

**AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO
TELOMÉRICO EM PORTADORES DA SÍNDROME
DE LI-FRAUMENI**

KELVIN CÉSAR DE ANDRADE

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

Área de Concentração: Oncologia

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

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Andrade, Kelvin César de

Avaliação do comprimento telomérico em portadores da síndrome de Li-Fraumeni / Kelvin César de Andrade – São Paulo, 2016.

82p.

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. TELÔMERO. 2. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI. 3. MUTAÇÃO EM LINHAGEM GERMINATIVA.

"Um homem precisa viajar. Por sua conta, não por meio de histórias, imagens, livros ou TV. Precisa viajar por si, com seus olhos e pés, para entender o que é seu. Para um dia plantar as suas árvores e dar-lhes valor. Conhecer o frio para desfrutar o calor. E o oposto. Sentir a distância e o desabrigo para estar bem sob o próprio teto. Um homem precisa viajar para lugares que não conhece para quebrar essa arrogância que nos faz ver o mundo como o imaginamos, e não simplesmente como é ou pode ser; que nos faz professores e doutores do que não vimos, quando deveríamos ser alunos, e simplesmente ir ver."

Amyr Klink

DEDICATÓRIA

À minha mãe Ana de Andrade, por seu amor e apoio incondicional e por toda a compreensão do futuro e profissão que escolhi.

Ao meu pai Márcio de Andrade (*in memoriam*), grande incentivador do meu interesse em pesquisas relacionadas ao câncer.

A todos os meus parentes, por todo o apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz, por todo o apoio, paciência e ensinamentos durante estes últimos quatro anos. Agradeço por ter me oferecido a oportunidade de trabalhar com um projeto tão enriquecedor.

À minha supervisora no exterior, Sharon A. Savage, por ter me aceitado em seu grupo e me ajudado com o desenvolvimento deste projeto.

A todas as famílias incluídas neste protocolo, pelo reconhecimento da importância desta pesquisa.

Às minhas amigas do laboratório de Oncogenética, Karina Santiago, Fernanda Fortes, Lisley Mambelli e Renata Tunhosolo, por toda a ajuda, ensinamentos e companheirismo.

Aos meus amigos do grupo Neogene, Maísa, Carol, Fábio, Graziella, Luisa, Priscila, André Rolando e André dentista, por toda a amizade.

À equipe do Departamento de Oncogenética do A.C. Camargo Cancer Center, Gisleine Siqueira, Andréia Veloso, Amanda Nóbrega, Dra. Nirvana, Dra. Rima, Dr. Alexandre e Dra. Daniele Paixão.

À Mila Oasan, minha "*host mom and lunch buddy*", por ter me ajudado desde o início com a minha adaptação no exterior.

A todos os integrantes do grupo do Clinical Genetics Branch, por todos os ensinamentos e por terem me integrado ao grupo da melhor forma possível. Em especial a Dra. Shahinaz Gadalla e Phuong Mai.

À Ana Best, bioestatística do National Cancer Institute, por todos os ensinamentos e pela colaboração no manuscrito.

Aos amigos que fiz durante o meu período nos EUA, especialmente o Luiz Felipe Barella, Amanda Amaral e Carlos Oliveira.

Aos funcionários, técnicos e alunos dos laboratórios *DNA Extraction and Staging* e do *Core Genomics Research*, por todo o empenho e esforço em me ensinar os experimentos laboratoriais.

Às funcionárias do Banco de Macromoléculas, em especial a Louise Motta, pela ajuda em relação às amostras biológicas utilizadas.

Às funcionárias da pós-graduação, Luciana, Vanuza e Karla, por toda ajuda com documentações e questões de ordens burocráticas.

Aos integrantes do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, Antônio Hugo Campos, Rúbia Simplício e Thamiris Mendes, por todo o auxílio com a aprovação deste protocolo de pesquisa.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelas bolsas de Mestrado no país e no exterior.

RESUMO

Andrade KC. **Avaliação do comprimento telomérico em portadores da síndrome de Li-Fraumeni**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Características de envelhecimento saudável e a ocorrência de cânceres em idades tardias têm sido observadas em pacientes portadores da síndrome de Li-Fraumeni que possuem a mutação germinativa fundadora p.R337H no gene *TP53*. Comprimento telomérico leucocitário, um marcador de doenças associadas à idade, foi mensurado por qPCR em 66 indivíduos com a mutação p.R337H, 65 com outras mutações germinativas no gene *TP53*, e 112 controles. Análise multivariada com modelo de regressão linear com efeitos mistos demonstrou que indivíduos com a mutação p.R337H possuem encurtamento telomérico relacionado à idade significativamente inferior em comparação com portadores de outras mutações em *TP53* ($p = 0,0014$) e controles ($p = 0,033$). Isto sugere que a mutação p.R337H pode estar envolvidas não apenas em processos carcinogênicos relacionados ao gene *TP53*, mas também em mecanismos de senescência celular, como a biologia dos telômeros. A mutação p.R337H pode conferir uma vantagem seletiva que levou a sua persistência ao longo de gerações, apesar de sua associação com o risco elevado de câncer.

SUMMARY

Andrade KC. **[Evaluation of telomere length in Li-Fraumeni syndrome patients]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Features of healthy aging and late ages at cancer onset have been observed in Li-Fraumeni syndrome patients with the *TP53* p.R337H founder mutation. Leukocyte telomere length, a marker of age-associated diseases, was measured by qPCR in 66 individuals with the *TP53* p.R337H mutation, 65 with other germline *TP53* mutations, and 112 controls. Multivariable analyses with kinship linear mixed effects models revealed statistically significant lower than expected age-related telomere shortening in individuals with the p.R337H mutation compared with other LFS patients ($p=0.0014$) and controls ($p=0.033$). This suggests that the p.R337H mutation may be involved not only in *TP53*-related carcinogenesis, but also in cellular senescence mechanisms such as telomere biology. The p.R337H mutation may confer a selective advantage which has led to its persistence across generations despite its association with increased cancer risk.

LISTA DE QUADRO E FIGURAS E TABELAS

Quadro 1	Critérios clínicos para o diagnóstico da LFS.....	3
Figura 1	Linha do tempo contendo os principais resultados sobre a mutação p.R337H ao longo dos primeiros 15 anos de estudos.....	4
Figura 2	Distribuição das amostras na placa de ensaio qPCR.....	70
Tabela 1	Reagentes utilizados nos ensaios de qPCR.....	71
Tabela 2	Condições da ciclagem.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADR	Carcinoma de adrenocortical
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNV*	<i>Copy number variation</i>
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
CPC	Carcinoma de plexo coróide
DNA*	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dsDNA*	<i>Double-stranded DNA</i>
EUA	Estados Unidos da América
HCPA	Hospital das Clínicas de Porto Alegre
IARC*	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IRB*	<i>Institutional review board</i>
LFS*	<i>Li-Fraumeni syndrome</i>
LTL*	<i>Leukocyte telomere length</i>
NCI*	<i>National Cancer Institute</i>
NIH*	<i>National Institutes of Health</i>
NTC*	<i>No template control</i>
OMIM*	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
PCR*	<i>Polymerase chain reaction</i>
qPCR*	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
SNC	Sistema nervoso central
SNP*	<i>Single nucleotide polymorphism</i>
SO	Sarcomas ósseos
SPM	Sarcomas de partes moles
STR*	<i>Short tandem repeats</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UV/VIS	Ultravioleta-visível

* siglas derivadas do inglês

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	A Síndrome de Li-Fraumeni: definição e espectro tumoral.....	1
1.1.1	A mutação p.R337H: aspectos clínicos e moleculares.....	5
1.1.2	Envelhecimento saudável em portadores da mutação p.R337H.....	10
1.2	Telômeros como biomarcadores de senescência celular	11
1.2.1	Comprimento telomérico de leucócitos: base para estudos epidemiológicos.....	12
1.3	Comprimento telomérico e a síndrome de Li-Fraumeni.....	14
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivo geral	16
2.2	Objetivos específicos.....	16
3	ARTIGO.....	18
4	METODOLOGIA SUPLEMENTAR	63
4.1	Aprovação ética.....	63
4.2	Avaliação da integridade do DNA.....	63
4.3	Processo de estadiamento	63
4.3.1	Checação do volume e quantificação do DNA	64
4.3.2	Ensaio AmpF ℓ STR® <i>Identifiler</i> ®	65
4.4	Avaliação do comprimento telomérico	66
5	COMENTÁRIOS ADICIONAIS.....	69
6	CONCLUSÕES	70
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

– Projeto Temático

Anexo 2 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

– Projeto afiliado

Anexo 3 Carta de aprovação do *the National Institutes of Health* (NIH)

Anexo 4 Parecer consubstanciado da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)

Anexo 5 Artigo aceito no periódico *Genetics and Molecular Biology*

Anexo 6 Carta de aprovação do artigo no periódico *Genetics and Molecular Biology*

Anexo 7 Comprovante de submissão do artigo ao periódico *Nature Genetics*

1 INTRODUÇÃO

1.1 A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI: DEFINIÇÃO E ESPECTRO TUMORAL

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS, do inglês Li-Fraumeni syndrome; OMIM #151623) é uma doença autossômica dominante de predisposição hereditária ao câncer inicialmente descrita em 1969 por LI e FRAUMENI (1969a e b). A LFS apresenta uma penetrância estimada de 90% até os 60 anos de idade (PALMERO et al. 2009), e os tumores associados podem se desenvolver desde os primeiros anos de vida até a fase adulta. O espectro de tumores da síndrome é amplo e heterogêneo, sendo os carcinomas adrenocorticais (ADR), tumores do sistema nervoso central (SNC), sarcomas ósseos (SO) e sarcomas de partes moles (SPM) os mais frequentes em pacientes pediátricos. Já em adultos, os tipos mais comuns são os cânceres de mama e os SPM (BOUGEARD et al. 2015). Embora em menor proporção, outros tipos tumorais com idades de acometimento geralmente inferiores ao descrito para a população geral também são comumente observados. Entre eles, pode-se citar leucemia, câncer de pulmão, melanoma, câncer colorretal, adenocarcinoma gástrico e câncer de próstata (NICHOLS et al. 200; PALMERO et al. 2009).

O diagnóstico clínico da LFS é realizado frente à análise do histórico pessoal e familiar de câncer. O critério inicialmente proposto, denominado como “clássico”, é constituído pelas seguintes características: probando

diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos de idade acompanhado de um familiar de primeiro grau com qualquer câncer antes dos 45 anos de idade, e outro familiar de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 45 anos, ou sarcoma em qualquer idade (LI et al. 1988). Contudo, há famílias em que o padrão de ocorrência de tumores é similar, mas não inteiramente consistente com os parâmetros determinados por este critério. Desta forma, estudos subsequentes propuseram critérios mais abrangentes com o intuito de diagnosticar um maior número de portadores. O Quadro 1 demonstra todos os critérios já estabelecidos (LI et al. 1988; BIRCH et al. 1994; EELES 1995; CHOMPRET et al. 2001; TINAT et al. 2009; BOUGEARD et al. 2015), sendo que destes, os critérios clássicos e o de Chompret 2015 são os atualmente recomendados para a prática clínica.

Até o momento, a ocorrência da LFS é atribuída à detecção de mutações germinativas no gene *TP53* (MALKIN et al. 1990). Segundo o banco de dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC, R17, Novembro de 2013), aproximadamente 90% das 767 mutações já descritas na LFS estão distribuídas ao longo do domínio de ligação ao DNA (PETITJEAN et al. 2007; BOUGEARD et al. 2015). Quanto a taxa de detecção, é possível identificar mutações no gene *TP53* em cerca de 71% das famílias com LFS clássica (VARLEY et al. 1997), e entre 18% (TINAT et al. 2009) a 21% (RUIJS et al. 2010) em famílias que preencham os critérios revisados de Chompret 2009.

Quadro 1 - Critérios clínicos para o diagnóstico da LFS

Classificação	Descrição	Referência
LFS Clássico	• Probando diagnosticado com sarcoma antes dos 45 anos de idade; E - Um familiar de 1º grau com qualquer câncer antes dos 45 anos de idade; E - Outro familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 45 anos ou sarcoma em qualquer idade.	Li et al. 1988
Birch	• Probando com qualquer câncer na infância; OU • Probando com SPM, SNC ou ADR antes dos 45 anos; E - Um familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da LFS em qualquer idade; E - Familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 60 anos de idade.	BIRCH et al. 1994
Eeles	<i>LFL-Eeles 1</i> • Presença de dois familiares de 1º ou 2º grau com câncer típico da LFS em qualquer idade. <i>LFL-Eeles 2</i> • Probando com sarcoma em qualquer idade; E - Dois tipos diferentes de cânceres típicos da LFS em familiares de 1º ou 2º grau.	EELES 1995
Chompret	• Probando com câncer típico da LFS antes dos 36 anos; E - Familiar de 1º ou 2º grau com qualquer câncer antes dos 46 anos; OU - Familiar com múltiplos tumores em qualquer idade; OU - Probando com múltiplos tumores primários, incluindo dois que sejam típicos da LFS, com o primeiro tumor sendo diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar; OU • Probando com ADR em qualquer idade e independente da história familiar.	CHOMPRET et al. 2001
Chompret 2009	• Probando com câncer típico da LFS antes dos 46 anos; E - Ao menos um familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da LFS (exceto câncer de mama se o probando tem câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores; OU • Probando com múltiplos tumores (exceto múltiplos casos de câncer de mama), sendo que dois destes devem pertencer aos espectro LFS e o primeiro deve ter se desenvolvido antes dos 46 anos; OU • Probando com ADR ou CPC, independentemente da história familiar.	TINAT et al. 2009
Chompret 2015	• Probando com câncer típico da LFS antes dos 46 anos; E - Ao menos um familiar de 1º ou 2º grau com câncer típico da LFS (exceto câncer de mama se o probando tiver câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores; OU • Probando com múltiplos tumores (exceto múltiplos casos de câncer de mama), sendo que dois destes devem pertencer aos espectro LFS e o primeiro deve ter se desenvolvido antes dos 46 anos; OU • Probando com ADR, CPC ou rabdomiossarcoma embrionário de subtipo anaplásico, independente da história familiar; OU • Probando diagnosticado com câncer de mama antes dos 31 anos de idade.	BOUGEARD et al. 2015

Legenda - abreviações: LFS: síndrome de Li-Fraumeni; SPM: sarcoma de partes moles; SNC: tumores do sistema nervoso central; ADR: carcinoma de adrenocortical; CPC: carcinoma de plexo coróide. Espectro típico da LFS: SPM, ADR, SNC, SO e câncer de mama pré-menopausa.

