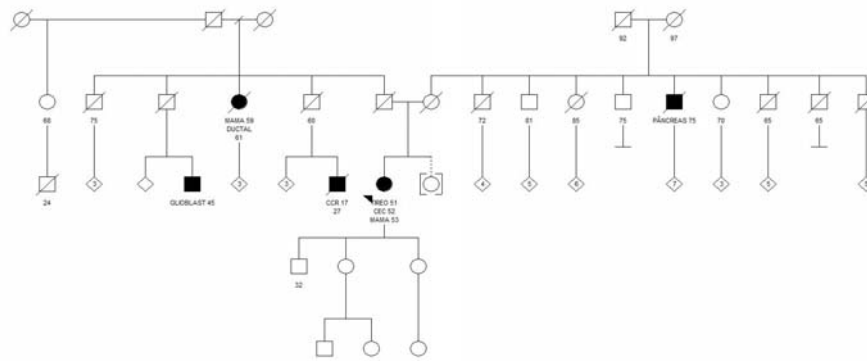
MT - 09



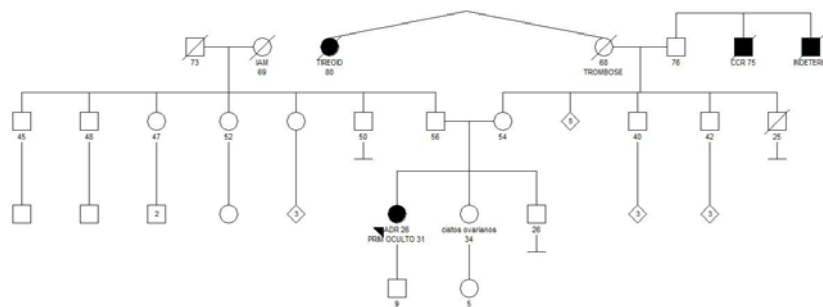
MT - 10



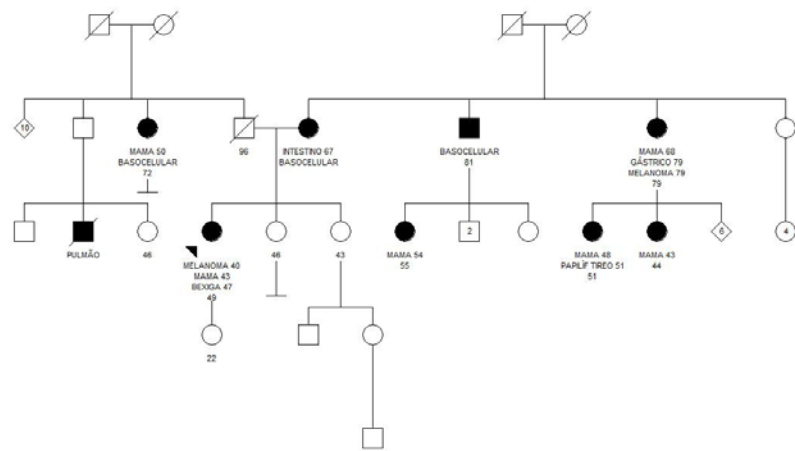
MT - 11



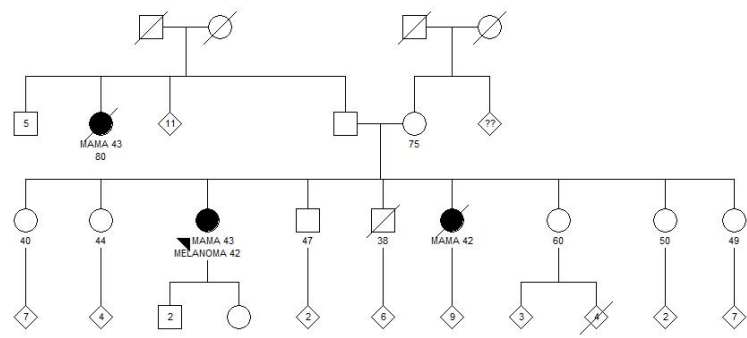
MT - 12



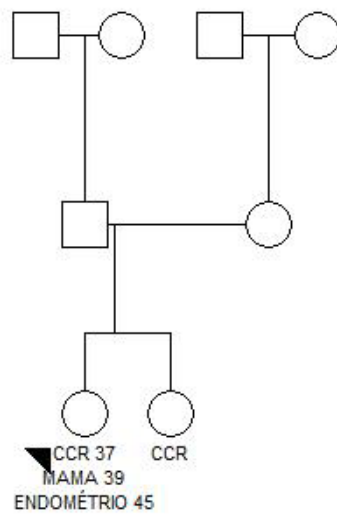
MT - 13



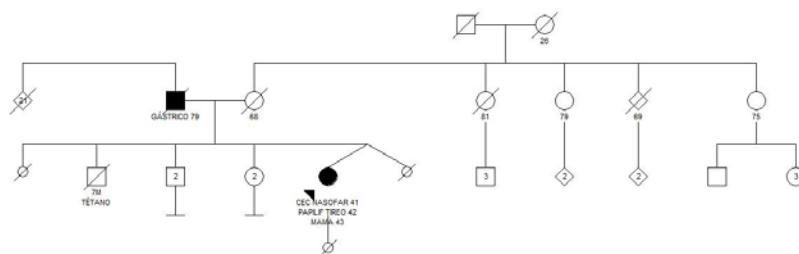
MT - 15



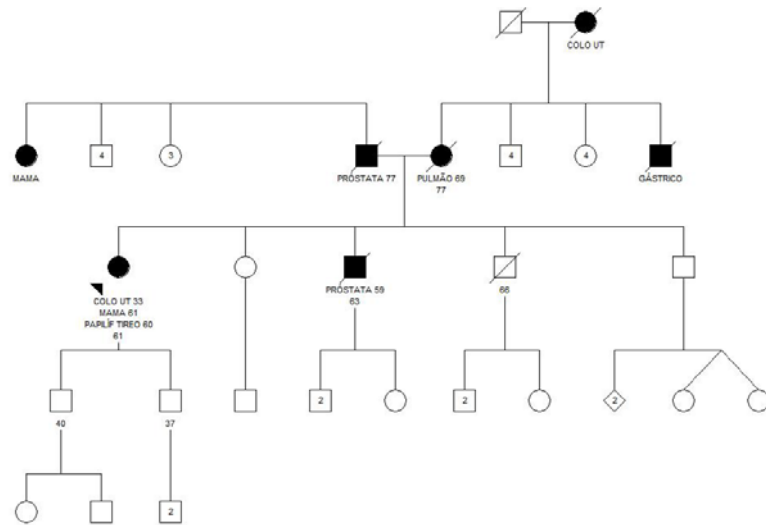
MT - 16



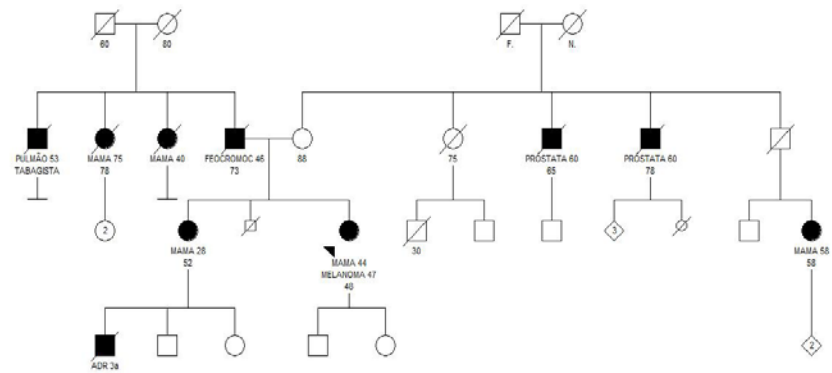
MT - 17



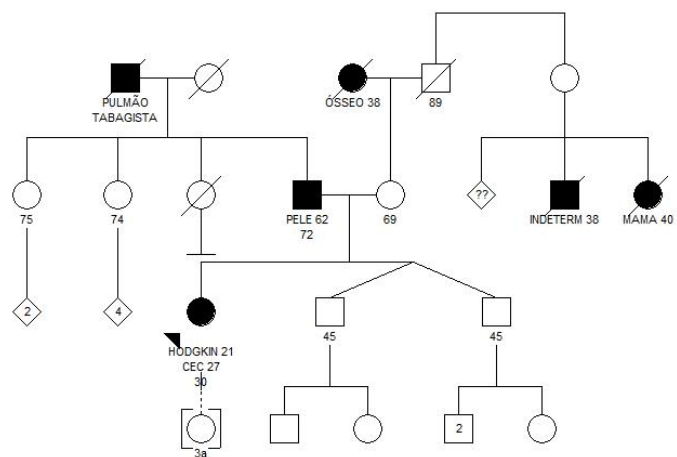
MT - 18



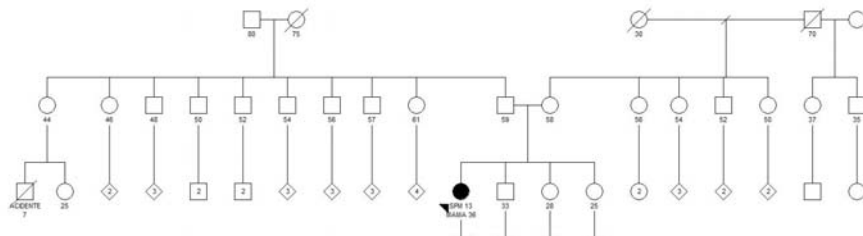
MT - 20 MP



MT - 21



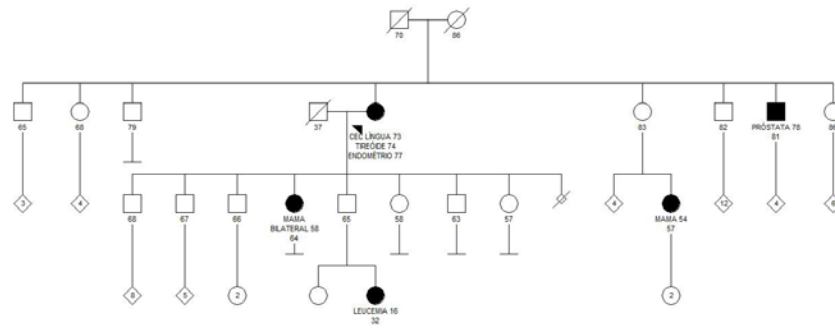
MT - 22



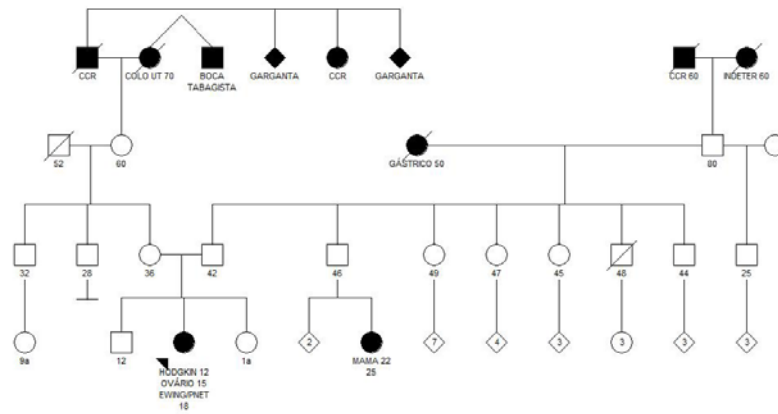
The pedigree chart illustrates the family history of the patient across three generations. Affected individuals are represented by black symbols. The chart shows inheritance of the disease across generations, with affected individuals in every generation.