Timeline | Mutação germinativa *TP53* p.R337H: primeiros 15 anos de estudos

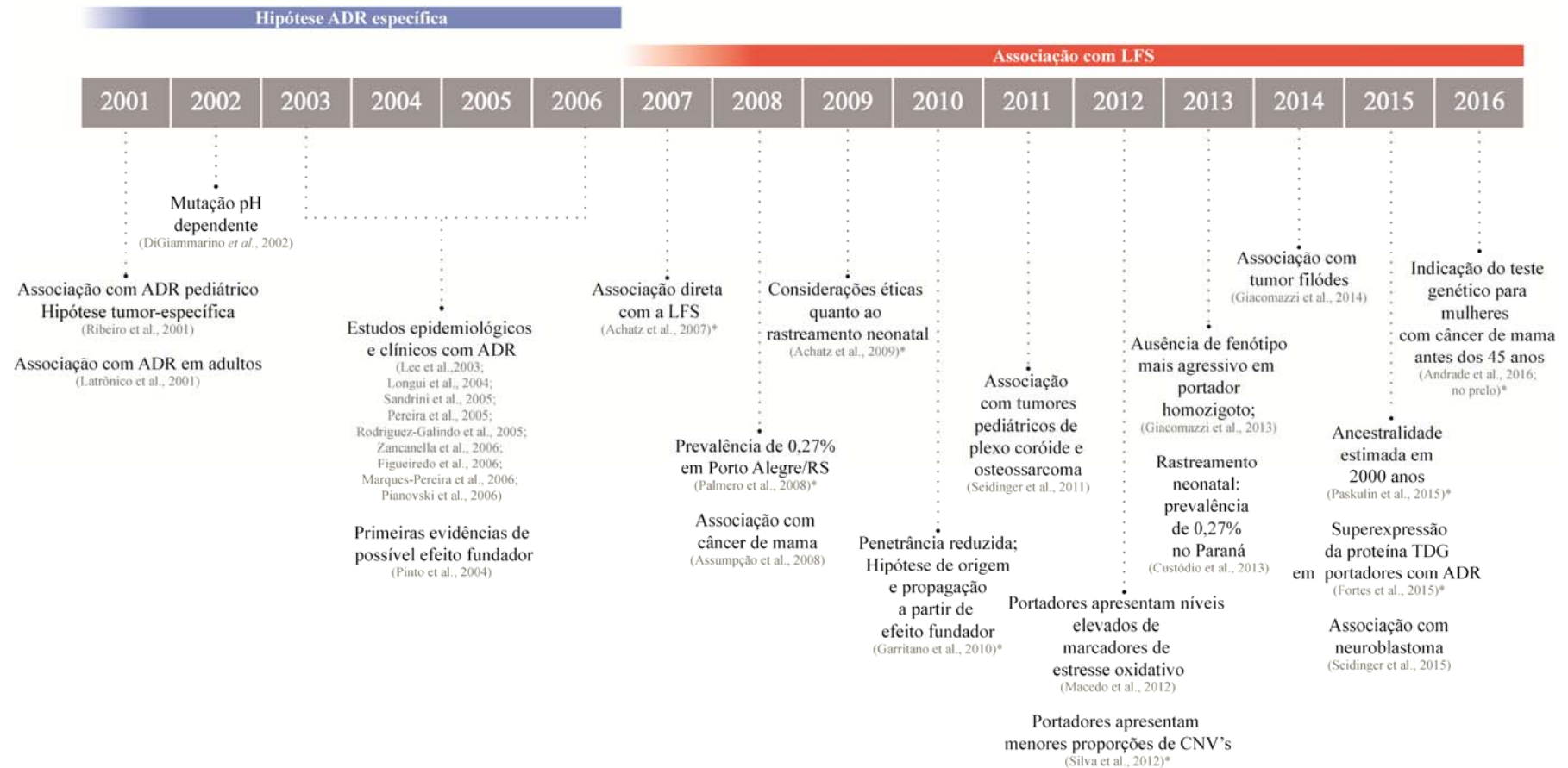


Figura 1 – Linha do tempo contendo os principais resultados sobre a mutação p.R337H ao longo dos primeiros 15 anos de estudos. (*) denota estudos realizados pelo nosso departamento ou em colaboração..

1.1.1 A mutação p.R337H: aspectos clínicos e moleculares

No Brasil, importantes estudos sobre a síndrome foram publicados durante os últimos 15 anos (Figura 1). Em 2001, foi identificada em 35 de 36 (97%) crianças brasileiras portadoras de ADR (RIBEIRO et al. 2001), uma mutação que leva a substituição de uma arginina por uma histidina no códon 337 (NC_000017.9: c.1010G>A; p.R337H), do domínio de oligomerização da proteína p53. No mesmo ano, a mutação p.R337H também foi encontrada em cinco de 37 (13,5%) adultos com ADR sem histórico familiar de câncer condizente com os critérios clássicos da LFS (LATRONICO et al. 2001).

Mediante este contexto, a mutação p.R337H foi inicialmente caracterizada como sendo tumor-específica da glândula adrenal, estimulando estudos bioquímicos que propuseram hipóteses para explicar a causa desta característica. DIGIAMMARINO et al. (2002) identificaram que frente a alterações no pH intracelular (de 7 para 8), a proteína mutada, que apresenta uma conformação menos estável do que a selvagem, perde a interação da histidina com o resíduo Asp352. Esta desestrução culmina na mudança conformacional da proteína e, consequentemente, na perda de ligações de alta afinidade com moléculas de DNA. Uma vez que a glândula adrenal sofre extenso remodelamento celular durante o desenvolvimento pré e pós-natal, ela requer uma resposta funcional de mecanismos apoptóticos que elevam o pH intracelular (SPENCER et al. 1999; LALLI 2010). Desta forma, acreditava-se que a glândula adrenal propiciava o microambiente celular perfeito para a desestabilização da proteína e, consequentemente, ao desenvolvimento tumoral. Contudo, uma vez que a glândula adrenal não é

a única a passar por este processo de remodelamento, indagações a respeito desta afirmação foram prontamente estabelecidas (HAINAUT 2002). Nos anos seguintes, diversos estudos epidemiológicos, moleculares e clínicos foram conduzidos buscando compreender o impacto da mutação p.R337H no desenvolvimento de ADR e a conduta clínica necessária para este grupo específico de portadores (LEE et al. 2003; LONGUI et al. 2004; SANDRINI et al. 2005; PEREIRA et al. 2005; RODRIGUEZ-GALINDO et al. 2005; FIGUEIREDO et al. 2006; ZANCANELLA et al. 2006; MARQUES-PEREIRA et al. 2006; PIANOVSKI et al. 2006).

Em 2007, entretanto, nosso grupo descreveu uma importante associação direta desta mutação com a LFS, demonstrando que indivíduos com a mutação p.R337H, assim como portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA, também apresentavam alto risco de desenvolver uma ampla gama de tumores do espectro da LFS (ACHATZ et al. 2007). Dada a relação da mutação p.R337H com diversos outros tumores e sua elevada prevalência na população brasileira, estudos epidemiológicos têm sugerido o seu rastreamento em pacientes que tenham desenvolvido outros tumores, tais como os carcinomas pediátricos de plexo coróide (CUSTODIO et al. 2011; SEIDINGER et al. 2011) e neuroblastoma (SEIDINGER et al. 2015). Adicionalmente, devido a uma forte associação com câncer de mama, incluindo o tumor filóides (GIACOMAZZI et al. 2013), o teste genético para a mutação tem sido sugerido para mulheres que desenvolveram câncer de mama em idade jovem (ASSUMPÇÃO et al. 2008; CURY et al. 2014;

GIACOMAZZI et al. 2014, Andrade et al. no prelo, Anexo 5; Andrade et al. aprovação, Anexo 6).

Em 2008, com o objetivo de avaliar a prevalência da mutação na população do sul do país, foram avaliadas 750 mulheres em um teste de triagem para câncer de mama na cidade de Porto Alegre/RS. Na população estudada, duas mulheres foram detectadas como portadoras da mutação, resultando em uma prevalência estimada de aproximadamente 0,27%, isto é, cerca de 10 a 20 vezes maior do que qualquer outra mutação já descrita no gene *TP53* (PALMERO et al. 2008). Semelhantemente, (CUSTÓDIO et al. 2013 realizaram um rastreamento neonatal no estado do Paraná com mais de 170 mil crianças e confirmaram a alta prevalência na região Sul do país, embora seja um estudo passível de considerações por não atender alguns aspectos éticos descritos por ACHATZ et al. 2009, como o acompanhamento dos familiares positivos.

Esta alta prevalência motivou estudos que buscaram compreender a origem da mutação assim como explicar a sua constante propagação. Corroborando evidências anteriormente publicadas por PINTO et al. (2004), GARRITANO et al. (2010) analisaram um painel com 29 marcadores polimórficos intragênicos em 12 portadores da mutação p.R337H, aparentemente não relacionados, e demonstraram que todos possuíam a mutação no mesmo haplótipo A3 de descendência caucasiana. Devido à baixa probabilidade deste fenômeno ocorrer de forma independente, surgiram as primeiras evidências de que estes indivíduos possuíam um ancestral comum de provável origem portuguesa. Esta hipótese foi levantada

com base na distribuição geográfica dos portadores ao longo de um eixo denominado “rota dos tropeiros”, uma rota entre as cidades de Porto Alegre e São Paulo utilizada por mercadores portugueses durante os séculos XVIII e XIX. Em contrapartida, PASKULIN et al. (2015) inseriram um debate quanto ao seu contexto histórico ao identificarem que a mutação p.R337H tem a sua ancestralidade estimada em aproximadamente 2000 anos.

Assim como estudos que auxiliaram a conduta clínica dos portadores, algumas abordagens moleculares sobre a mutação p.R337H também têm sido realizadas. Quanto ao seu potencial carcinogênico, além do impacto gerado na atividade da proteína p53, a presença da mutação está associada a maiores níveis de indicadores de estresse oxidativo devido a um provável mecanismo bioenergético celular desregulado (MACEDO et al. 2012). Contudo, ao invés de mecanismos que estimulem o desenvolvimento tumoral, uma das principais características atribuídas à mutação p.R337H é sua baixa penetrância especialmente em portadores mais jovens. Acredita-se que 15% dos portadores desenvolverão um tumor maligno antes dos 30 anos de idade, um valor abaixo do esperado quando comparado a portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA, que chega a 50% na mesma faixa etária. A principal consequência desta característica é que, ao contrário da esperada seleção negativa durante a evolução, seus portadores possuem maior probabilidade de viver até idades reprodutivas, possibilitando a propagação desta mutação e sua permanência ao longo de gerações (GARRITANO et al. 2010).

Tais variações na idade de acometimento tumoral sugerem que outros fatores genéticos também podem contribuir como modificadores de penetrância. Uma característica, potencialmente protetora, é o fato de portadores p.R337H possuírem um perfil semelhante a indivíduos controles quanto a proporção de variações no número de cópias genômicas (CNV, do inglês *Copy Number Variation*), diferentemente do padrão observado no grupo de portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA da proteína p53 do mesmo estudo (SILVA et al. 2012) e de outro anteriormente publicado (SHLIEN et al. 2008).

Apesar de não serem descritos exclusivamente em portadores da mutação p.R337H, outros modificadores genéticos foram reportados como moduladores de penetrância na LFS. O polimorfismo *MDM2* rs2279744 (c.14+309T>G) que está relacionado à ocorrência de câncer em idades mais precoces, sendo que os portadores apresentam idade média de acometimento inicial aos 19,6 anos, enquanto os não portadores geralmente desenvolvem o primeiro tumor aos 30 anos (BOND et al. 2004 e 2005). O polimorfismo *TP53* rs1042522 (c.215C>G; p.Pro72Arg), associado ao rs2279744, reduz a idade de acometimento para 16,9 anos (BOUGEARD et al. 2006). O polimorfismo *TP53* rs17878362 (c.96+41_96+56del16) está associado a uma diferença de 19 anos na idade média de diagnóstico do primeiro câncer (MARCEL et al. 2009).

1.1.2 Envelhecimento saudável em portadores da mutação p.R337H

Além da penetrância reduzida para o desenvolvimento de câncer observada em pacientes mais jovens, estudo prévio do nosso grupo identificou um subgrupo de portadores da mutação p.R337H, não relacionados e acima dos 55 anos, nos quais características peculiares puderam ser observadas (Andrade, KC; Costa, ACLV.; Nobrega A.; Savage, SA.; Achatz, MI. *The germline TP53 p.R337H mutation: a putative selective advantage? [Abstract]. In: Annual Meeting of the American Association for Cancer Research*; 2015 Apr 18–22; Philadelphia (PA). Abstract ref. 2753). De forma geral, foi encontrada uma menor ocorrência de condições patológicas comuns do envelhecimento, tais como osteoporose ($p=0,0014$), doenças de Alzheimer, Parkinson e hipertensão (LEITE et al. 2016, manuscrito em preparação). Em avaliação clínica, estes pacientes apresentavam aspectos físicos como tônus muscular e cutâneo que remetiam a uma aparência mais jovem em relação às idades cronológicas apresentadas. Essa observação também foi referida pelos próprios membros das famílias, que relataram até mesmo um time de futebol composto por primos da família Y0012, todos na faixa etária dos 72 a 85 anos. Este perfil único, indicando um envelhecimento mais saudável do que a população geral, poderia ser uma evidência de que portadores p.R337H estivessem sob a influência de fatores genéticos que direta ou indiretamente poderiam afetar vias de sinalização envolvidas no processo de senescência celular e envelhecimento.

1.2 TELÔMEROS COMO BIOMARCADORES DE SENESCÊNCIA CELULAR

Telômeros humanos são complexos nucleoproteicos localizados no final dos cromossomos que consistem de repetições TTAGGG consecutivas na mesma fita de DNA (MOYZIS et al. 1988). Estas estruturas servem como sítio de ligação para diversas proteínas que, sob um conjunto denominado shelterina (do inglês, *shelterin*), conferem proteção aos cromossomos da degradação por nucleases, de recombinações e de rearranjos (PALM e DE LANGE 2008). Além disso, são considerados como um dos marcos do envelhecimento (LÓPEZ-OTÍN et al. 2013), atuando como indicadores de senescência celular (VAZIRI et al. 1994; BLASCO 2005; AUBERT e LANSDORP 2008; CALADO e YOUNG 2009; O'SULLIVAN e KARLSEDER 2010). Este papel é atribuído uma vez que durante a replicação do DNA, a DNA polimerase é incapaz de copiar o segmento 3' terminal da fita descontínua de DNA (OLOVNIKOV 1971, citado por OLOVNIKOV 1973, p.1982). Consequentemente, os telômeros se encurtam a cada ciclo de divisão celular até o nível crítico conhecido como limite de HAYFLICK (HAYFLICK 1965), desencadeando uma resposta molecular que induz a apoptose ou senescência celular (AUBERT e LANSDORP 2008).

1.2.1 Comprimento telomérico de leucócitos: base para estudos epidemiológicos

O comprimento telomérico de leucócitos extraídos de sangue periférico, correlacionado com o comprimento telomérico de outros tecidos, tais como pele, músculo esquelético e gordura (FRIEDRICH et al. 2000; DANIALI et al. 2013), tem sido alvo de diversos estudos epidemiológicos que buscam possíveis correlações entre telômeros e a saúde humana. Embora haja resultados contraditórios ou ocasionalmente apresentem uma fraca associação, telômeros curtos têm sido associados a uma pior sobrevida (RODE et al. (2015) e a riscos mais elevados de doenças cardiovasculares (CAWTHON et al. 2003; HAYCOCK et al. 2014), infecções (COHEN et al. 2013), diabetes *mellitus* Tipo 2 (ZHAO et al. 2013) e câncer (MA et al. 2011; WENTZENSEN et al. 2011).

Além destas associações entre menor comprimento telomérico e maior risco de doenças, síndromes de envelhecimento prematuro, como a síndrome de Werner (CRABBE et al. 2007) e a ataxia telangiectasia (METCALFE et al. 1996) estão fortemente correlacionadas à disfunção telomérica por meio de mutações nos genes *WRN* e *ATM*, respectivamente. O encurtamento telomérico excessivo é também um dos fatores etiológicos envolvidos na manifestação clínica de diversas outras doenças, como a disceratose congênita (SAVAGE e ALTER 2009), anemia aplásica, fibrose pulmonar, cirrose hepática e alguns cânceres (CALADO E YOUNG 2009).

Apesar de também não ser um consenso (MARTIN-RUIZ et al. 2005; BISCHOFF et al. 2006; HALASCHEK-WIENER et al. 2008; ZEKRY et al.

2012), alguns estudos têm sugerido que indivíduos mais saudáveis e/ou que possuam maior expectativa de vida apresentem telômeros mais longos.

A península de Nicoya - Costa Rica, reconhecida por ser uma das zonas azuis do planeta, isto é, locais onde há concentração expressiva de indivíduos centenários (BUETTNER. 2010; ROSERO-BIXBY et al., 2013) foi a base para um dos estudos de comprimento telomérico em pessoas excepcionalmente longevas. Os pesquisadores descobriram que a população centenária de Nicoya tinha telômeros maiores do que habitantes de outras regiões do país. Após considerar fatores biológicos, dietéticos, sociais e demográficos, os autores concluíram que este resultado poderia ser um forte indicador de associação entre telômeros longos e a longevidade encontrada naquela região (REHKOPF et al. 2013).

Em avaliação realizada em gêmeos, BAKAYSA et al. (2007) verificaram que a parcela de indivíduos pertencentes ao quartil com o maior comprimento telomérico apresentava maior sobrevivência durante o acompanhamento do estudo. Em comparação direta, o gêmeo que apresentava o menor comprimento telomérico tinha um risco de morte três vezes maior (morte por todas as causas) do que o seu co-gêmeo.

Telômeros significativamente maiores também foram identificados em centenários “saudáveis” (classificação dada a indivíduos fisicamente ativos e sem algumas doenças específicas como hipertensão, demência, câncer, diabetes, dentre outras) do que em centenários “não-saudáveis” (indivíduos que possuíam alguma limitação física e no mínimo duas das condições patológicas consideradas) de uma coorte norte-americana. Dada a

inconsistente associação entre comprimento telomérico e longevidade na literatura, os autores sugeriram que, ao invés da longevidade em si, o fator associado ao comprimento telomérico poderia ser, na verdade, a saúde de um indivíduo (TERRY et al. 2008). Resultados semelhantes também foram encontrados em judeus centenários de etnia Ashkenazi que apresentavam perfis fisiológicos e metabólicos de envelhecimento saudável e funções cognitivas melhores em relação ao grupo controle (ATZMON et al. 2010).

1.3 COMPRIMENTO TELOMÉRICO E A SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

Até o momento, apenas três estudos avaliaram o comprimento dos telômeros em grupos relativamente pequenos de pacientes LFS (TABORI et al. 2007; TRKOVA et al. 2007; PINTO et al. 2009). TABORI et al. (2007) demonstraram que os telômeros dos pacientes LFS eram mais curtos em relação aos indivíduos *wild-type TP53* de idades pareadas. Os autores também sugeriram que pacientes LFS apresentavam maiores taxas de encurtamento telomérico. De acordo com um modelo de tendência de taxas de encurtamento telomérico ao longo da vida, foi observado que telômeros mais curtos estavam diretamente associados com o desenvolvimento de câncer em idades mais jovens. Resultados similares foram encontrados nos outros estudos (TRKOVA et al. 2007; PINTO et al. 2009) que, semelhantemente, também indicaram uma importante aplicação deste conhecimento no manejo de pacientes LFS, sugerindo a utilização do

comprimento telomérico como um biomarcador para prever o fenômeno da antecipação genética e avaliar o risco de desenvolvimento tumoral.

Apesar de avanços no conhecimento da síndrome, os estudos de comprimento telomérico e a LFS foram limitados, quase que exclusivamente, à análise de portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA. Com base na penetrância reduzida em pacientes mais jovens e no perfil clínico de envelhecimento saudável, nossa hipótese era que a mutação p.R337H poderia ter um impacto diferente na biologia telomérica.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o comprimento telomérico relativo em pacientes LFS com a mutação p.R337H, em pacientes LFS com outras mutações germinativas no gene *TP53* e em controles (familiares negativos para mutações em *TP53* não afetados por câncer).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os valores estimados de comprimento telomérico ao nascimento e de encurtamento telomérico relacionado à idade entre os seguintes grupos:

- Controles: filhos controles de pais portadores vs. filhos controles de pais controles;
- Coorte brasileira: filhos controles de pais controles vs. filhos controles de pais portadores p.R337H vs. portadores p.R337H;
- Coorte norte-americana: filhos controles de pais controles vs. filhos controles de pais portadores de outras mutações em *TP53* vs. portadores de outras mutações em *TP53*;
- Coorte brasileira e norte-americana: portadores p.R337H vs. portadores de outras mutações em *TP53*; controles americanos vs. controles brasileiros; filhos controles de pais portadores p.R337H vs. filhos controles de pais portadores de outras mutações em *TP53*.

3 ARTIGO

Artigo submetido ao periódico *Nature Genetics* em 15 de Fevereiro de 2016 (Anexo 7).

Title: Lower than Expected Age-related Telomere Shortening in Individuals with the Germline *TP53* p.R337H Mutation

Kelvin C de Andrade¹, Ana F Best², Shahinaz M Gadalla³, Karina M Santiago¹, Casey L Dagnall⁴, Payal P Khincha³, Fernanda P Fortes¹, Amanda F de Nóbrega⁵, Kedest Teshome⁴, Pierre Hainaut⁶, Phuong L Mai³, Maria I Achatz^{1,5,7}, Sharon A Savage^{3,7}

Authors' e-mails

Amanda F. de Nóbrega: amanda.nobrega@accamargo.org

Ana F. Best: ana.best@nih.gov

Casey L. Dagnall: dagnallc@mail.nih.gov

Fernanda P. Fortes: ffortes@cipe.accamargo.org.br

Karina M. Santiago: karina.santiago@accamargo.org.br

Kedest Teshome: teshomek@mail.nih.gov

Kelvin C. Andrade: kelvincesar.an@gmail.com

Maria I. Achatz: miachatz@cipe.accamargo.org.br

Payal P. Khincha: payal.khincha@nih.gov

Phuong L. Mai: maip@mail.nih.gov

Pierre Hainaut: pierre.hainaut@ujf-grenoble.fr

Shahinaz M. Gadalla: gadallaas@mail.nih.gov

Sharon A. Savage: savagesh@mail.nih.gov

Institutions

¹International Research Center, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP 01508-010, Brazil.

²Biostatistics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, USA

³Clinical Genetics Branch, Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Department of Health and Human Services, Bethesda, MD, USA

⁴Cancer Genomics Research Laboratory, Leidos Biomedical Research Inc., Frederick National Laboratory for Cancer Research, Frederick, MD, USA

⁵Department of Oncogenetics, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, SP 01509-900, Brazil

⁶Institut Albert Bonniot, Inserm 1209 CNRS 5509, Université Grenoble-Alpes, 38706 Grenoble, France

⁷Co-corresponding authors:

Sharon A. Savage, MD

Chief, Clinical Genetics Branch

Division of Cancer Epidemiology and Genetics, National Cancer Institute

9609 Medical Center Dr., Rm. 6E456, MSC 97720 - Bethesda, MD 20892-9772

Rockville, MD 20850 (for FED-EX/UPS/Couriers)

Tel: 240-276-7241. Fax: 240-276-7836.

Email: savagesh@mail.nih.gov

Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz, MD, PhD

Chief, Department of Oncogenetics - A.C. Camargo Cancer Center

211 Prof. Antonio Prudente St., Liberdade - Sao Paulo/SP, 01509-010.

Tel: +55 (11) 21899000, Ext 2991.

Email: miachatz@cipe.accamargo.org.br

Running title: Telomere length in Li-Fraumeni syndrome

Keywords: Li-Fraumeni syndrome, p.R337H, telomere length, *TP53*

ABSTRACT

Late ages at cancer onset and features of healthy aging have been observed in Li-Fraumeni syndrome patients with the *TP53* p.R337H founder mutation. Leukocyte telomere length, a marker of age-associated diseases, was measured by qPCR in 66 individuals with the *TP53* p.R337H mutation, 65 with other germline *TP53* mutations, and 112 controls. Multivariable analyses with kinship linear mixed effects models revealed statistically significant lower than expected age-related telomere shortening in individuals with the p.R337H mutation compared with other LFS patients ($p=0.0014$) and controls ($p=0.033$). This suggests that the p.R337H mutation may be involved not only in *TP53*-related carcinogenesis, but also in cellular senescence mechanisms such as telomere biology. The p.R337H mutation may confer a selective advantage which has led to its persistence across generations despite its association with increased cancer risk.

Main Text

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is a highly penetrant cancer susceptibility disorder primarily caused by autosomal dominant germline mutations in the *TP53* tumor suppressor gene¹. Although considered rare worldwide, it has an estimated prevalence of up to 0.3% in Southern and Southeastern Brazil due to the founder p.R337H mutation²⁻⁴. Individuals with this mutation in the oligomerization domain of the p53 protein have been reported to develop a wide-variety of LFS-related tumors⁵ at relatively older ages than those LFS patients with mutations in the p53 DNA binding domain^{6,7}, which is the hotspot for germline *TP53* mutations (IARC *TP53* database, R17, November 2013)⁸. Our clinical observation of a remarkable youthful appearance in older members of our cohort of LFS patients with the p.R337H mutation prompted a pilot study in which we documented a low incidence of age-associated diseases in those patients (Andrade, KC; Costa, ACLV; Nobrega A; Savage, SA; Achatz, MI). The germline *TP53* p.R337H mutation: a putative selective advantage? [Abstract]. In: Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2015 Apr 18–22; Philadelphia (PA). Abstract ref. 2753). These characteristics suggest that individuals with the *TP53* p.R337H mutation may possess genetic factors that direct or indirectly affect both cancer penetrance and cellular senescence pathways.

Telomeres are nucleoprotein complexes at chromosome ends fundamental for genomic stability⁹. They shorten with each cell division due

to incomplete replication of the 3' DNA overhang, and thus, are considered as markers of cell division and aging^{10,11}. Leukocyte telomere length (LTL) is correlated with telomere lengths in other human tissues^{12,13} and has been evaluated in numerous epidemiological studies on human health. Short LTL has been associated with high risk of cardiovascular¹⁴ and inflammatory¹⁵ diseases, cancer,^{16,17} and telomere biology disorders such as dyskeratosis congenita¹⁸⁻²⁰. Conversely, longer LTL has been associated with longevity and healthy aging in different populations²¹⁻²⁴.