- Generation I:**
 - Individuals 50 and 51 (unaffected) are parents of individuals 52, 53, 54, and 55.
 - Individuals 60 and 61 (unaffected) are parents of individuals 62, 63, 64, 65, 66, and 67.
- Generation II:**
 - Individuals 52, 53, 54, and 55 are the children of 50 and 51.
 - Individuals 62, 63, 64, 65, 66, and 67 are the children of 60 and 61.
- Generation III:**
 - Individuals 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177, 178, 179, 180, 181, 182, 183, 184, 185, 186, 187, 188, 189, 190, 191, 192, 193, 194, 195, 196, 197, 198, 199, 200, 201, 202, 203, 204, 205, 206, 207, 208, 209, 210, 211, 212, 213, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 220, 221, 222, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 230, 231, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240, 241, 242, 243, 244, 245, 246, 247, 248, 249, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 257, 258, 259, 260, 261, 262, 263, 264, 265, 266, 267, 268, 269, 270, 271, 272, 273, 274, 275, 276, 277, 278, 279, 280, 281, 282, 283, 284, 285, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 299, 300, 301, 302, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 314, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 321, 322, 323, 324, 325, 326, 327, 328, 329, 330, 331, 332, 333, 334, 335, 336, 337, 338, 339, 340, 341, 342, 343, 344, 345, 346, 347, 348, 349, 350, 351, 352, 353, 354, 355, 356, 357, 358, 359, 360, 361, 362, 363, 364, 365, 366, 367, 368, 369, 370, 371, 372, 373, 374, 375, 376, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 391, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 403, 404, 405, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 413, 414, 415, 416, 417, 418, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 432, 433, 434, 435, 436, 437, 438, 439, 440, 441, 442, 443, 444, 445, 446, 447, 448, 449, 450, 451, 452, 453, 454, 455, 456, 457, 458, 459, 460, 461, 462, 463, 464, 465, 466, 467, 468, 469, 470, 471, 472, 473, 474, 475, 476, 477, 478, 479, 480, 481, 482, 483, 484, 485, 486, 487, 488, 489, 490, 491, 492, 493, 494, 495, 496, 497, 498, 499, 500, 501, 502, 503, 504, 505, 506, 507, 508, 509, 510, 511, 512, 513, 514, 515, 516, 517, 518, 519, 520, 521, 522, 523, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534, 535, 536, 537, 538, 539, 540, 541, 542, 543, 544, 545, 546, 547, 548, 549, 550, 551, 552, 553, 554, 555, 556, 557, 558, 559, 560, 561, 562, 563, 564, 565, 566, 567, 568, 569, 570, 571, 572, 573, 574, 575, 576, 577, 578, 579, 580, 581, 582, 583, 584, 585, 586, 587, 588, 589, 590, 591, 592, 593, 594, 595, 596, 597, 598, 599, 600, 601, 602, 603, 604, 605, 606, 607, 608, 609, 610, 611, 612, 613, 614, 615, 616, 617, 618, 619, 620, 621, 622, 623, 624, 625, 626, 627, 628, 629, 630, 631, 632, 633, 634, 635, 636, 637, 638, 639, 640, 641, 642, 643, 644, 645, 646, 647, 648, 649, 650, 651, 652, 653, 654, 655, 656, 657, 658, 659, 660, 661, 662, 663, 664, 665, 666, 667, 668, 669, 670, 671, 672, 673, 674, 675, 676, 677, 678, 679, 680, 681, 682, 683, 684, 685, 686, 687, 688, 689, 690, 691, 692, 693, 694, 695, 696, 697, 698, 699, 700, 701, 702, 703, 704, 705, 706, 707, 708, 709, 710, 711, 712, 713, 714, 715, 716, 717, 718, 719, 720, 721, 722, 723, 724, 725, 726, 727, 728, 729, 730, 731, 732, 733, 734, 735, 736, 737, 738, 739, 740, 741, 742, 743, 744, 745, 746, 747, 748, 749, 750, 751, 752, 753, 754, 755, 756, 757, 758, 759, 760, 761, 762, 763, 764, 765, 766, 767, 768, 769, 770, 771, 772, 773, 774, 775, 776, 777, 778, 779, 780, 781, 782, 783, 784, 785, 786, 787, 788, 789, 790, 791, 792, 793, 794, 795, 796, 797, 798, 799, 800, 801, 802, 803, 804, 805, 806, 807, 808, 809, 810, 811, 812, 813, 814, 815, 816, 817, 818, 819, 820, 821, 822, 823, 824, 825, 826, 827, 828, 829, 8

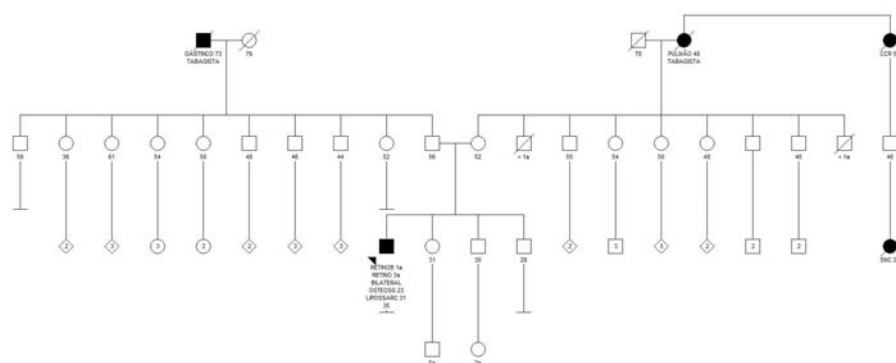
MT - 26



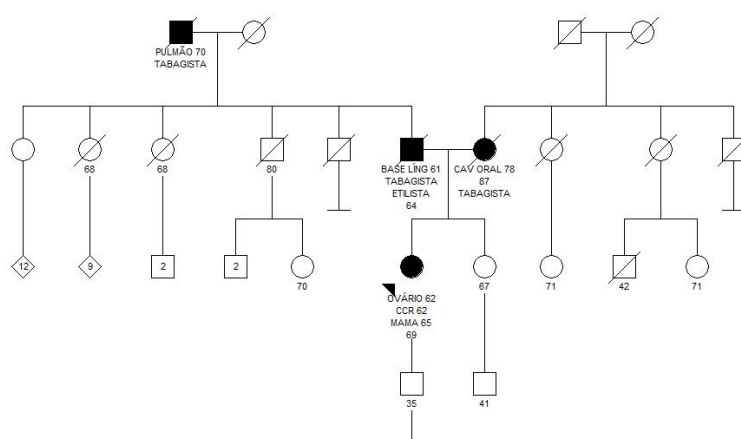
MT - 26

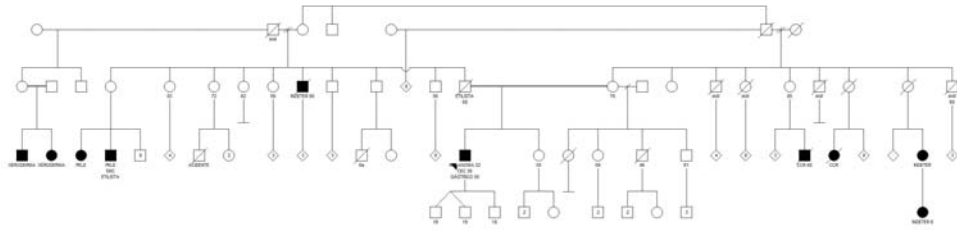
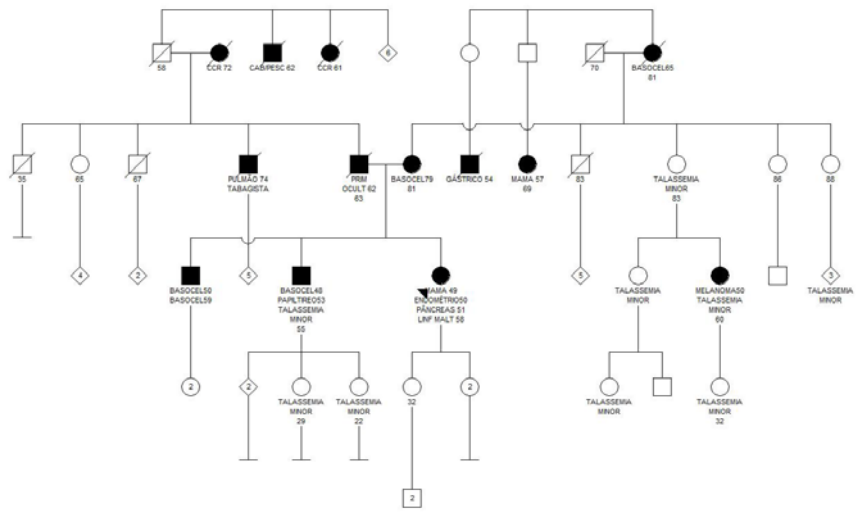