In LFS patients with *TP53* mutations, located mostly in the DNA-binding domain, LTL has been postulated to be shorter, associated with age at cancer onset²⁵⁻²⁷, and to have accelerated shortening over time than that of healthy controls²⁶. However, the role of the *TP53* p.R337H mutation in telomere biology has not been investigated. In order to better understand the role that *TP53* mutations may play in telomere biology and aging, we compared estimated telomere length at birth and age-related telomere shortening in LFS patients with the p.R337H mutation and others, and mutation-negative healthy controls.

Results

Characteristics of study participants

This study included 146 individuals (66 mutation-positive for the p.R337H mutation and 80 mutation-negative) from 27 families in the Brazilian cohort, and 97 participants (65 mutation-positive for other than p.R337H and

32 mutation-negative) from 44 families in the US NCI cohort. The distribution of family sizes within each cohort and the types of germline *TP53* for the NCI cohort are described in **Supplementary Tables 1 and 2**, respectively. The majority of Brazilian participants (64.4%) were from two very large families and this is accounted for using kinship linear mixed effects models (Online Methods). Cancer-free mutation-negative relatives (bloodline and spouses) were used as controls and sub-divided in two subgroups according to their parents' genetic status as mutation-negative individual from a mutation-positive parent (MN-PP); or mutation-negative individual from a mutation-negative parent (MN-PN).

Characteristics of study participants, including the number of individuals in each cohort, median age, and cancer status are summarized in **Table 1**. Both cohorts had more mutation-positive (MP) females than males (70% and 72% *versus* 30% and 28%, for Brazil and NCI, respectively). The MN-PN subgroup from NCI had higher median age than the other groups from the same cohort (median age 38 years in MP, 38 in MN-PP, and 46.5 in MN-PN; $p=0.08$, ANOVA). A similar difference was present in the Brazilian cohort, with the MN-PN being the oldest group (median age 38.5 years in MP, 37 years in MN-PP, and 45 years in MN-PN; $p=0.21$, ANOVA). In both cohorts, males were younger than females in all groups, except in the MN-PN. Amongst the Brazilian MP group 20% of males and 56.5% of females had developed cancer prior to blood collection compared with 44.4% of males and 74.5% of females from NCI. None of the patients was undergoing cytotoxic treatment for cancer at the time of blood draw (Online Methods).

Telomere length by *TP53* status and mutation type

Unadjusted LTL (log-transformed standardized T/S ratio) was tabulated and plotted across genetic subgroups and cohorts. Among the NCI cohort, median log-transformed standardized T/S ratio was comparable in MP and MP-PN groups but shorter in MN-PP (median = -0.5 in MP, -0.3 in MN-PP, and -0.5 in MN-PN, **Fig. 1** and **Supplementary Table 3**). Among the Brazilian cohort, the MP and the MN-PP subgroup had longer median log-transformed standardized T/S ratio than the MN-PN subgroup (median LTL = -0.1 in MP, -0.1 in MN-PP, and -0.3 in MN-PN, **Fig. 1** and **Supplementary Table 3**).

Cross-cohort comparisons showed that individuals in the NCI cohort had lower log-transformed standardized T/S ratio than those from Brazil, regardless of mutation status (**Fig. 1** and **Supplementary Table 3**). Notably, LTL was longer in LFS patients with the p.R337H mutation compared with those with other *TP53* mutations. This finding was consistent in the five individuals from the NCI cohort with p.R337H mutation (Online Methods and **Supplementary Fig. 1**).

Mutation-negative subgroups have similar estimated telomere length at birth and age-related telomere shortening

We estimated LTL at birth (intercept) and the age-related telomere shortening (slope) between cohorts and genetic groups, controlling for an overall sex effect (Model 1) and not controlling for sex (Model 2) (Online Methods and **Supplementary Table 4**).

In order to establish whether parental genetic status influenced either parameter, we first analyzed the MN-PP and MN-PN subgroups to determine whether they should be kept separated or combined in subsequent analyses. There were no significant differences between MN subgroups within each population (**Supplementary Fig. 2a** and **2b**, and **Supplementary Table 5**) or between each subgroup across populations (**Supplementary Fig. 2c** and **2d**, and **Supplementary Table 5**). Due to this similarity, we combined the MN-PN and MN-PP subgroups within each cohort (hereafter referred to as mutation-negative, MN) in order to gain statistical power for the following multivariable analyses.

Lower than expected age-related telomere shortening in individuals with the *TP53* p.R337H mutation

In order to compare MP and MN groups, each cohort (**Fig. 2**) and each subgroup (**Fig. 3**) was evaluated individually. Comparisons and linear fits estimates for the MN-combined analysis and their comparisons are demonstrated in **Table 2** and in **Supplementary Table 6**, respectively.

Within the NCI cohort (**Fig. 2a** and **2b**), we found no evidence of significant differences between estimated LTL at birth in MN versus MP individuals ($p=0.33$, kinship linear mixed effects, **Fig. 2a** and **Table 2**). However, a visible trend (**Fig. 2a**) of accelerated telomere shortening was found in MP individuals compared with MN (estimated slope effect of -0.0045 , **Table 2**), although this difference was not statistically significant

($p=0.3$, kinship linear mixed effects, **Fig. 2a** and **Table 2**) as demonstrated by the large degree of overlap between ellipses (**Fig. 2b**).

In the Brazilian cohort (**Fig. 2c** and **2d**), we observed that the estimated telomere length at birth was longer among MN subjects than MP (estimated intercept difference 0.2694, $p=0.044$, kinship linear mixed effects, **Fig. 2c** and **Table 2**). However, MP participants demonstrated notably lower estimated age-related telomere shortening than the MN group ($p=0.033$, kinship linear mixed effects, **Fig. 2c** and **Table 2**). This difference is further demonstrated by the upward displacement of the MP ellipse in relation to the y-axis (**Fig. 2d**). Joint comparison of telomere length at birth and age-related telomere shortening showed that the increased separation between ellipses reflects the increased statistical significance in genetic group differences in the Brazilian cohort relative to the NCI cohort (**Fig. 2b** and **2d**). The large degree of ellipse overlap between the MP and MN groups from NCI highlights the lack of evidence of statistically significant differences between these groups (**Fig. 2b**). However, the incomplete separation between the Brazilian MP and MN groups suggests that, when taken as a whole, there may not be sufficient evidence to conclude that the linear fit for MP individuals is different from the fit for MN subjects (**Fig. 2d**).

The inter-cohort comparisons for the MP and MN groups are shown in **Figure 3**. The estimated age-related shortening in MP individuals with the p.R337H mutation was significantly lower than among LFS patients with other *TP53* mutations ($p=0.0014$, kinship linear mixed effects, **Fig. 3a** and **Table 2**). This considerable difference is also reflected in the complete

separation of ellipses (**Fig. 3b**), indicating a statistically significant difference between their regression lines, at the 5% level. No difference was found for estimated telomere length at birth between MP subgroups ($p=0.23$, kinship linear mixed effects, **Fig. 3a** and **Table 2**). In the analysis comparing MN subgroups, our data showed a similar rate of age-related telomere shortening ($p=0.91$, kinship linear mixed effects, **Fig. 3c** and **Table 2**) but higher estimated telomere length at birth for Brazilians (**Fig. 3c**). This difference was not statistically significant ($p=0.14$, kinship linear mixed effects, **Fig. 3c** and **Table 2**), but near complete separation between ellipses indicates that the linear fits for the two MN groups may differ overall (**Fig. 3d**).

Across all subgroups, we found no difference between males and females in any of parameters analyzed (estimated intercept difference, $p=0.26$; estimated slope difference, $p=0.18$; kinship linear mixed effects, **Table 2**).

Discussion

Our data suggest that the *TP53* p.R337H mutation is associated with lower than expected age-related telomere shortening with a linear regression line virtually unaltered throughout a MP individuals' lifetime. These findings provide the first line of evidence of a possible role for the *TP53* p.R337H mutation in telomere biology and additional biological explanation as to why this specific LFS subgroup has demonstrated later age at cancer onset.

Genetic modifiers of age at cancer onset, such as genetic polymorphisms²⁸⁻³¹, copy number variants (CNVs)³², and telomere length have been described in LFS. To date, three studies have evaluated LTL in relatively small LFS cohorts and reported that LFS patients have shorter telomeres than age-matched healthy controls²⁵⁻²⁷. They also identified a correlation in which younger age of cancer onset was associated with shorter telomeres. Importantly, Tabori *et al.* suggested that LFS patients had accelerated rates of telomere shortening when compared with normal subjects. Based on these findings, the authors illustrated a proposed model in which LFS patients were prone to early-onset tumor development since they reached the threshold of critical telomere length at earlier ages. In agreement with both studies, we found that patients with germline *TP53* mutations, other than p.R337H, have shorter telomeres and increased age-related telomere shortening than their age-matched controls. On the other hand, our observation that LFS patients with the germline *TP53* p.R337H mutation have less age-related telomere shortening may be an explanation as to why they typically start developing tumors at later ages and suggests that the p.R337H mutation may have a specific association with telomere biology, distinct from the effect of DNA-binding domain *TP53* mutations.

Our results support the hypothesis that the *TP53* p.R337H mutation may play a central role in a two-directional phenotypic model, with both detrimental effect (as compared to MN subjects) and potentially beneficial effects (as compared to MP participants with DNA-binding domain *TP53* mutations) (**Fig.4**). It is plausible that, while this mutation is detrimental in that

it leads to increased cancer risk, it may also be beneficial by affecting overall aging and possibly increasing lifespan. In this model, p.R333H exerts detrimental effects through reduced p53 suppressor activity³³⁻³⁵ and increased levels of indicators of protein and lipid oxidative damage³⁶, two potential carcinogenic mechanisms that have been described for LFS patients with the *TP53* p.R337H mutation thus far. Conversely, p.R337H may exert some potentially protective effects that are not associated with hotspot *TP53* mutations. First, it is known that the *TP53* p.R337H mutation presents a milder LFS phenotype, especially at younger ages, than mutations located in the DNA-binding domain. While only about 20% of the LFS patients with the *TP53* p.R337H mutation are affected by cancer by the age of 30 years, this proportion may be as high as 50% for other LFS patients^{6,7}. As described previously⁶, a plausible explanation is due to its biochemical characteristic of being a pH-dependent conditional p53 mutation, which may account for the fact that inactivation of the p.R337H protein may occur only in defined physiopathological or metabolic contexts^{33,35}. Moreover, unexpectedly comparable ratios of rare CNVs, a potential indication of cancer risk, have been reported between individuals with the p.R337H mutation and controls³⁷, differently from the results obtained with other LFS patients from the same study and with those from a previous publication³².

Lower rates of age-related telomere shortening could be an important component in this genetic modifier equation, providing p.R337H carriers with a healthy aging phenotype. The beneficial effect of this phenotype may partially outweigh the detrimental, cancer-causing effects. Although the exact

circumstances of occurrence and dissemination of the p.R337H mutation are unknown, genetic analyses have suggested that the founder allele may be about 2000 years-old, suggesting that important biological mechanisms have enabled its escape from evolutionary negative selection over a large number of generations³⁸. LTL is inherited³⁹ and associated with both rare and common genetic variants⁴⁰⁻⁴⁵. The p53 protein is connected with telomere biology via common downstream cellular senescence pathways⁴⁶⁻⁴⁸ and could be also part of this context. The p.R337H mutation may have additional particular mechanisms involved in upstream telomere genetic pathways, leading to abnormal telomere elongation or overprotection to physiologic age-related telomere shortening. Alternatively, it is possible that this phenomenon is driven by other loci associated with these factors that are segregating in linkage, rather than the p.R337H mutation itself. As the association between germline *TP53* mutations encountered in LFS patients and cellular senescence pathways has not been studied, a new area of research may be developed upon our results.

It is possible that the longer estimated telomere lengths at birth in the MN group from Brazil than the MN group from NCI is due population-specific ethnic differences, similar to the findings reported in European populations⁴⁹. The finding that there was no difference between the MN-PP and MN-PN subgroups suggests that parental *TP53* mutation status is not associated with telomere length at birth or age-related telomere shortening. Furthermore, the similarity between age-associated telomere shortening in Brazilian MN-PP and MN-PN subgroups suggests that the effect observed in the MP group

may be primarily associated with the *TP53* p.R337H mutation, as the other shared aspects of participants' genetic backgrounds were controlled for via the kinship statistical model. The considerably higher median ages in both MN-PN groups may explain the differences demonstrated by the unadjusted standardized T/S ratio analysis.

This study is the first to evaluate LTL in a cohort of LFS patients with the *TP53* p.R337H mutation. An important strength of our study was the ability to compare telomere length and age-related telomere attrition in individuals with the p.R337H founder mutation, other *TP53* mutations, and healthy controls from both Brazil and the USA. We used statistical methods to account for genetic relatedness through family structure, which is necessary within the large Brazilian families, in addition to the standard cluster-based accounting for non-genetic similarities within families. As weaknesses, given the inter-individual variability in LTL dynamics, cross-sectional data are prone to inconsistent results as they reflect the telomere length at a specific moment in time. Longitudinal analysis is a better alternative to measure actual rates of age-related telomere shortening but was not feasible in our study. It is also noteworthy that such studies have demonstrated contradictory results⁵⁰⁻⁵³. Within our study, potential factors related to age-related telomere shortening such as environmental and occupational exposures⁵⁴, dietary habits, lifestyle, and psychosocial aspects⁵⁵⁻⁵⁹ were not directly measured and were thus unaccounted for in the analysis. However, the cluster analysis accounts for these to the extent of their similarity within families. It is still not clear to what extent telomeres get

deteriorated due to storage time⁶⁰. However, as we did not observe shorter LTL in the MN group from the Brazilian cohort, which had blood collected years before the respective group from the NCI cohort, and since all the samples went through stringent quality control processes, we suggest that our results were not affected by this covariate. Cytotoxic cancer treatment such as chemotherapy may induce proliferative stress in healthy regenerative tissues, leading to a transient increase in the rate of telomere attrition during the period of treatment and to a permanent shorter telomere length afterwards⁶¹. In the context of this study, the short-term effects of accelerated attrition rate were potentially avoided as no MP participants were undergoing cancer treatment at the period of blood draw. However, the lasting effects of chemotherapy may have reduced the estimated adjusted mean LTL in the MP groups relative to the MN, or increased the age-related telomere shortening within the MP groups compared to theoretical MP groups not treated with cytotoxic chemotherapy. However, this lends further strength to our conclusion that age-related telomere shortening is reduced in LFS patients with the p.R337H mutation as any bias due to chemotherapy would have caused an increase in telomere shortening rather than a decrease. Finally, the NCI and Brazilian cohorts were subject to different DNA extraction protocols. As qPCR is a very sensitive technique^{60,62,63}, it may have resulted in differences in unadjusted median LTL between cohorts. However, as the five participants from the NCI cohort with the p.R337H mutation demonstrated longer LTL than other LFS individuals within that

cohort, we suggest that the pattern of longer LTL in the Brazilian LFS cohort compared to the NCI's is minimally affected by DNA extraction protocols.

In summary, we found lower age-related telomere attrition in LFS patients with the p.R337H mutation when compared to LFS patients with other *TP53* mutations or mutation-negative individuals. This study suggests that telomere biology may be related to the healthy phenotype as well as to the later ages of cancer onset in p.R337H mutation-positive individuals, and implies a selective advantage of this mutation across generations in the Brazilian population.

FIGURES' LEGENDS

Figure 1 - Box-plot of log-transformed standardized T/S ratio (ln) according to cohort and genetic subgroup. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Figure 2 – Panels (a) and (c) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years for the NCI and Brazilian cohorts, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (b) and (d)** Ellipse plots of estimated age-related telomere shortening (Fig. 2a / 2c slope) *versus* estimated telomere length at birth (Fig. 2a / 2c intercept) for the NCI and Brazilian cohorts, respectively. Each point corresponds to the estimated intercept (x-axis) and slope (y-axis) of the linear model, corresponding to the indicated subgroup. Each shaded ellipses represent a joint 95% confidence region for the true intercept and slope for an indicated subgroup, and are calculated using a bivariate Normal distribution for both parameter estimators. The separation of two ellipses implies a joint statistically significant difference between the intercept-slope pairs of the two groups, at the 5% level, although a statistically significant difference may occur without separation. Under Model 1 (controlling for overall sex effect), a statistically significant difference was found in both estimated telomere length at birth ($p=0.044$, kinship linear mixed effects) and estimated age-related telomere shortening ($p=0.033$, kinship linear mixed effects) between MP and MN

groups in the Brazilian cohort. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

Figure 3 – Panels (a) and (c) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years for the MP and MN groups, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (b) and (d)** Ellipse plots of estimated age-related telomere shortening (Fig. 3a / 3c slope) *versus* estimated telomere length at birth (Fig. 3a / 3c intercept) for the MP and MN groups, respectively. Each point corresponds to the estimated intercept (x-axis) and slope (y-axis) of the linear model, corresponding to the indicated subgroup. Each shaded ellipses represent a joint 95% confidence region for the true intercept and slope for an indicated subgroup, and are calculated using a bivariate Normal distribution for both parameter estimators. The separation of two ellipses implies a joint statistically significant difference between the intercept-slope pairs of the two groups, at the 5% level, although a statistically significant difference may occur without separation. Under Model 1 (controlling for overall sex effect), a statistically significant difference was found in age-related telomere shortening between MP participants in the Brazilian and NCI cohorts ($p=0.0014$, kinship linear mixed effects). Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

Figure 4 – Bi-directional phenotypic scheme for the Brazilian founder *TP53* p.R337H mutation, highlighting detrimental effects (as compared to wild-type *TP53*) and potentially beneficial effects (as compared to other germline *TP53*

mutations). Solid arrows denote known evidences. Dashed arrows correspond to hypothetical mechanisms.

Supplementary Figure 1 - Box-plot of log-transformed standardized T/S ratio (ln) according to cohort, mutation status, and type of germline *TP53* mutation.

Supplementary Figure 2 - Panels (a) and (b) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age (years) comparing the MN-PN and MN-PP groups in the NCI and Brazilian cohorts, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (c) and (d)** Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years comparing the Brazilian and NCI cohorts in the MN-PP and MN-PN subgroups, respectively, with lines of best fit from Model 2. Abbreviations: MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Tables' Legends

Table 1 – Characteristics of study participants according to cohort, genetic group, and gender. Age is represented as median (range). Mutation-positive individuals were classified as “affected by cancer” if they had received one or more cancer diagnoses before blood draw.

Table 2 - Differences in estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) under Model 1 (controlling

for overall sex effect), with approximate 95% confidence intervals and p-values from the kinship linear mixed effects model. (*) denotes the group that was considered as baseline. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

Supplementary Table 1 - Distribution of family size within each cohort.

Supplementary Table 2 - Distribution of germline *TP53* mutations within the NCI-LFS cohort. (*) denotes stop-codons. (p.?) corresponds to unknown protein changes. Reference sequences used for annotating *TP53* mutations were NC_000017.9 (NCBI36/hg18, Chr17:7512445..7531642), NM_000546.4, and UniProt P04637 from GenBank. Mutations following the HGVS nomenclature.

Supplementary Table 3 - Median (range) of log-transformed standardized T/S ratio (ln) by cohort, genetic group, and gender.

Supplementary Table 4 - Estimated regression lines according to different genetic groups. Split analysis for MN-PP and MN-PN subgroups. Estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) from Models 1 and 2 (respectively, overall sex effect across genotype groups and no sex effect), with approximate 95% confidence intervals under the kinship linear mixed effects model. Abbreviations: M, male; F, female; MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-

negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Supplementary Table 5 - Differences in estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) under Model 1 (controlling for overall sex effect). Split analysis for MN-PP and MN-PN subgroups. Approximate 95% confidence intervals and p-values from the kinship linear mixed effects model. (*) Denotes the group that was considered as baseline. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Supplementary Table 6 - Estimated regression lines according to different genetic groups. MN-PP and MN-PN combined as a single group (MN). Estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) from Models 1 and 2 (respectively, overall sex effect across genotype groups and no sex effect), with approximate 95% confidence intervals under the kinship linear mixed effects model. Abbreviations: M, male; F, female; MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

Acknowledgments

We are grateful to all the families for their participation in our research protocols. The authors wish to thank the staff at NCI's DNA Extraction and Staging Laboratory of the Frederick National Laboratory for Cancer Research and from the Bank of Macromolecules from A.C. Camargo Cancer Center for sample handling, DNA extraction and quality control processes. We also would like to thank Aurélie Vogt from the Frederick National Laboratory for Cancer Research for her excellent study support. Janet Bracci, RN and Katherine Nichols, RN of Westat, Inc, provided excellent study support. Lisley I. Mambelli and Philip S. Rosenberg for their critical review of the manuscript. This study was supported, in part, by the intramural research program of the Division of Cancer Epidemiology and Genetics, NCI and with financial support from the National Institutes of Health 2011 Bench-to-Bedside Award. K.C.A was financially supported by a scholarship from the Sao Paulo Research Foundation (FAPESP, process number 2014/03279-9) during his work at the A.C. Camargo Cancer Center and by an international scholarship (FAPESP-BEPE, process number 2014/14319-1) during his work at the NCI.

Authors Contribution

S.A.S., M.I.A., P.H., and K.C.A. designed the study. M.I.A. and S.A.S. supervised the research. K.C.A., P.P.K., P.M., S.A.S., A.F.N., and M.I.A. actively participated in genetic counseling consultations, recruited family members, and acquired clinical data. K.T. performed the qPCR assay and its

initial output analysis. C.L.D. performed the complete analysis and control quality of the qPCR assay. A.F.B. performed the biostatistics analyses. K.C.A., A.F.B., S.M.G., C.D., K.M.S., P.P.K., F.P.F., P.H., P.M., M.I.A., and S.A.S., interpreted and discussed the results. K.C.A., A.F.B., S.M.G., K.M.S., M.I.A., and S.A.S. wrote the manuscript. All authors approved and contributed to the final version of the manuscript.

Online Methods

Study Participants

This study is part of a collaborative effort between the AC Camargo Cancer Center, Sao Paulo, Brazil and the National Cancer Institute (NCI), National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA. The Brazilian cohort included individuals who were recruited at the Department of Oncogenetics, A.C. Camargo Cancer Center - Sao Paulo/SP and most of them were already reported in previous publications^{4,6,37}. The NCI cohort included participants enrolled in the Li-Fraumeni syndrome prospective cohort study (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01443468, <http://lfs.cancer.gov>). Mutation positive (MP) participants in the Brazilian LFS cohort have the *TP53* p.R337H exclusively, while the MP group from the NCI cohort contains participants who harbor other germline *TP53* mutations (**Supplementary Table 2**). In both cohorts, the mutation negative group (MN) is comprised of wild-type *TP53* bloodline relatives and spouses who were cancer-free at the time of blood collection. In the Brazilian cohort, three affected MP participants

underwent chemotherapy treatment within one year prior to blood draw. Other treated patients, in both cohorts, either concluded chemotherapy at least one year prior to, or in some cases, started it after phlebotomy as they had received cancer diagnosis beforehand.

Ethical Issues

Written informed consent, including permission to collect and use biospecimens, was obtained from all participants from both cohorts. Parents provided written informed consent for children younger than 18 years. An assent was signed by children aged 13 to 18 years. The project was approved by the Institutional Review Board (IRB) from the NIH (NCI 11-C-0255) and by the IRB from the A.C. Camargo Cancer Center (protocol 1812/13). The shipment of Brazilian samples to the USA was approved by The Brazilian National Research Ethics Commission (CONEP –CAAE 20167913.6.1001.5432, registry 649.396).

DNA Extraction

Brazilian samples were collected between 2007 and 2011. Genomic DNA was isolated from 4 mL of peripheral blood collected in EDTA anticoagulant tubes. Samples were processed in a standardized manner by the A.C. Camargo Cancer Center Macromolecule Bank. DNA was extracted using Gentra Puregene Blood Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's recommendation.

Biospecimens from the NCI were collected between 2011 and 2015. Genomic DNA was extracted from approximately 8 mL of whole blood collected in ACD Vacutainers (Becton Dickinson) using the ReliaPrep™ Large Volume HT gDNA Isolation System (Promega) according to manufacturer's instructions.

Both Brazilian and NCI DNA samples underwent comprehensive quality control analyses at the NCI's DNA Extraction and Staging Laboratory.

Relative telomere length assay

Relative telomere length was determined by the qPCR method as previously described^{64,65} with a modified set of primers⁶⁶. Briefly, the technique measures the ratio of telomere (T) content, specific to the telomere hexamer repeat sequence (TTAGGG)_n, in relation to the reference, content (S) produced by an autosomal single-copy gene (*36B4*) generating T/S ratios. This raw T/S ratio was then divided by the average T/S ratio of internal calibrator samples, within the same plate, to yield the final standardized T/S ratio for the sample of interest. The assay was performed in triplicates and the average coefficients of variation were 0.627% (range: 0-1.881) for the telomere assay, 0.321% (range: 0-1.928) for the single copy gene assay, and 6.2% for the standardized T/S from the internal control samples.

Statistical Analyses

Statistical analyses were conducted using R version 3.1.0⁶⁷, with the MASS⁶⁸, coxme⁶⁹, kinship2⁷⁰, nlme⁷¹, and ellipse packages⁷². Telomere length was calculated by the natural log (ln) of the standardized T/S ratio to give a normal data distribution. In the primary analysis, the effect of age on telomere length was modeled as a linear trend. Familial relationships among participants were accounted for through use of linear mixed effects. As the majority of the Brazilian participants (64.4%) came from two very large families, a kinship matrix⁷³ was used for genetic factors in addition to clustering by family for environmental factors.

For each cohort, participants were first divided into two primary genetic groups: Mutation positive (MP), and mutation negative (MN). The MN group was further divided into two subgroups depending on parents' genetic status: mutation-negative from a mutation-positive parent (MN-PP) and mutation-negative from mutation-negative parents (MN-PN). Not all participants' parents' genetic information was directly available. In some cases, parents' genetic status could be directly inferred, for instance if a MN participant had a MP full sibling or married into a LFS family. In other cases, parents' genetic status was inferred based on cancer history. We considered a parent affected by cancer as mutation-positive (7 participants) as long as he/she came from the mutation-positive side of the family tree. A sensitivity analysis showed minimal impact results from these participants' categorization in either MP-PP or MN-PN, and they were all assumed to be MN-PP for subsequent analysis.

The NCI cohort contained one p.R337H family originally from Brazil which included five p.R337H mutation positive individuals; after comparing their age-unadjusted standardized T/S ratio (ln) to other groups (**Supplementary Fig. 1**), this family was considered to be a part of the Brazilian cohort for the purposes of the analysis.

Model selection based on AIC and BIC was conducted to assist in modeling the sex effect on telomere length, as well as the choice of random effect structure. A random effect of family on intercept was included, but a random effect on slope was not. Based on the participant counts in some categories (**Table 1**) and the BIC (260.1 for the interaction model vs. 225.4 when simply adjusting for sex), models including an interaction between sex and genetic group overfit the observed data. Additionally, as there were minimal differences between MN-PP and MN-PN groups within each cohort (**Supplementary Fig. 2**, and **Supplementary Tables 4** and **5**), they were recombined into a single MN group within each cohort for the final analysis, in order to avoid overfitting. The results presented arise from Model 1, which controls for an overall sex effect, and Model 2, which does not control for sex. All p-values were two-sided, and p-values < 0.05 were considered to be statistically significant.