MT-27

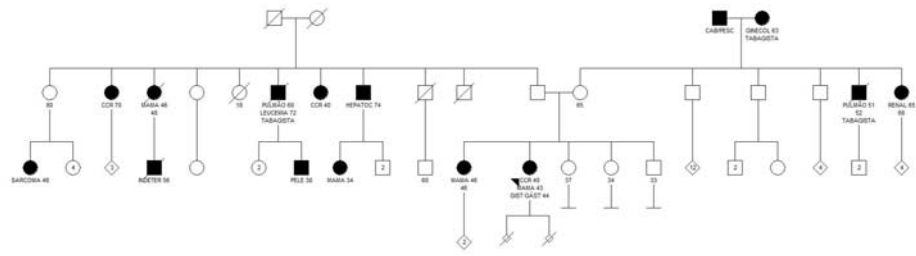


MT - 28

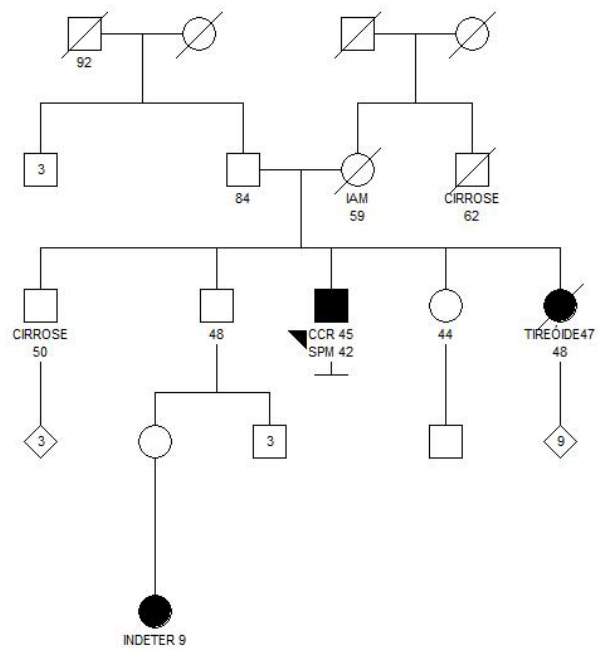




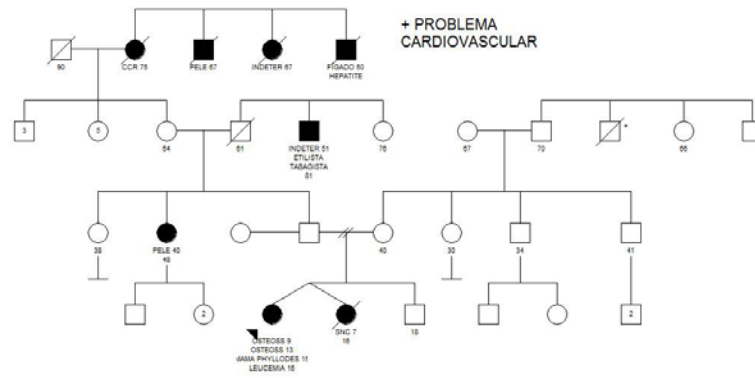
MT - 32



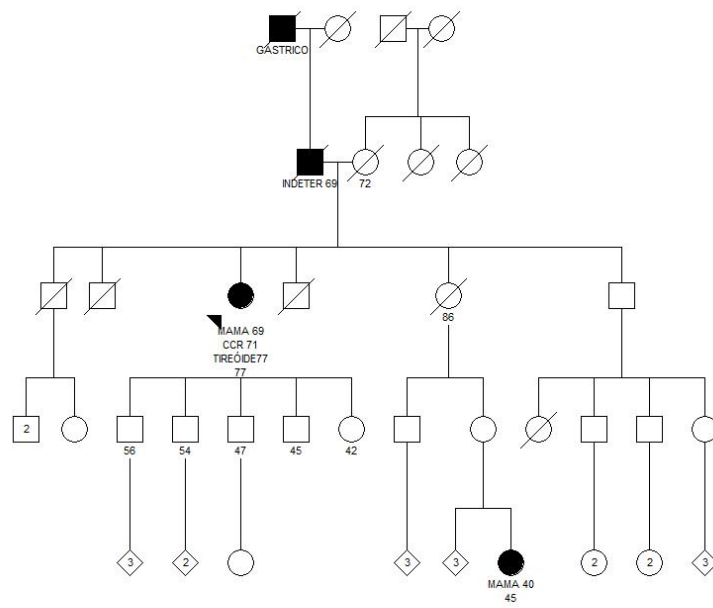
MT - 33



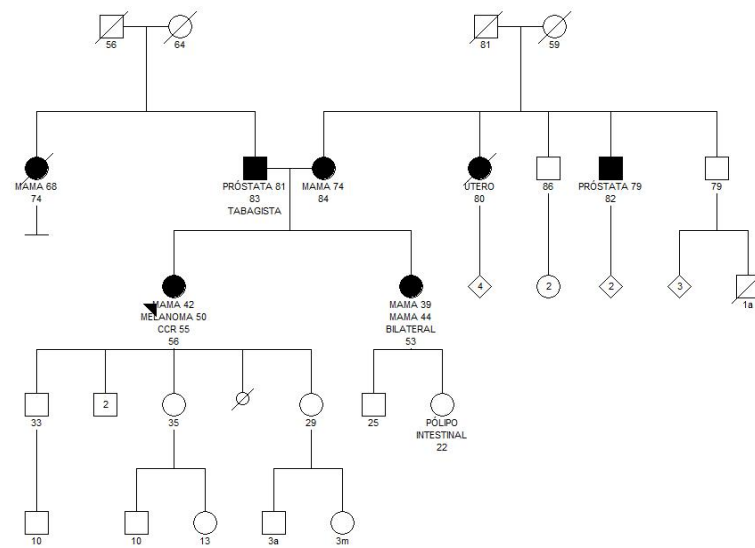
MT - 39



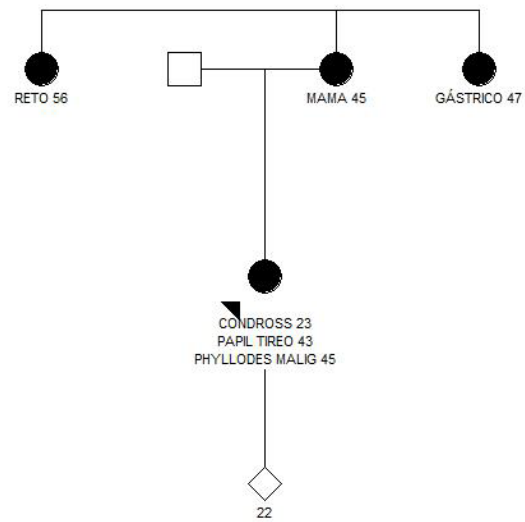
MT - 39



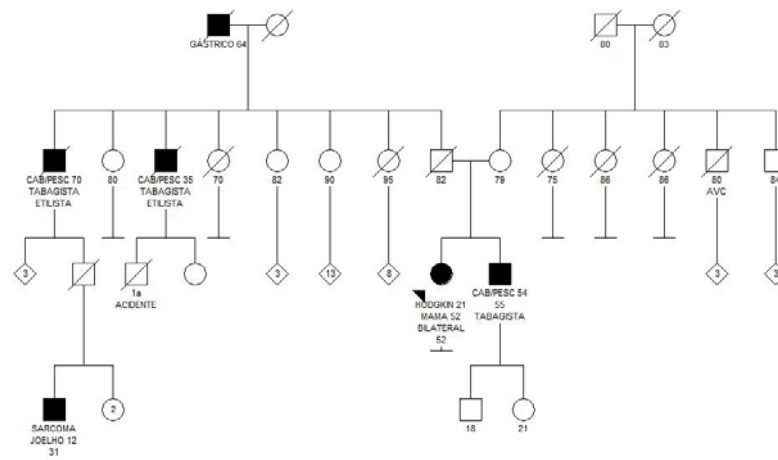
MT - 42



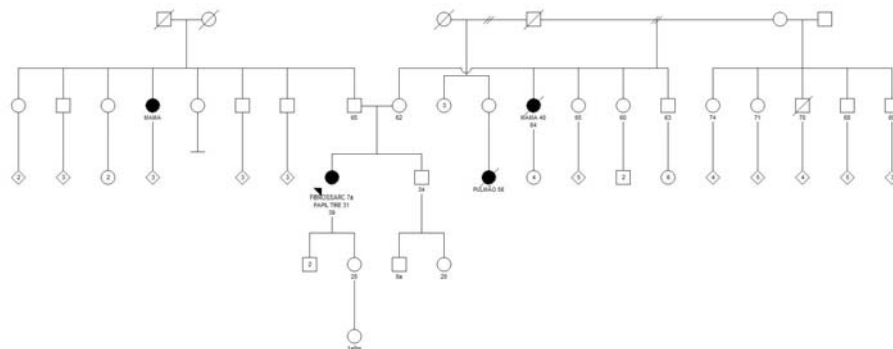
MT - 43 MP



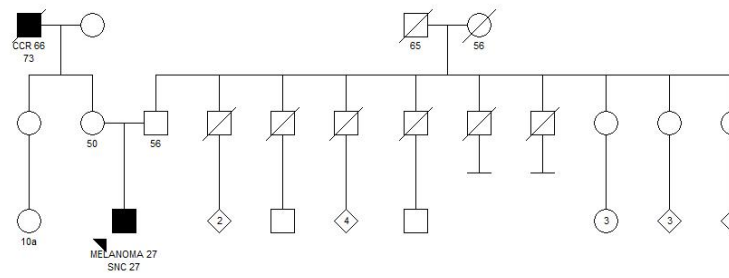
MT - 45



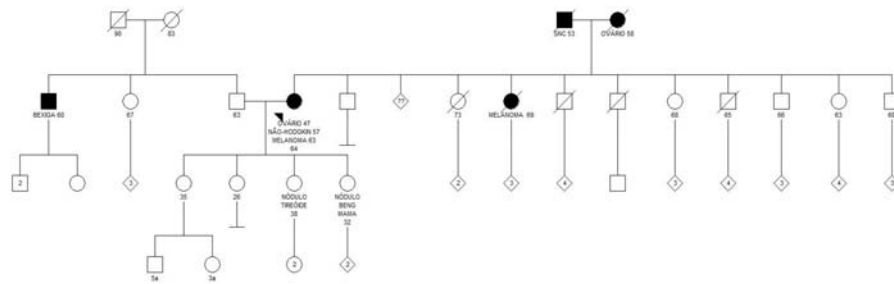
MT - 48



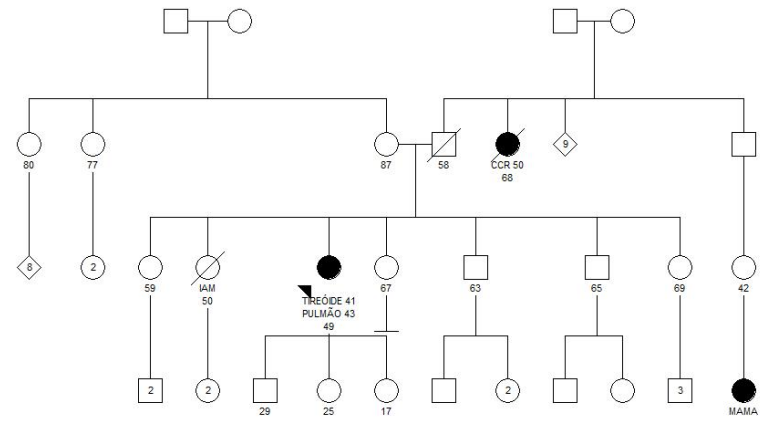
MT - 49



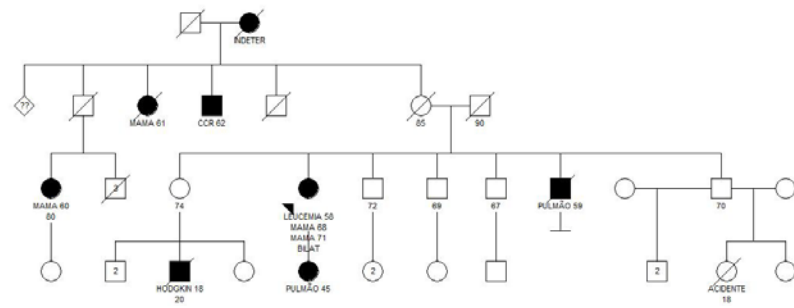
MT - 52