In order to further illustrate the comparisons between cohorts and between mutation groups, ellipse plots were created. These plots display the point estimate of the slope-intercept pair (estimated telomere attrition rate-estimated telomere length at birth) with a joint 95% confidence region for these parameters, calculated using a bivariate Normal distribution for the

parameter estimators. Separation of two ellipses implies a joint statistically significant difference between the slope-intercept pairs of two groups, at the 5% level, although a statistically significant difference may occur without separation. The negative covariance between intercept and slope parameters arises because the independent variable (age) is strictly positive; an increase in intercept must be accompanied by a decrease in slope to fit the observed data, and vice versa. Analysis of variance (ANOVA) was performed to compare mean ages between groups.

A sensitivity analysis was conducted to determine the effect of the kinship matrix on inference beyond simple family clustering, and a separate analysis was performed by dichotomizing telomere length and conducting mixed effects logistic regression; in both cases, the results of the analyses were similar to that presented here.

References

1. Merino, D. & Malkin, D. p53 and hereditary cancer. *Subcell Biochem* **85** 1-16 (2014).
2. Palmero, E.I. et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* **261** 21-5 (2008).
3. Custódio, G. et al. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the TP53 R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. *J Clin Oncol* **31** 2619-26 (2013).
4. Achatz, M.I. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* **245**, 96-102 (2007).
5. Achatz, M.I.W. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters* **245**, 96-102 (2007).
6. Garritano, S. et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* **31** 143-50 (2010).

7. Bougeard, G. et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol* **33** 2345-52 (2015).
8. Petitjean, A. 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* **28**, 622-9 (2007).
9. Blackburn, E.H., Greider, C.W. & Szostak, J.W. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* **12** 1133-8 (2006).
10. Allsopp, R.C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89** 10114-8 (1992).
11. Sahin, E. & Depinho, R.A. Linking functional decline of telomeres, mitochondria and stem cells during ageing. *Nature* **464**, 520-8 (2010).
12. Daniali, L. et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* **4** 1597 (2013).
13. Friedrich, U. et al. Telomere length in different tissues of elderly patients. *Mech Ageing Dev* **119**, 89-99 (2000).
14. Haycock, P.C. et al. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. *BMJ* **349**, g4227 (2014).
15. Zhang, J. et al. Ageing and the telomere connection: An intimate relationship with inflammation. *Ageing Res Rev* **25**, 55-69 (2016).
16. Ma, H. et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS One* **6**, e20466 (2011).
17. Wentzensen, I.M., Mirabello, L., Pfeiffer, R.M. & Savage, S.A. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **20** 1238-50 (2011).
18. Calado, R.T. & Young, N.S. Telomere diseases. *N Engl J Med* **361** 2353-65 (2009).
19. Savage, S.A. & Alter, B.P. Dyskeratosis congenita. *Hematol Oncol Clin North Am* **23** 215-31 (2009).
20. Sarek, G., Marzec, P., Margalef, P. & Boulton, S.J. Molecular basis of telomere dysfunction in human genetic diseases. *Nat Struct Mol Biol* **22**, 867-74 (2015).
21. Rehkopf, D.H. et al. Longer leukocyte telomere length in Costa Rica's Nicoya Peninsula: a population-based study. *Exp Gerontol* **48** 1266-73 (2013).
22. Tedone, E. et al. Leukocyte telomere length and prevalence of age-related diseases in semisupercentenarians, centenarians and centenarians' offspring. *Exp Gerontol* **58**, 90-5 (2014).
23. Bakaysa, S.L. et al. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. *Aging Cell* **6**, 769-74 (2007).
24. Terry, D.F., Nolan, V.G., Andersen, S.L., Perls, T.T. & Cawthon, R. Association of longer telomeres with better health in centenarians. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 809-12 (2008).
25. Trkova, M., Prochazkova, K., Krutikova, V., Sumerauer, D. & Sedlacek, Z. Telomere length in peripheral blood cells of germline

- TP53 mutation carriers is shorter than that of normal individuals of corresponding age. *Cancer* **110**, 694-702 (2007).
26. Tabori, U., Nanda, S., Druker, H., Lees, J. & Malkin, D. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Res* **67** 1415-8 (2007).
 27. Pinto, C. et al. TP53 germline mutations in Portugal and genetic modifiers of age at cancer onset. *Fam Cancer* **8**, 383-90 (2009).
 28. Bond, G.L. et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. *Cell* **119**, 591-602 (2004).
 29. Bond, G.L., Hu, W. & Levine, A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. *Cancer Res* **65**, 5481-4 (2005).
 30. Bougeard, G. et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *J Med Genet* **43**, 531-3 (2006).
 31. Marcel, V. et al. TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* **46**, 766-72 (2009).
 32. Shlien, A. et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105** 11264-9 (2008).
 33. DiGiammarino, E.L. et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* **9** 12-6 (2002).
 34. Ribeiro, R.C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9330-5 (2001).
 35. Hainaut, P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. *Nat Med* **8** 21-3 (2002).
 36. Macedo, G.S. et al. Increased oxidative damage in carriers of the germline TP53 p.R337H mutation. *PLoS One* **7**, e47010 (2012).
 37. Silva, A.G., Achatz, I.M., Krepischi, A.C., Pearson, P.L. & Rosenberg, C. Number of rare germline CNVs and TP53 mutation types. *Orphanet J Rare Dis* **7** 101 (2012).
 38. Paskulin, D.D. et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. *PLoS One* **10**, e0143262 (2015).
 39. Broer, L. et al. Meta-analysis of telomere length in 19,713 subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* **21** 1163-8 (2013).
 40. Codd, V. et al. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat Genet* **42** 197-9 (2010).
 41. Codd, V. et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease. *Nat Genet* **45**, 422-7, 427e1-2 (2013).

42. Levy, D. et al. Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9293-8 (2010).
43. Mangino, M. et al. Genome-wide meta-analysis points to CTC1 and ZNF676 as genes regulating telomere homeostasis in humans. *Hum Mol Genet* **21**, 5385-94 (2012).
44. Mangino, M. et al. DCAF4, a novel gene associated with leucocyte telomere length. *J Med Genet* **52** 157-62 (2015).
45. Atzmon, G. et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107 Suppl 1** 1710-7 (2010).
46. Artandi, S.E. & DePinho, R.A. Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* **31**, 9-18 (2010).
47. Sahin, E. & DePinho, R.A. Axis of ageing: telomeres, p53 and mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 397-404 (2012).
48. Rufini, A., Tucci, P., Celardo, I. & Melino, G. Senescence and aging: the critical roles of p53. *Oncogene* **32**, 5129-43 (2013).
49. Eisenberg, D.T. et al. Substantial variation in qPCR measured mean blood telomere lengths in young men from eleven European countries. *Am J Hum Biol* **23** 228-31 (2011).
50. Aviv, A. The epidemiology of human telomeres: faults and promises. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **63**, 979-83 (2008).
51. Chen, W. et al. Longitudinal versus cross-sectional evaluations of leukocyte telomere length dynamics: age-dependent telomere shortening is the rule. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **66**, 312-9 (2011).
52. Steenstrup, T., Hjelmborg, J.V., Kark, J.D., Christensen, K. & Aviv, A. The telomere lengthening conundrum--artifact or biology? *Nucleic Acids Res* **41**, e131 (2013).
53. Sanders, J.L. & Newman, A.B. Telomere length in epidemiology: a biomarker of aging, age-related disease, both, or neither? *Epidemiol Rev* **35** 112-31 (2013).
54. Zhang, X., Lin, S., Funk, W.E. & Hou, L. Environmental and occupational exposure to chemicals and telomere length in human studies. *Postgrad Med J* **89**, 722-8 (2013).
55. Starkweather, A.R. et al. An integrative review of factors associated with telomere length and implications for biobehavioral research. *Nurs Res* **63**, 36-50 (2014).
56. Cassidy, A. et al. Associations between diet, lifestyle factors, and telomere length in women. *Am J Clin Nutr* **91** 1273-80 (2010).
57. Lin, J., Epel, E. & Blackburn, E. Telomeres and lifestyle factors: roles in cellular aging. *Mutat Res* **730**, 85-9 (2012).
58. Shamas, M.A. Telomeres, lifestyle, cancer, and aging. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* **14** 28-34 (2011).
59. Sun, Q. et al. Healthy lifestyle and leukocyte telomere length in U.S. women. *PLoS One* **7**, e38374 (2012).

60. Nussey, D.H. et al. Measuring telomere length and telomere dynamics in evolutionary biology and ecology. *Methods Ecol Evol* **5** 299-310 (2014).
61. Beeharry, N. & Broccoli, D. Telomere dynamics in response to chemotherapy. *Curr Mol Med* **5** 187-96 (2005).
62. Cunningham, J.M. et al. Telomere length varies by DNA extraction method: implications for epidemiologic research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **22** 2047-54 (2013).
63. Hofmann, J.N. et al. Telomere length varies by DNA extraction method: implications for epidemiologic research-letter. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **23** 1129-30 (2014).
64. Cawthon, R.M. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* **30**, e47 (2002).
65. Cawthon, R.M. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. *Nucleic Acids Res* **37**, e21 (2009).
66. Callicott, R.J. & Womack, J.E. Real-time PCR assay for measurement of mouse telomeres. *Comp Med* **56** 17-22 (2006).
67. R Core Team (2015). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
68. Venables, W. N. & Ripley, B. D. (2002) Modern Applied Statistics with S. Fourth Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-05.
69. Terry M. Therneau (2015). coxme: Mixed Effects Cox Models. R package version 2.2-5.
70. Terry M Therneau and Jason Sinnwell (2015). kinship2: Pedigree Functions. R package version 1.6.4.
71. Pinheiro J, Bates D, DebRoy S, Sarkar D and R Core Team (2015). _nlme: Linear and Nonlinear Mixed Effects Models_. R package version 3.1-121
72. Duncan Murdoch and E. D. Chow (2013). ellipse: Functions for drawing ellipses and ellipse-like confidence regions. R package version 0.3-8
73. Sul, J H and Eskin, E. Mixed models can correct for population structure for genomic regions under selection. *Nature Reviews Genetics* **14**, 300 (2-13)

FIGURES AND TABLES – MAIN DOCUMENT

Table 1

Characteristics	<i>TP53</i> Mutation Positive	Mutation Negative (Parent Positive)	Mutation Negative (Parent Negative)	Total (n)
NCI (44 families)				
Number of participants (n)	65	12	20	97
Age	38 (5-68)	38 (3-70)	46.5 (26-60)	
Gender				
Males (n)	18	7	12	37
Age	33.5 (11-59)	31 (3-52)	48 (27-59)	
Affected by cancer (%)	8 (44.4)	-	-	
Females (n)	47	5	8	60
Age	39 (5-68)	55 (20-70)	45.5 (26-60)	
Affected by cancer (%)	35 (74.5)	-	-	
Brazil (27 families)				
Number of participants (n)	66	39	41	146
Age	38.5 (4-75)	37 (16-84)	45 (13-75)	
Gender				
Males (n)	20	16	15	51
Age	31 (4-68)	37 (16-66)	50 (20-71)	
Affected by cancer (%)	4 (20)	-	-	
Females (n)	46	23	26	95
Age	41.5 (6-75)	38 (18-84)	42 (13-75)	
Affected by cancer (%)	26 (56.5)	-	-	
Total (n)	131	51	61	243

Legend: Characteristics of study participants according to cohort, genetic group, and gender. Age is represented as median (range). Mutation-positive individuals were classified as “affected by cancer” if they had received one or more cancer diagnoses before blood draw.

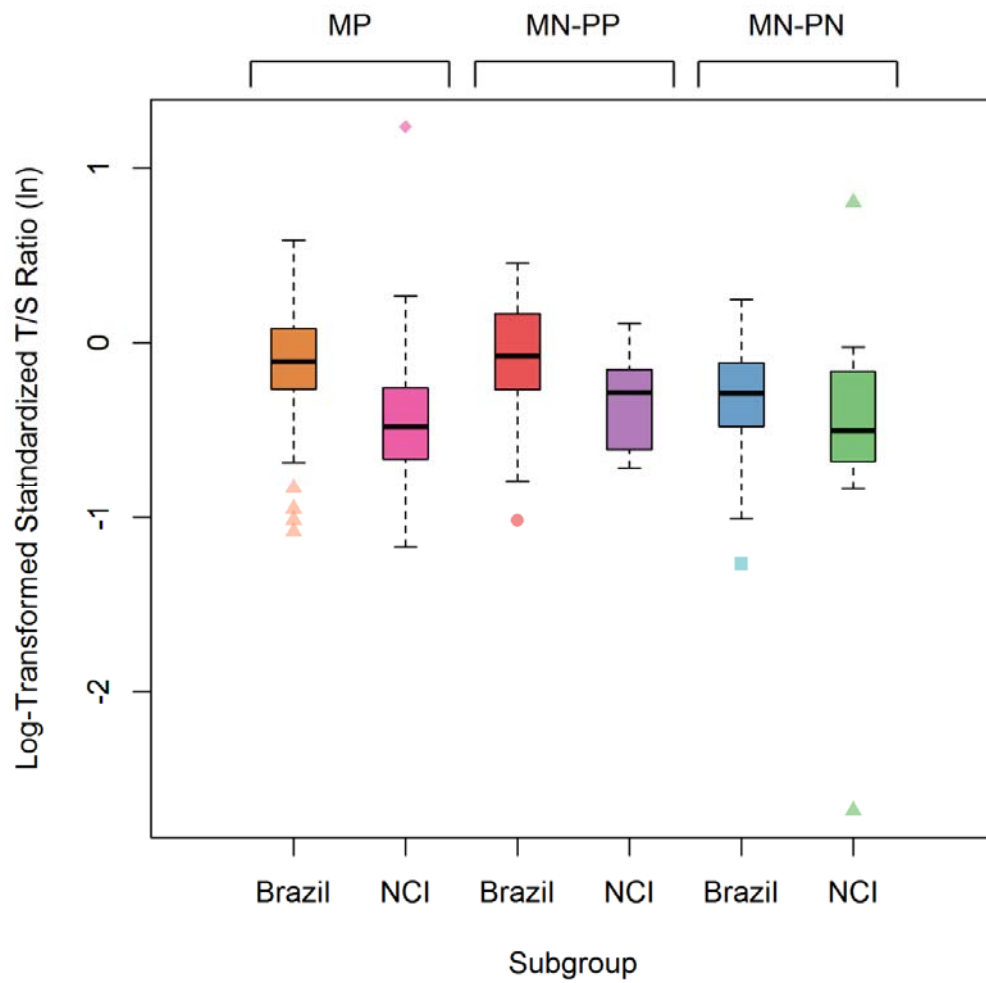
Figure 1

Figure 1 - Box-plot of log-transformed standardized T/S ratio (ln) according to cohort and genetic subgroup. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Figure 2