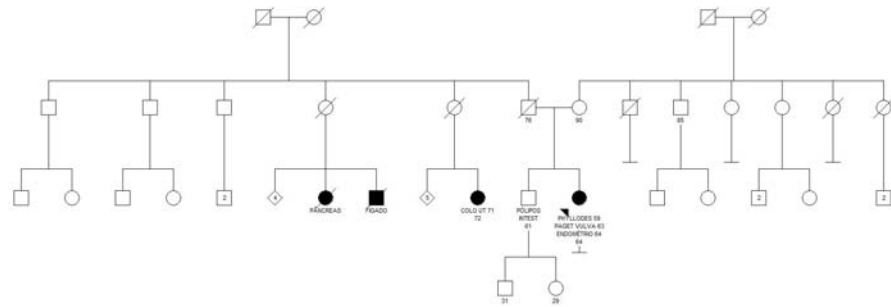
MT - 54



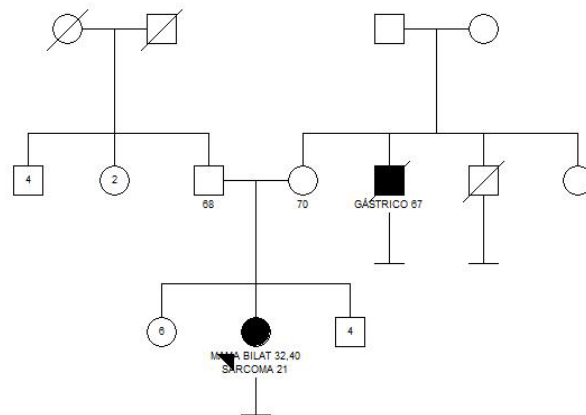
MT - 55

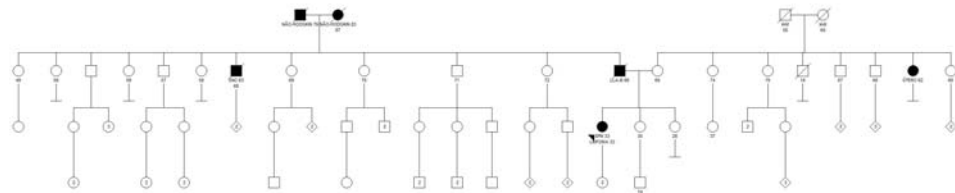


MT - 56

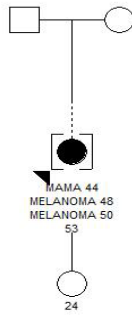


MT - 57 MP

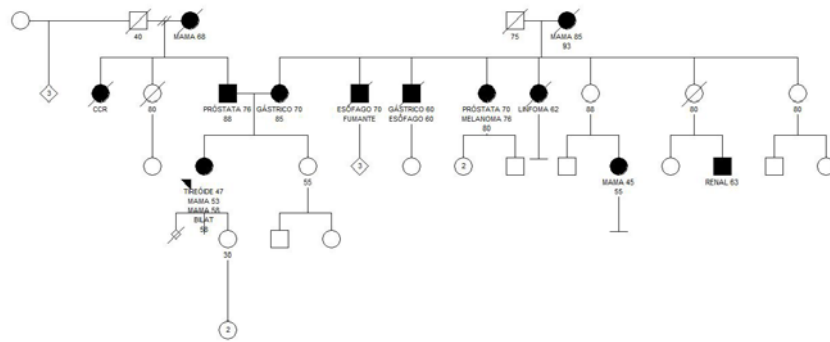




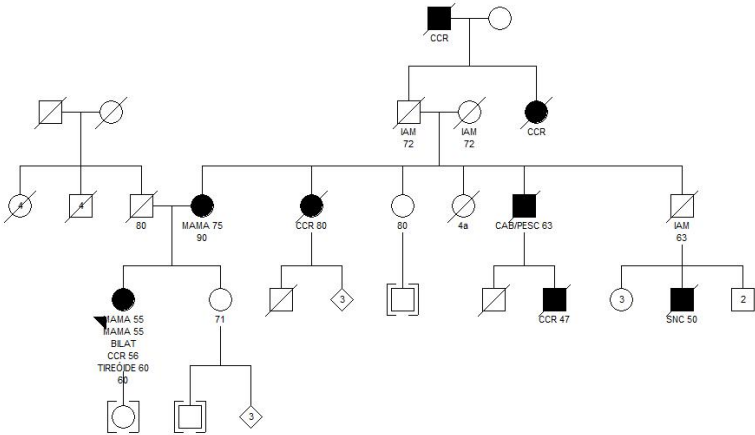
MT - 62



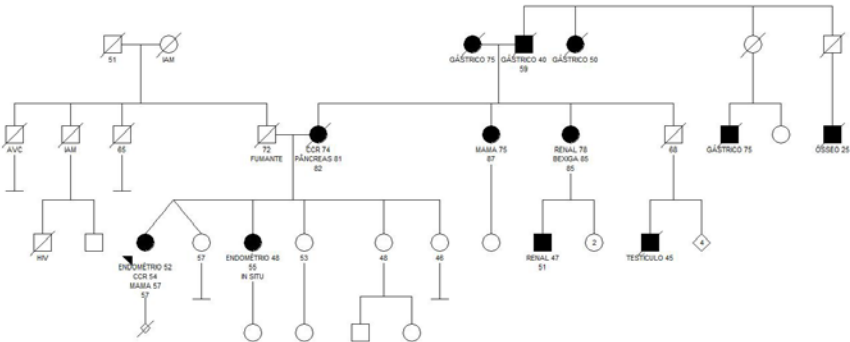
MT - 66



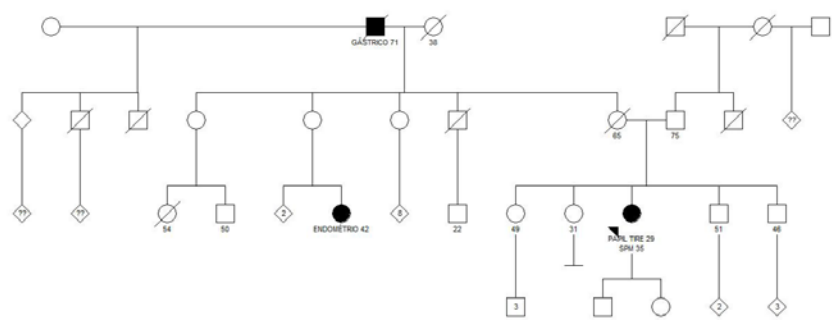
MT - 67



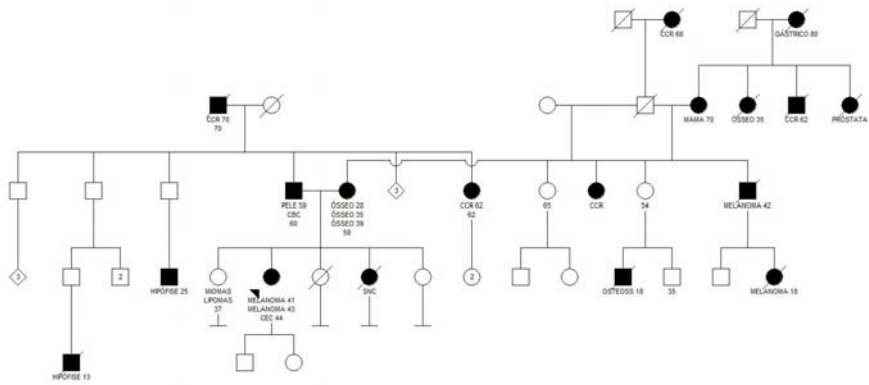
MT - 70



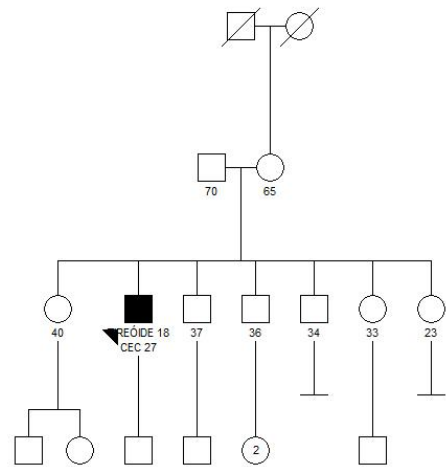
LFS 217



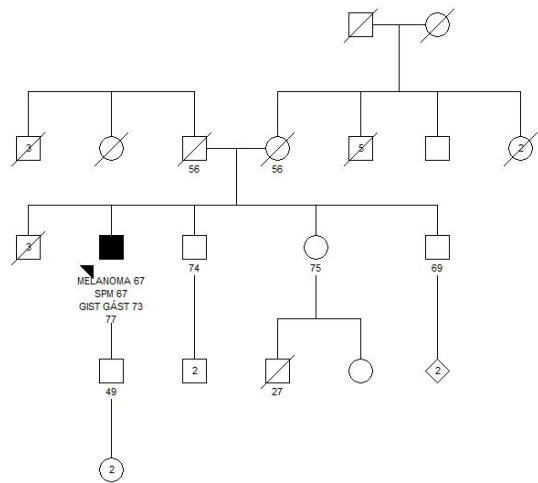
LFS 231

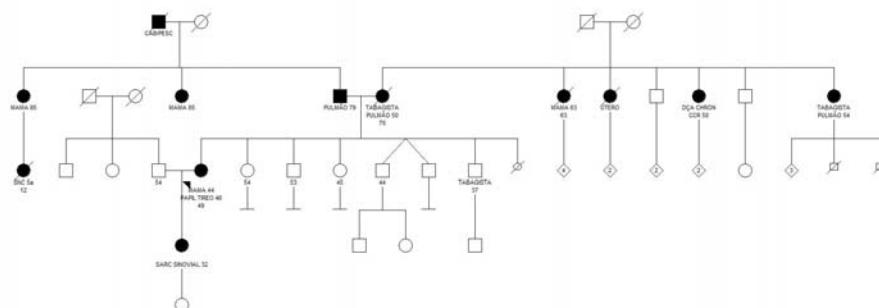
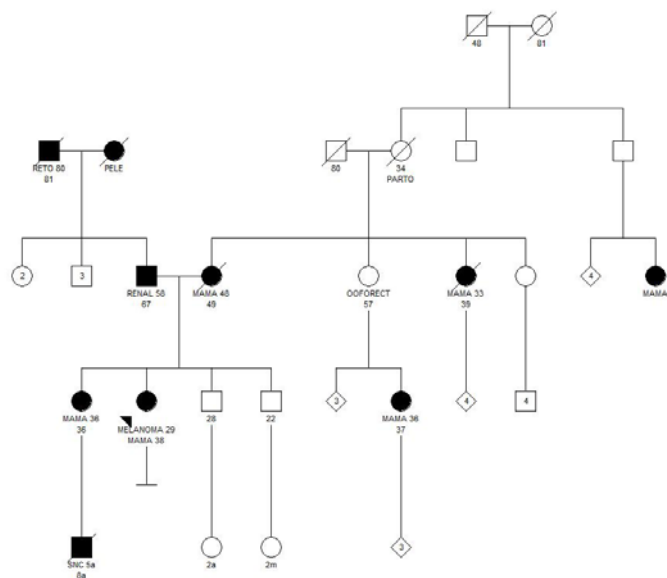


LFS 293



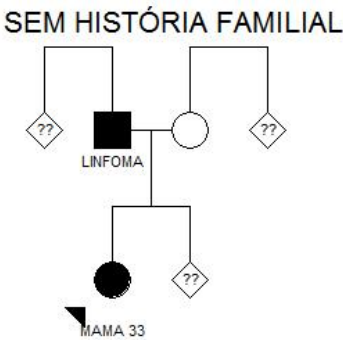
LFS 322



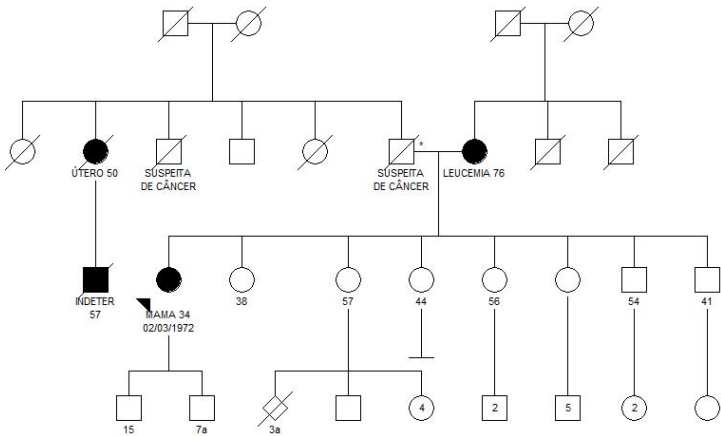


Anexo 5 - Heredogramas grupo CM

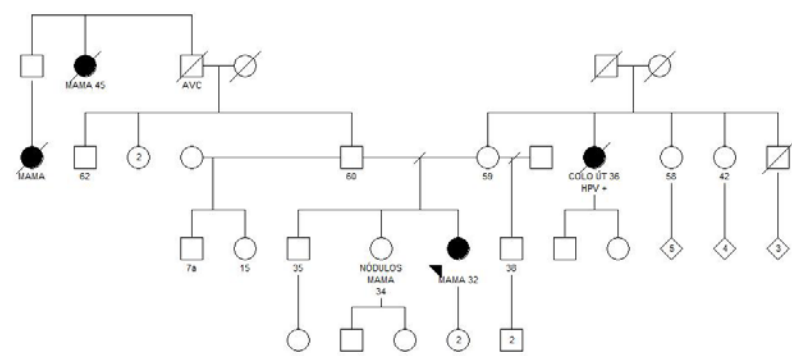
MJ01001T



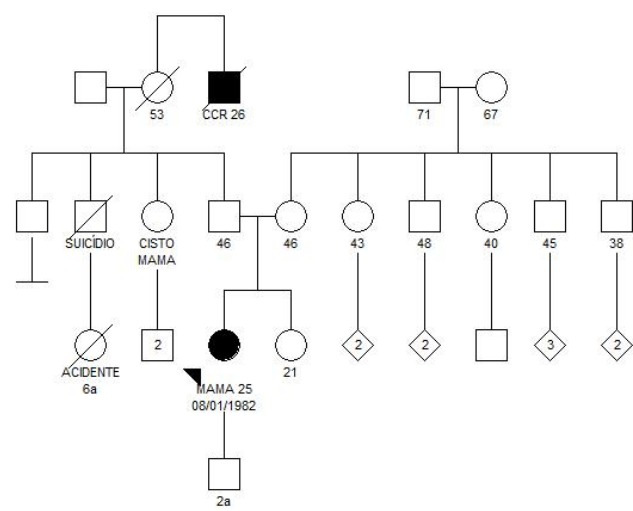
MJ01004T



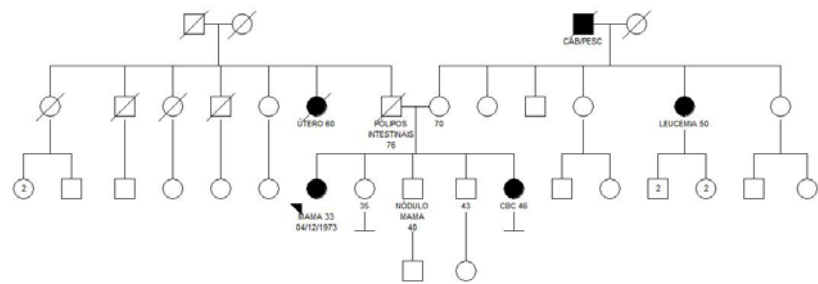
MJ01006T



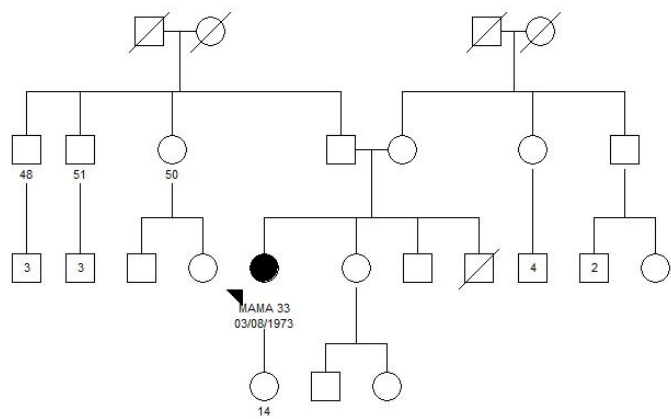
MJ01007T



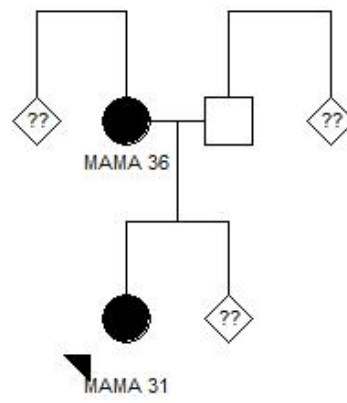
MJ01008T



MJ01009T

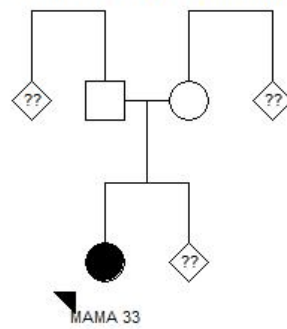


MJ01010T



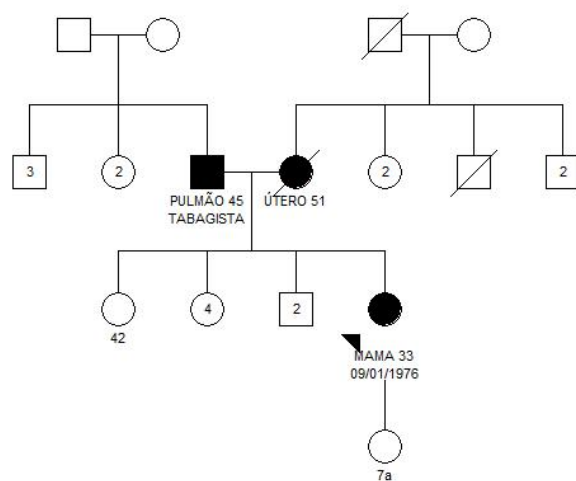
MJ01011T

SEM HISTÓRIA FAMILIAL

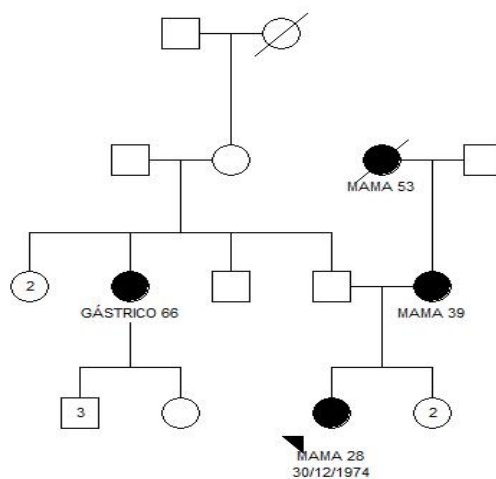


MJ01014T

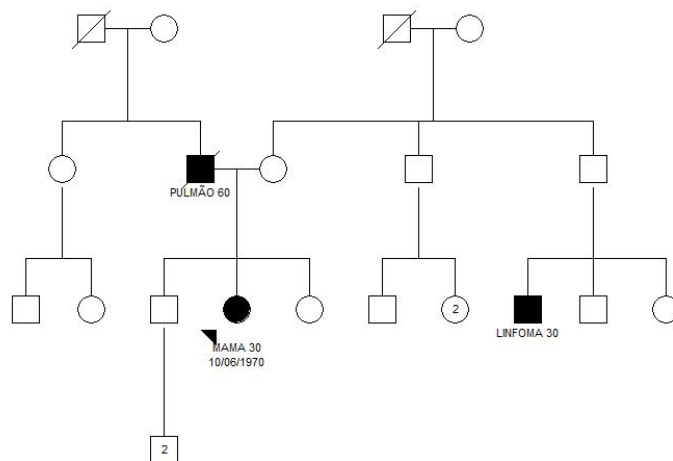
MJ01015T



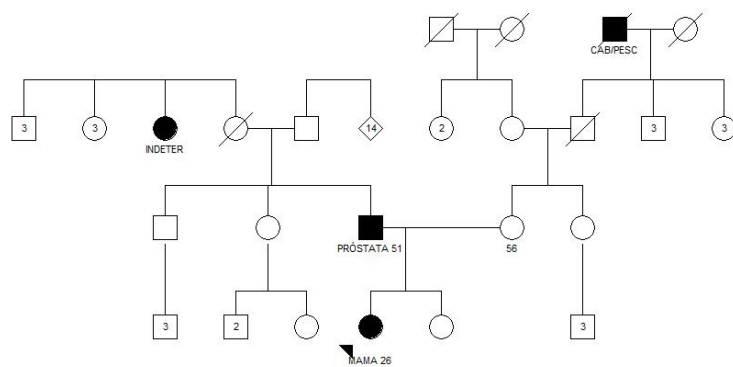
MJ02001T



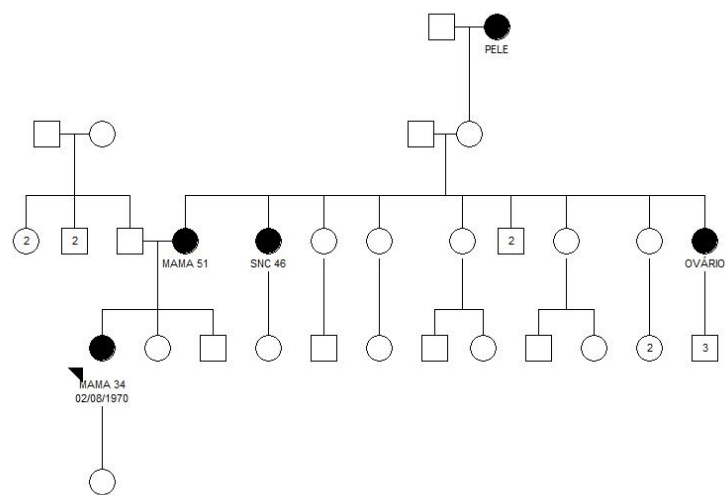
MJ02002T



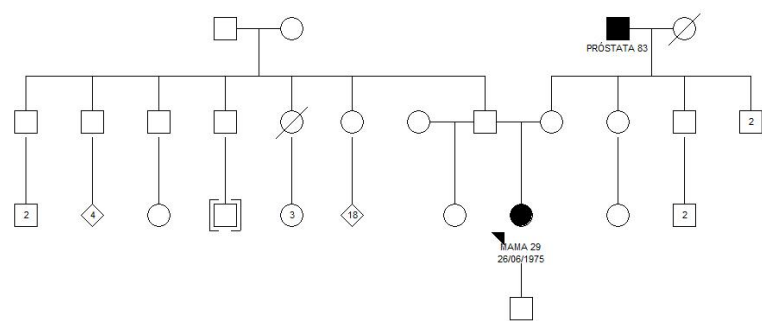
MJ02003T



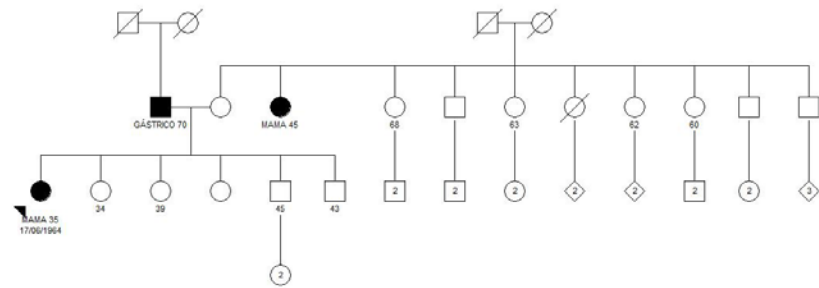
MJ02004T



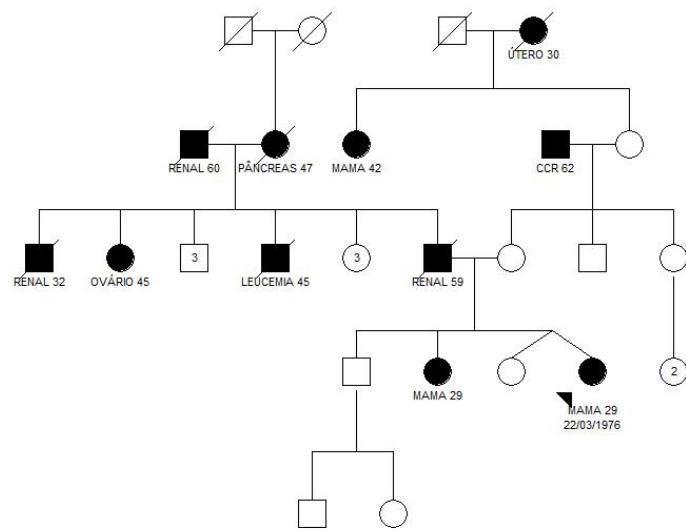
MJ02005T



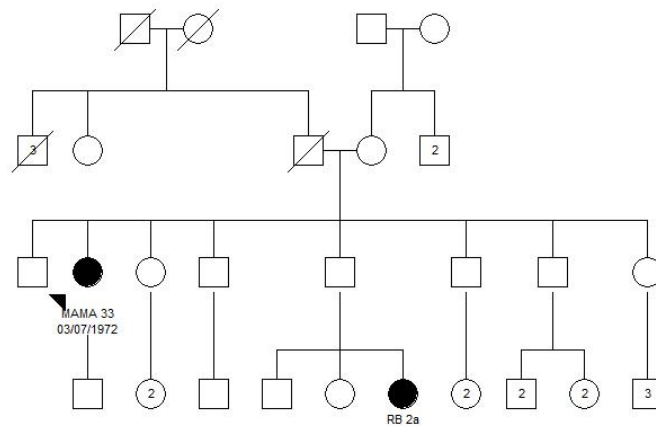
MJ02006T



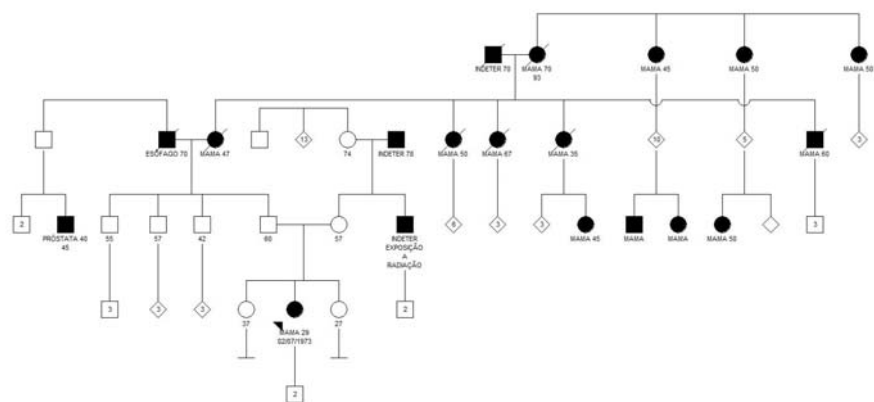
MJ02007T



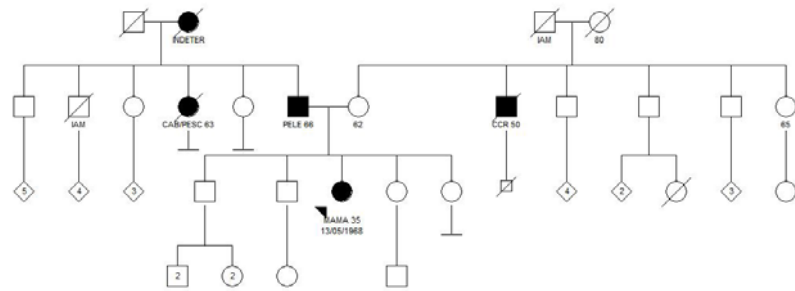
MJ02008T



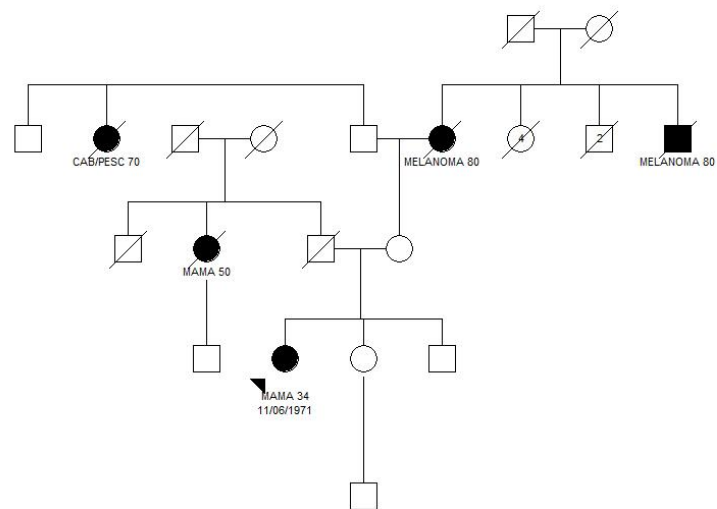
MJ02013T



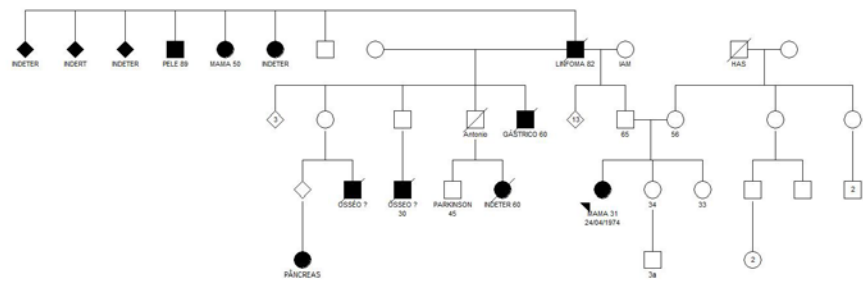
MJ02014T



MJ02015T

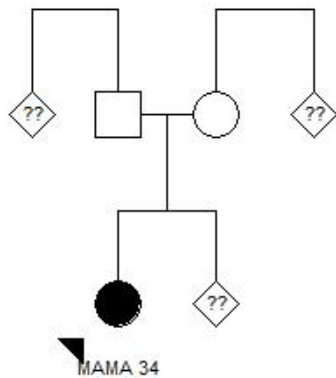


MJ02016T

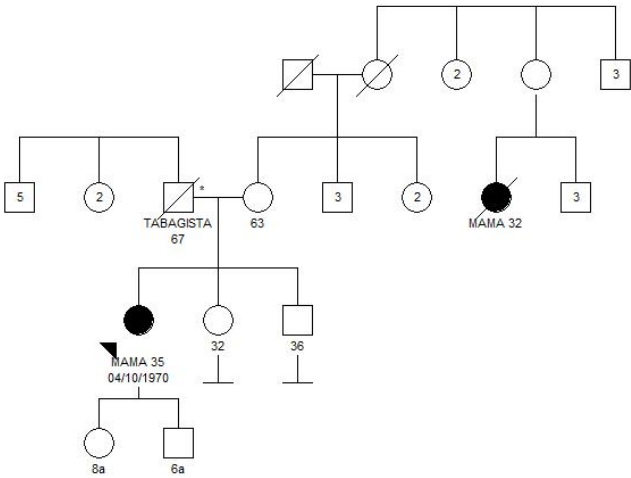


MJ02019T

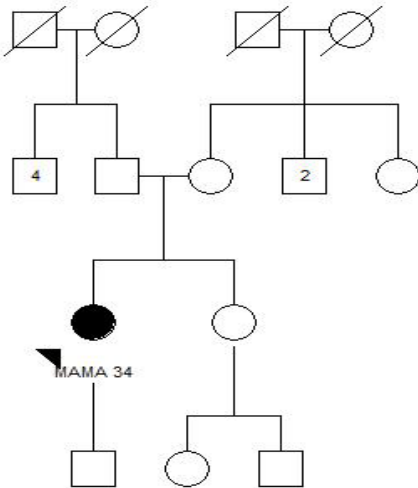
SEM HISTÓRIA FAMILIAL



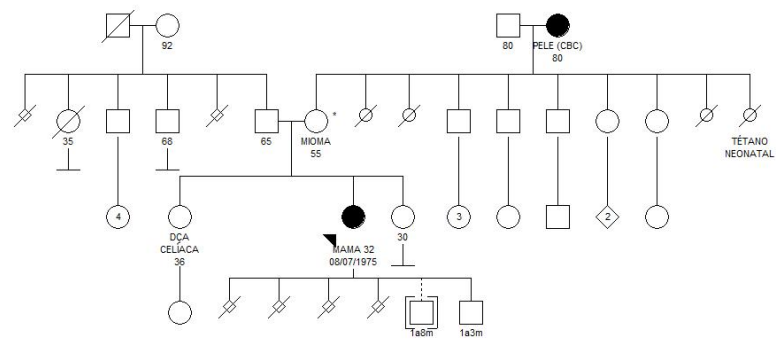
MJ02024T



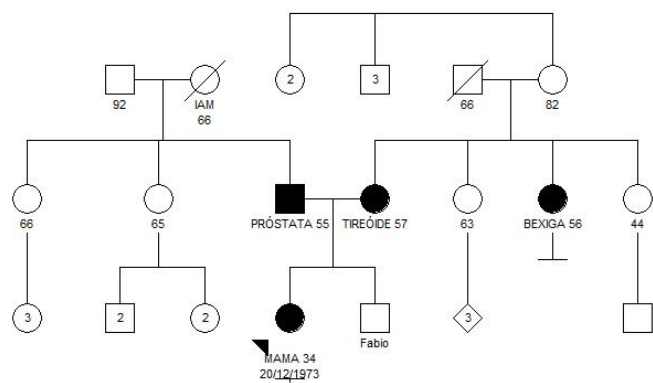
MJ02027T