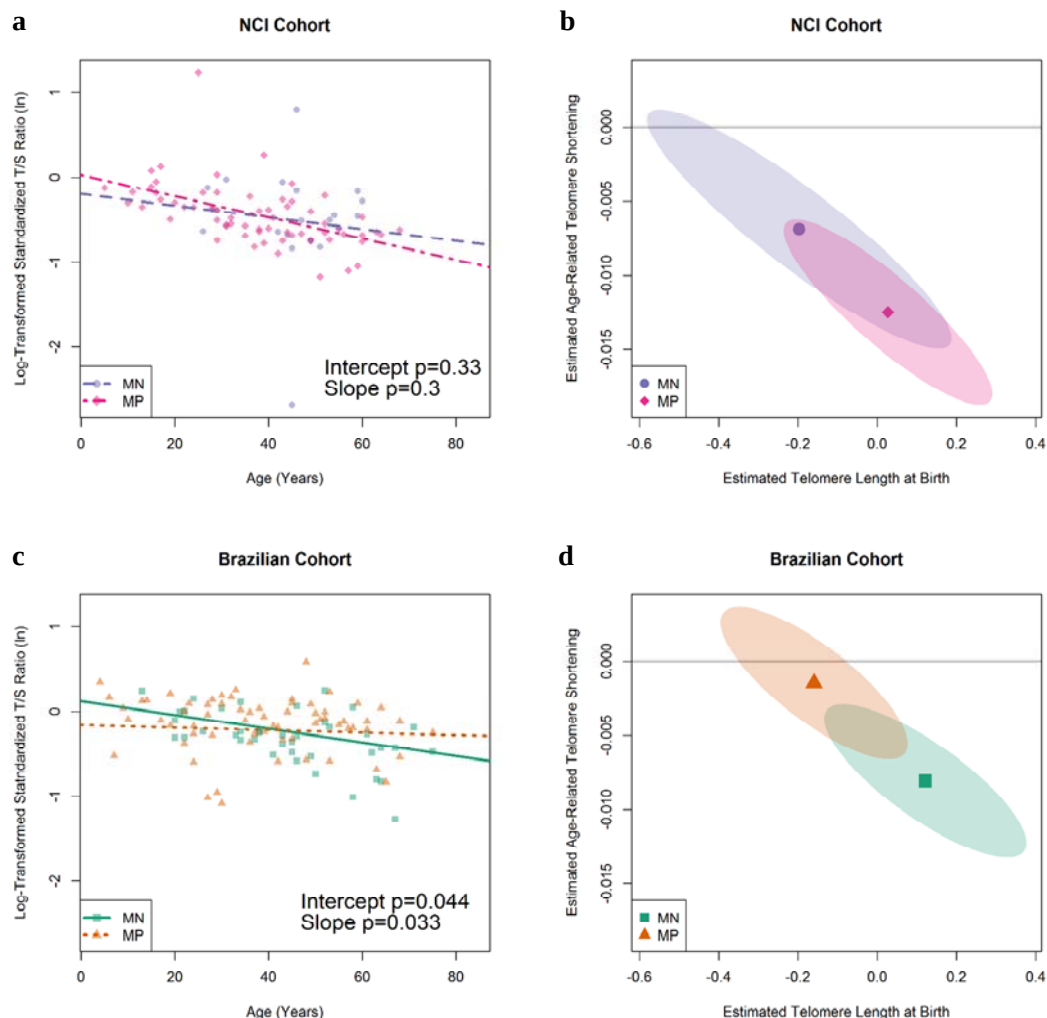


Figure 2 – Panels (a) and (c) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years for the NCI and Brazilian cohorts, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (b) and (d)** Ellipse plots of estimated age-related telomere shortening (Fig. 2a / 2c slope) versus estimated telomere length at birth (Fig. 2a / 2c intercept) for the NCI and Brazilian cohorts, respectively. Each point corresponds to the estimated intercept (x-axis) and slope (y-axis) of the linear model, corresponding to the indicated subgroup. Each shaded ellipses represent a joint 95% confidence region for the true intercept and slope for an indicated subgroup, and are calculated using a bivariate Normal distribution for both parameter estimators. The separation of two ellipses implies a joint statistically significant difference between the intercept-slope pairs of the two groups, at the 5% level, although a statistically significant difference may occur without separation. Under Model 1 (controlling for overall sex effect), a statistically significant difference was found in both estimated telomere length at birth ($p=0.044$, kinship linear mixed effects) and estimated age-related telomere shortening ($p=0.033$, kinship linear mixed effects) between MP and MN groups in the Brazilian cohort. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

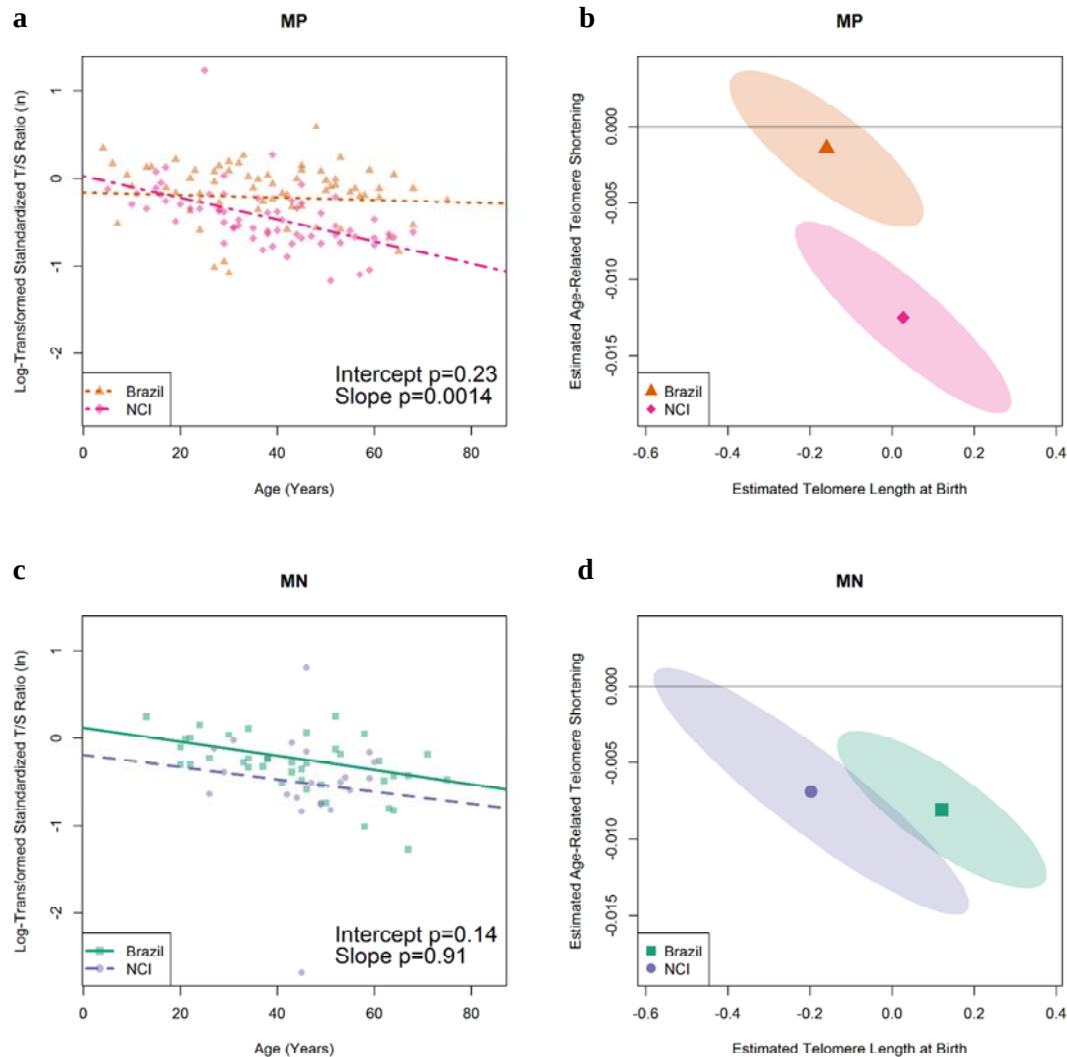
Figure 3

Figure 3 – Panels (a) and (c) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years for the MP and MN groups, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (b) and (d)** Ellipse plots of estimated age-related telomere shortening (Fig. 3a / 3c slope) *versus* estimated telomere length at birth (Fig. 3a / 3c intercept) for the MP and MN groups, respectively. Each point corresponds to the estimated intercept (x-axis) and slope (y-axis) of the linear model, corresponding to the indicated subgroup. Each shaded ellipses represent a joint 95% confidence region for the true intercept and slope for an indicated subgroup, and are calculated using a bivariate Normal distribution for both parameter estimators. The separation of two ellipses implies a joint statistically significant difference between the intercept-slope pairs of the two groups, at the 5% level, although a statistically significant difference may occur without separation. Under Model 1 (controlling for overall sex effect), a statistically significant difference was found in age-related telomere shortening between MP participants in the Brazilian and NCI cohorts ($p=0.0014$, kinship linear mixed effects). Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

Table 2

Cohort	Group	Estimated Effect on Telomere Length at Birth	p-value	95% Confidence Interval	Estimated Effect on Age-Related Telomere Shortening	p-value	95% Confidence Interval
NCI	MP vs. MN*	0.1830	0.33	(-0.1814, 0.5473)	-0.0045	0.3	(-0.0131, 0.0040)
Brazil	MP vs. MN*	-0.2694	0.044	(-0.5311, -0.0077)	0.0064	0.033	(0.0005, 0.0123)
NCI* vs. Brazil	MP	-0.1716	0.23	(-0.4538, 0.1106)	0.0105	0.0014	(0.0041, 0.0170)
	MN	0.2808	0.14	(-0.0960, 0.6575)	-0.0004	0.91	(-0.0082, 0.0073)
NCI & Brazil	Females vs. Males*	0.1170	0.26	(-0.0878, 0.3218)	-0.0033	0.18	(-0.0080, 0.0015)

Legend - Differences in estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) under Model 1 (controlling for overall sex effect), with approximate 95% confidence intervals and p-values from the kinship linear mixed effects model. (*) denotes the group that was considered as baseline. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN, mutation-negative

Figure 4

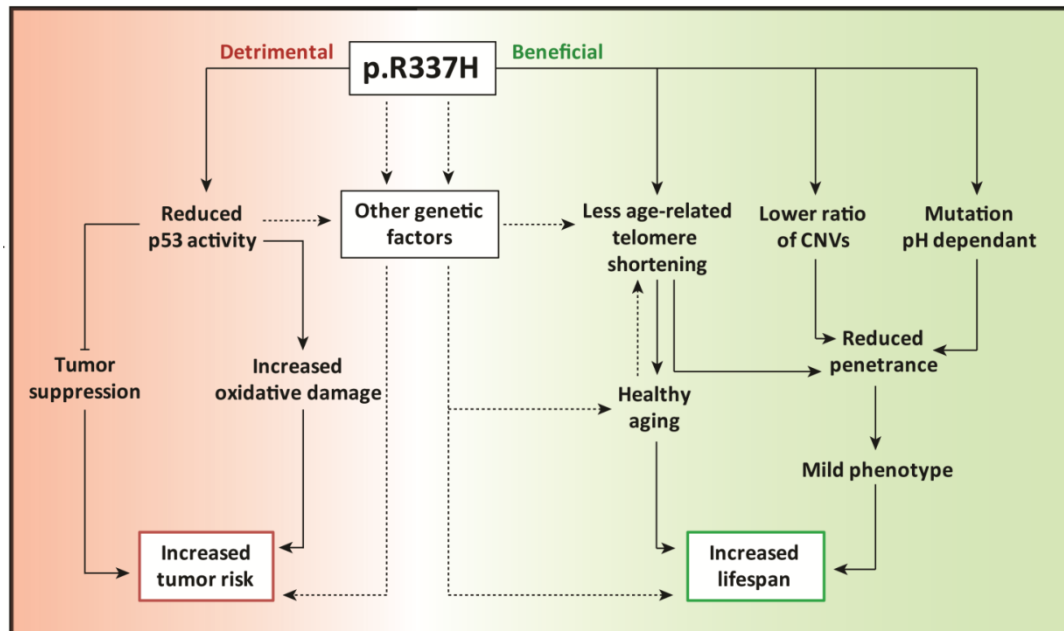
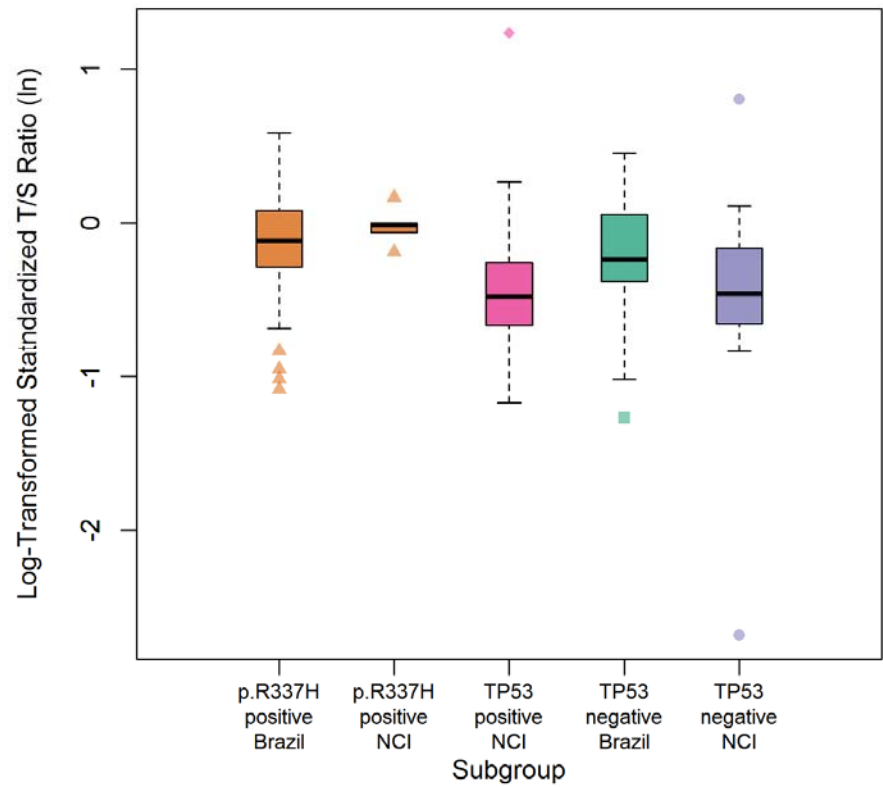


Figure 4 – Bi-directional phenotypic scheme for the Brazilian founder *TP53* p.R337H mutation, highlighting detrimental effects (as compared to wild-type *TP53*) and potentially beneficial effects (as compared to other germline *TP53* mutations). Solid arrows denote known evidences. Dashed arrows correspond to hypothetical mechanisms.