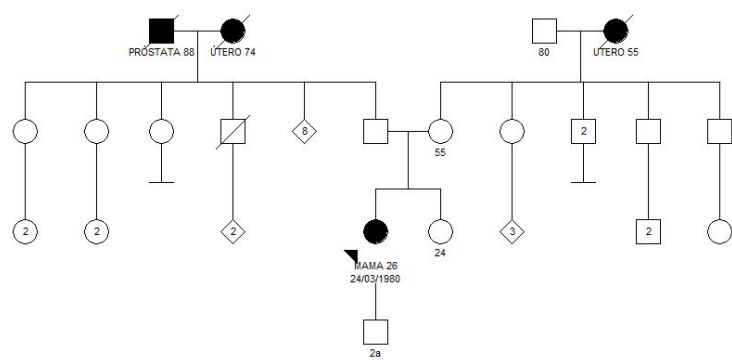
MJ02028T



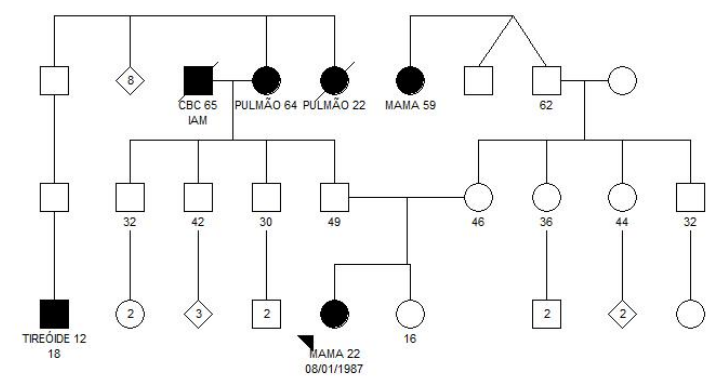
MJ02033T



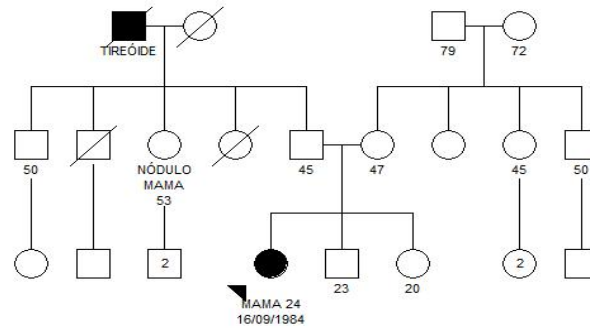
MJ02036T



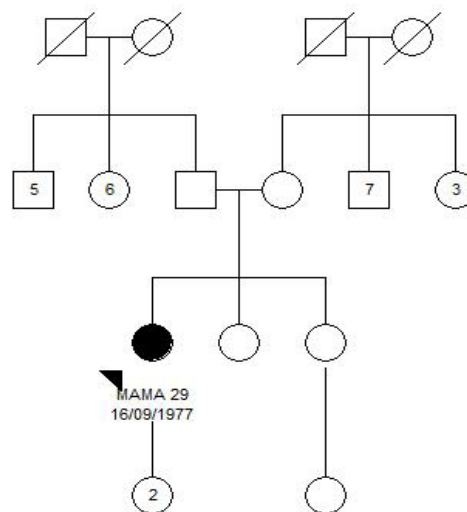
MJ02038T



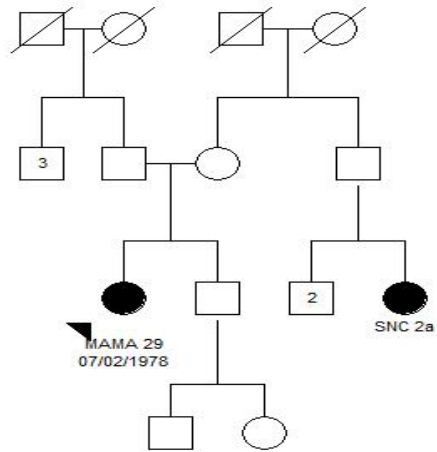
MJ02039T



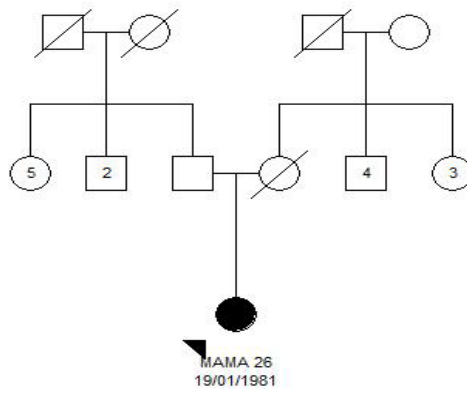
MJ04005T



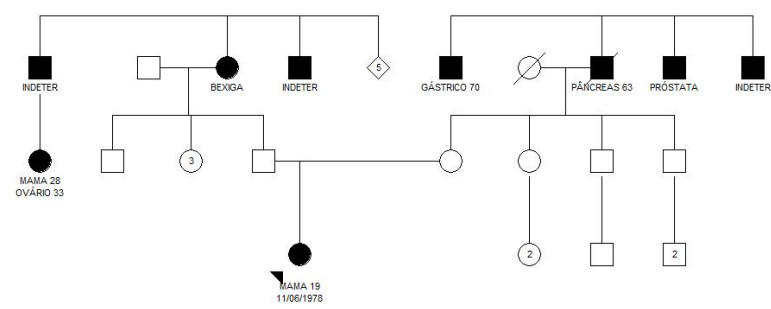
MJ04011T



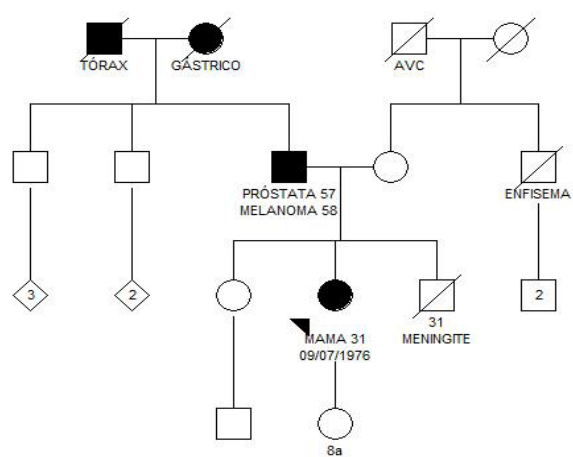
MJ04012T



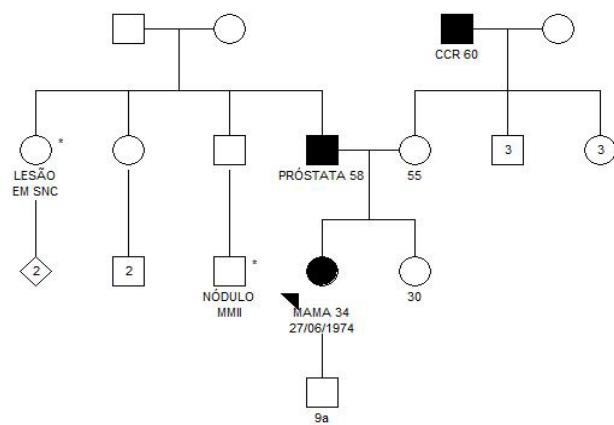
MJ04013T



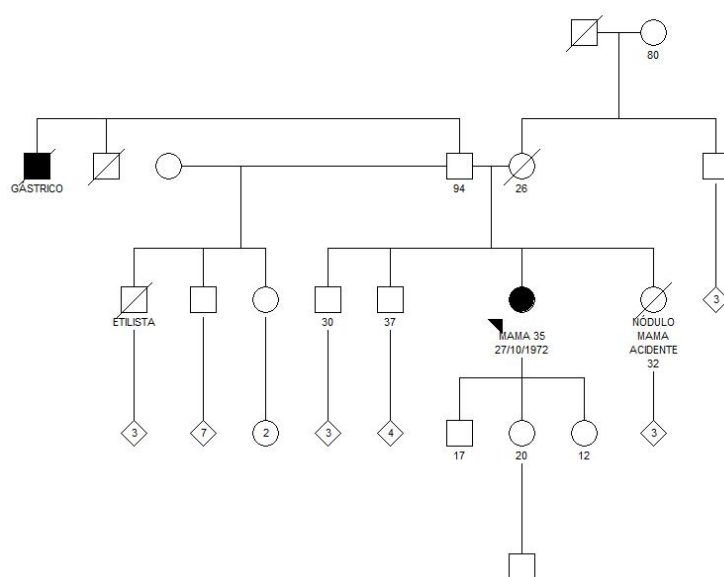
MJ04015T



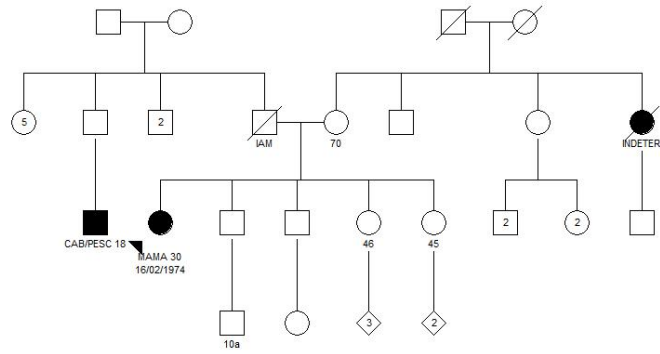
MJ04019T



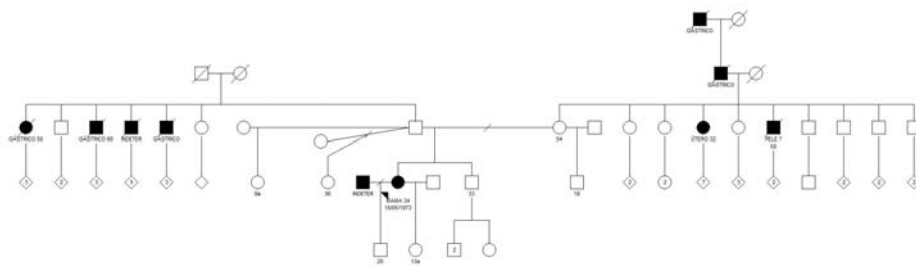
MJ04020T



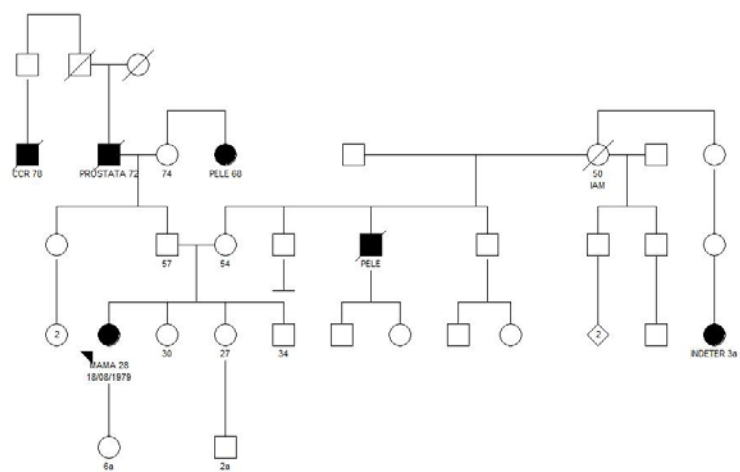
MJ04025T



MJ04027T

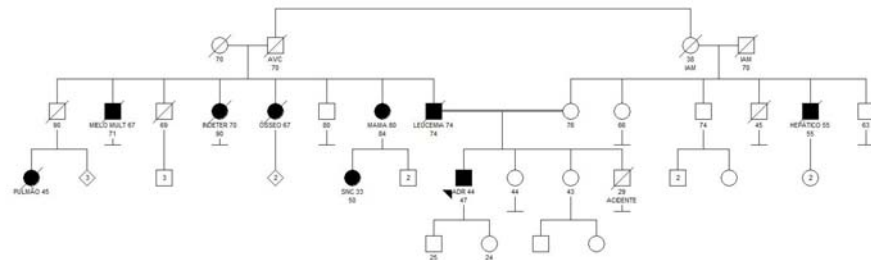


MJ04028T

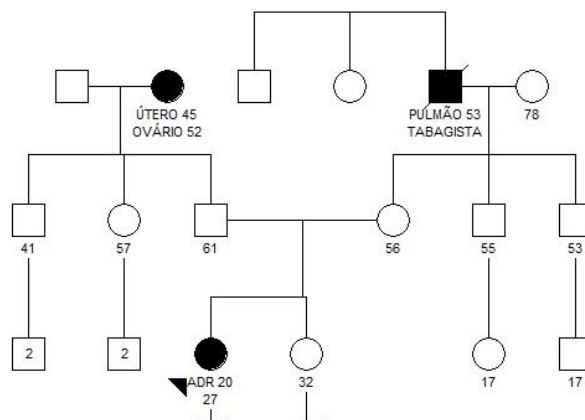


Anexo 6 – Heredogramas grupo ADR

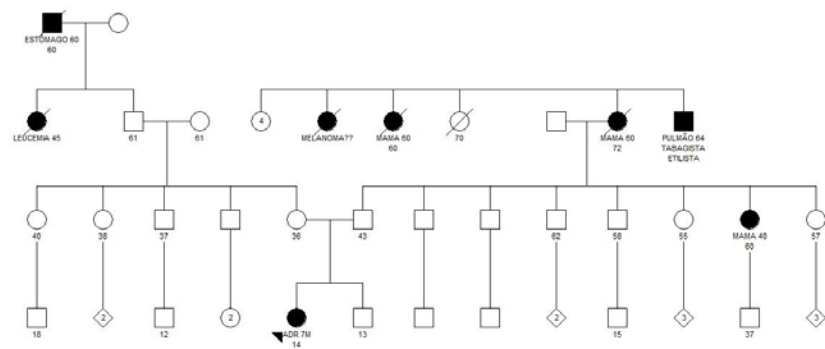
MT - 07 ADR



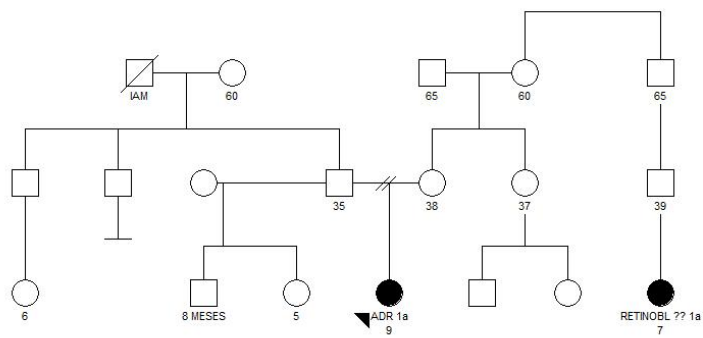
MT - 08



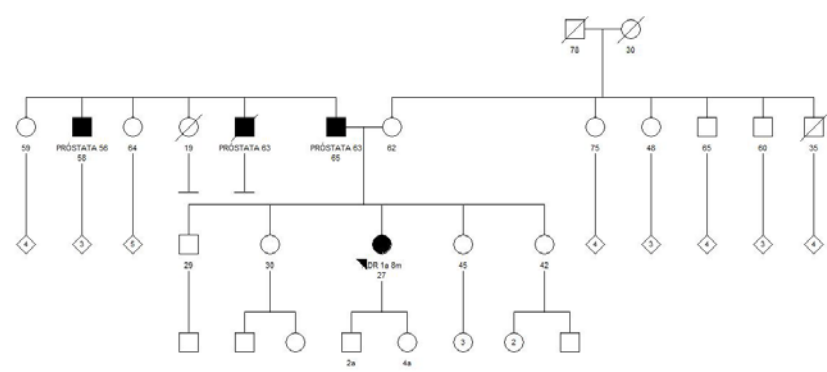
MT - 14 ADR



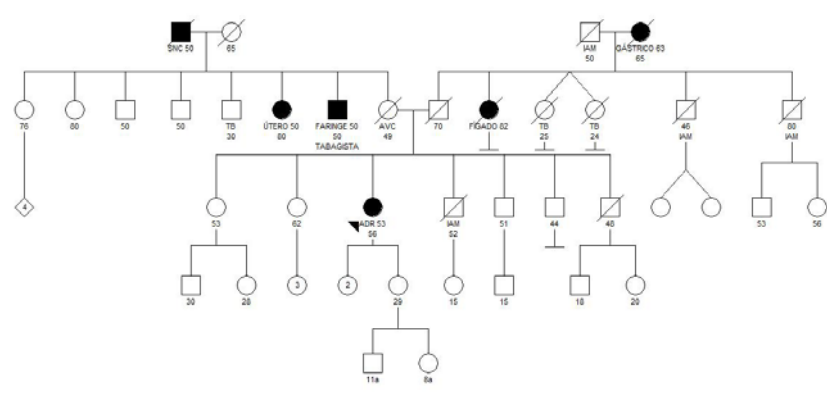
MT - 19 ADR



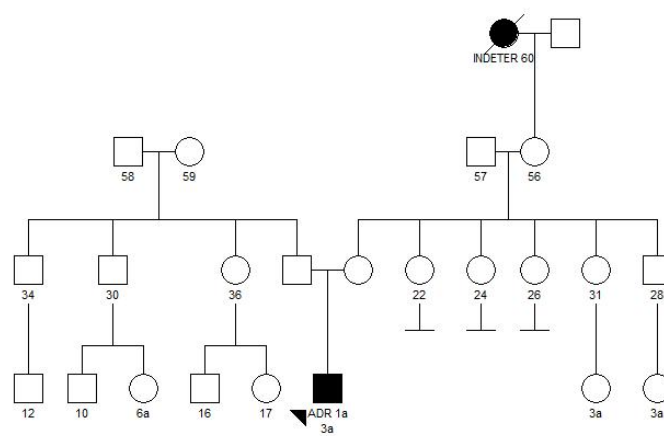
MT - 34 ADR



MT - 41 ADR

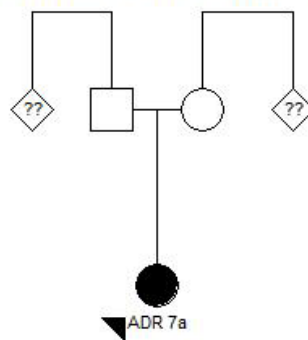


MT - 44 ADR



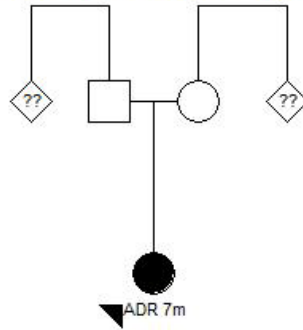
MT - 63

SEM HISTÓRIA FAMILIAL

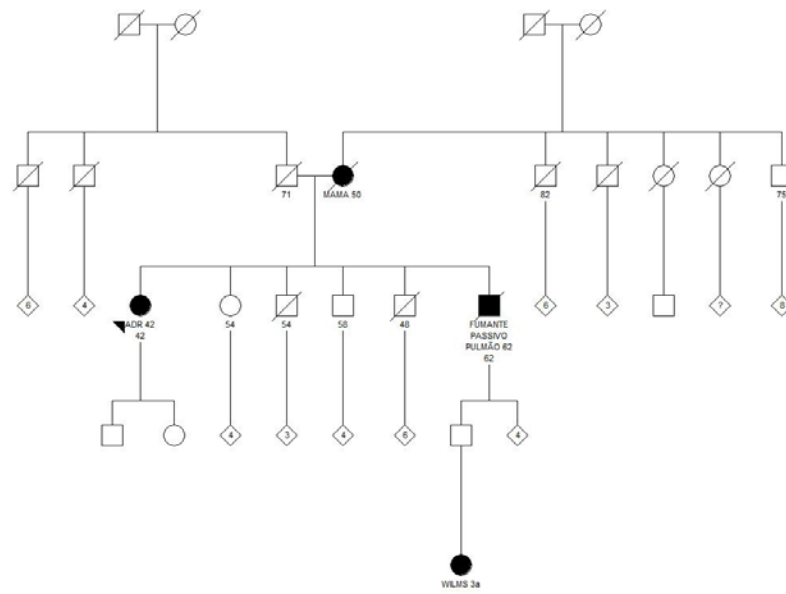


MT - 65

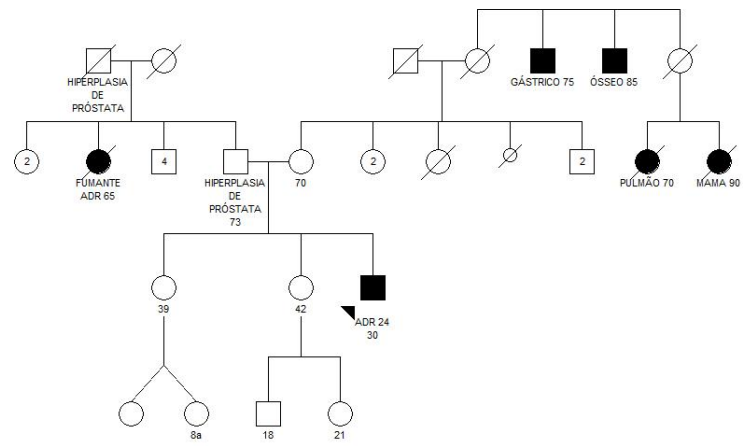
SEM HISTÓRIA FAMILIAL



LFS 256 ADR



LFS 288 ADR



Anexo 7 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 12 de Novembro de 2009.

À
Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1305/09

“Diagnóstico molecular da mutação germinativa R337H no gene TP53 em pacientes portadores de múltiplos tumores primários ou tumores isolados típicos da Síndrome de Li-Fraumeni”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/11/2009, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 22/09/2009, **aprovaram** a realização do projeto em referência datado de 26 de outubro de 2009, o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre o plano de Recrutamento dos Sujeitos de Pesquisa, Circunstâncias e Responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração sobre Uso e destino do Material Biológico, Publicação dos Dados Propriedades das Informações Geradas;
- Declaração de Infra Estrutura e Instalações;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro de Pesquisa;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Banco de Macromoléculas.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 06 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO

Projeto: 1305/09

Título: "Diagnóstico molecular da mutação germinativa R337H no gene *TP53* em pacientes portadores de múltiplos tumores primários ou tumores isolados típicos da Síndrome de Li-Fraumeni".

Pesquisador Responsável: Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz

Co-Pesquisadora: Ana Cristina Victorino Krepschi dos Santos

Aluna: Marina de Camargo Cannavan

Patrocinador: Será submetido à FAPESP

Comentários gerais:

Neste estudo é proposta a análise da alteração R337H do gene *TP53* em 100 casos selecionados segundo critérios recentemente publicados para inclusão de pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni. O projeto de mestrado tem fundamentação científica adequada e objetivos claramente apresentados. Trata-se de uma continuidade da linha de pesquisa da orientadora deste projeto.

Pendências apontadas em parecer anterior:

1. Recomenda-se a padronização do nome dos genes e proteínas ao longo do texto;
2. Os dados apresentados no item 1.3.3 são incoerentes aos apresentados inicialmente (o qual apresenta referências muito mais atuais do que as mencionadas neste item);
3. Inclusão do método de análise do produto sequenciado;
4. Adequação do título;
5. Os critérios de inclusão não estão claros;
6. Não foram apresentados os critérios de exclusão;
7. Adequação do TCLE.

Análise da Comissão de Ensino e Pesquisa – CENP: Aprovado.

Comentários Finais:

Após análise das respostas aos questionamentos apontados em parecer anterior, consideramos que todas as pendências foram atendidas. Portanto, decidimos pela aprovação final do projeto em referência.

Parecer Final:

Projeto Aprovado


FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE
Hospital do Câncer A. C. Camargo
Comitê de Ética em Pesquisa
Prof. Dr. Luiz Paulo Kwalek

Anexo 8 - Pôster apresentado na American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2011 (2-6 Abril)