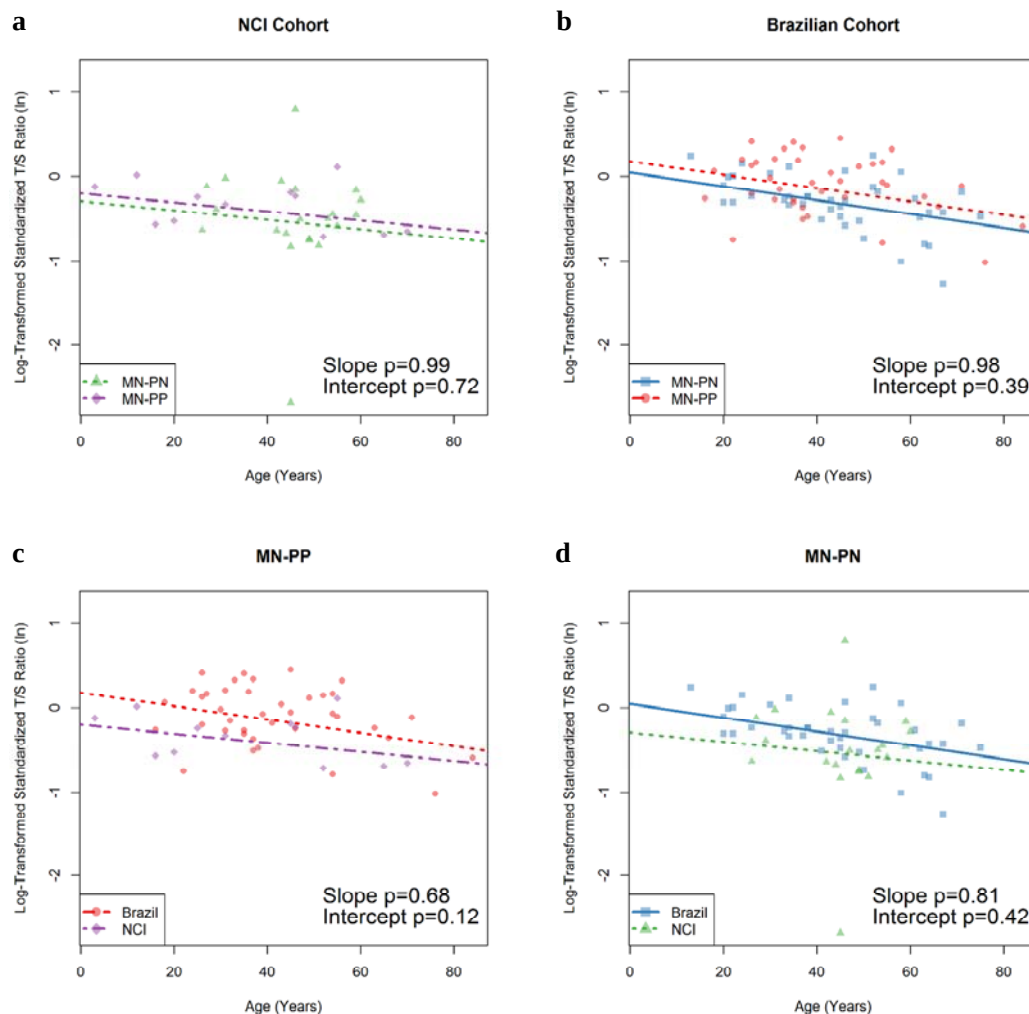
SUPPLEMENTARY FIGURES AND TABLES

Supplementary Figure 1



Legend - Box-plot of log-transformed standardized T/S ratio (ln) according to cohort, mutation status, and type of germline *TP53* mutation.

Supplementary Figure 2



Legend - Panels (a) and (b) Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age (years) comparing the MN-PN and MN-PP groups in the NCI and Brazilian cohorts, respectively, with lines of best fit from Model 2. **Panels (c) and (d)** Scatterplots of log-transformed standardized T/S ratio (ln) vs. age in years comparing the Brazilian and NCI cohorts in the MN-PP and MN-PN subgroups, respectively, with lines of best fit from Model 2. Abbreviations: MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Supplementary Table 1 - Distribution of family size within each cohort.

Cohort	Family Size	Families (n)	Total Individuals (n)	Percent (%)
NCI	1	20	20	20.6
	2	9	18	18.6
	3	7	21	21.6
	4	4	16	16.5
	5	2	10	10.3
	6	2	12	12.4
	Total	44	97	100
Brazil	1	16	16	11.0
	2	2	4	2.7
	3	3	9	6.2
	5	1	5	3.4
	6	3	18	12.3
	27	1	27	18.5
	67	1	67	45.9
	Total	27	146	100

Supplementary Table 2

Nucleotide change	Protein change	Frequency
c.818G>A	p.Arg273His	10
c.541C>T	p.Arg181Cys	4
c.375G>A	p. Thr125Thr	3
c.1024C>T	p.Arg342*	3
c.1040C>A	p.Ala347Asp	3
c.326delTinsCCCAA	p.Phe109Serfs*41	2
c.455C>T	p. Pro152Leu	2
c.473C>A	p.Arg158His	2
c.487T>C	p.Tyr163His	2
c.542G>A	p.Arg181His	2
c.577C>T	p.His193Tyr	2
c.655C>T	p.Pro219Ser	2
c.717C>G	p.Asn239Lys	2
c.743G>A	p.Arg248Gln	2
c.742C>T	p.Arg248Trp	2
c.800 G>A	p.Arg267Gln	2
c.916C>T	p.Arg306*	2
c.? _-28-1del	p.?	1
c.(?-1)_(*1?)del	p.Met1_393Aspdel	1
c.-29+1G>T	p.?	1
c.95_96delinsCTT	p.?	1
c.96+1G>C	p.?	1
c.(672+1_673-1)_(993+1_994-1)del	p.Val225_331GIndel	1
c.559+1G>A	p.?	1
c.329G>T	p.Arg110Leu	1
c.389T>C	p.Leu130Pro	1
c.452C>A	p.Pro151Arg	1
c.493C>T	p.Gln165*	1
c.524G>A	p.Arg175His	1
c.580C>T	p.Leu194Phe	1
c.586C>T	p.Arg196*	1
c.637C>T	p.Arg213*	1
c.711G>A	p.Met237Ile	1
c.733G>A	p.Gly245Ser	1
c.821T>C	p.Val274Ala	1

Legend - Distribution of germline *TP53* mutations within the NCI-LFS cohort. (*) denotes stop-codons. (p.?) corresponds to unknown protein changes. Reference sequences used for annotating *TP53* mutations were NC_000017.9 (NCBI36/hg18, Chr17:7512445..7531642), NM_000546.4, and UniProt P04637 from GenBank. Mutations following the HGVS nomenclature.

Supplementary Table 3

Log-Transformed Standardized T/S ratio (ln)			
Cohort	<i>TP53</i> Mutation Positive	Mutation Negative (Parent Positive)	Mutation Negative (Parent Negative)
NCI			
Overall	-0.5 (-1.17 , 1.23)	-0.3 (-0.71 , 0.11)	-0.5 (-2.68 , 0.8)
Male	-0.42 (-1.05 , - 0.05)	-0.23 (-0.71 , 0.02)	-0.48 (-0.82 , -0.02)
Female	-0.5 (-1.17 , 1.23)	-0.53 (-0.69 , 0.11)	-0.57 (-2.68 , 0.8)
Brazil			
Overall	-0.1 (-1.09 , 0.58)	-0.1 (-1.02 , 0.45)	-0.3 (-1.27 , 0.25)
Male	-0.11 (-0.95 , 0.35)	-0.25 (-0.79 , 0.34)	-0.27 (-0.80 , 0.25)
Female	-0.10 (-1.09 , 0.58)	0.07 (-1.02 , 0.45)	-0.30 (-1.27 , 0.24)

Legend - Median (range) of log-transformed standardized T/S ratio (ln) by cohort, genetic group, and gender.

Supplementary Table 4

		Model 1 (Overall sex effect)				Model 2 (No sex effect)			
Genetic Group	Gender	Estimated Telomere Length at Birth	95% Confidence Interval	Estimated Age- Related Telomere Shortening	95% Confidence Interval	Estimated Telomere Length at Birth	95% Confidence Interval	Estimated Age- Related Telomere Shortening	95% Confidence Interval
NCI									
MP	M	-0.0807	(-0.3365, 0.1751)	-0.0092	(-0.0153, -0.0030)	0.0273	(-0.1900, 0.2446)	-0.0123	(-0.0175, -0.0072)
	F	0.0807	(-0.1468, 0.3081)	-0.0136	(-0.0190, -0.0083)				
MN-PP	M	-0.2659	(-0.5923, 0.0798)	-0.0031	(-0.0093, 0.0030)	-0.2031	(-0.5400, 0.1338)	-0.0053	(-0.0138, 0.0032)
	F	-0.0949	(-0.4585, 0.2686)	-0.0076	(-0.0164, 0.0013)				
MN-PN	M	-0.3875	(-1.0921, 0.3171)	-0.0032	(-0.0181, 0.0117)	-0.2941	(-0.9923, 0.4042)	-0.0055	(-0.0203, 0.0092)
	F	-0.2262	(-0.9294, 0.4771)	-0.0077	(-0.0225, 0.0072)				
Brazil									
MP	M	-0.2687	(-0.5008, -0.0367)	0.0021	(-0.0031, 0.0073)	-0.1765	(-0.3757, 0.0228)	-0.0006	(-0.0050, 0.0039)
	F	-0.1074	(-0.3253, 0.1105)	-0.0024	(-0.0072, 0.0025)				
MN-PP	M	0.0850	(-0.2219, 0.3919)	-0.0053	(-0.0140, 0.0035)	0.1758	(-0.1068, 0.4584)	-0.0079	(-0.0139, -0.0018)
	F	0.2464	(-0.0461, 0.5389)	-0.0097	(-0.0160, -0.0034)				
MN-PN	M	-0.0816	(-0.4251, 0.2620)	-0.0051	(-0.0119, 0.0016)	0.0455	(-0.2531,0.3441)	-0.0082	(-0.0141,-0.0022)
	F	0.0798	(-0.2201, 0.3797)	-0.0096	(-0.0157, -0.0034)				

Legend - Estimated regression lines according to different genetic groups. Split analysis for MN-PP and MN-PN subgroups. Estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) from Models 1 and 2 (respectively, overall sex effect across genotype groups and no sex effect), with approximate 95% confidence intervals under the kinship linear mixed effects model. Abbreviations: M, male; F, female; MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Supplementary Table 5

Cohort	Group	Estimated Effect on Telomere Length at Birth	p-value	95% Confidence Interval	Estimated Effect on Age-Related Telomere Shortening	p-value	95% Confidence Interval
NCI	MN-PN* vs.MP	0.307	0,4	(-0.4135 1.0272)	-0.006	0,45	(-0.0214, 0.0095)
	MN-PN* vs. MN-PP	0.131	0,72	(-0.5743, 0.8368)	0.000	0,99	(-0.0157, 0.0159)
Brazil	MN-PN* vs. MP	-0.187	0,28	(-0.5247, 0.1503)	0.007	0,058	(-0.0002, 0.0146)
	MN-PN* vs. MN-PP	0.167	0,39	(-0.2153, 0.5485)	0.000	0,98	(-0.0082, 0.0080)
NCI* vs. Brazil	MN-PN	0.306	0,42	(-0.4382 1.0501)	-0.002	0,81	(-0.0174, 0.0135)
	MP	-0.188	0,2	(-0.4738, 0.0977)	0.011	0,0008	(0.0046, 0.0178)
	MP-PP	0.341	0,12	(-0.0876, 0.7702)	-0.002	0,68	(-0.0122, 0.0079)
NCI & Brazil	Females vs. Males*	0.161	0,13	(-0.0465, 0.3691)	-0.004	0,074	(-0.0093, 0.0004)

Legend - Differences in estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) under Model 1 (controlling for overall sex effect). Split analysis for MN-PP and MN-PN subgroups. Approximate 95% confidence intervals and p-values from the kinship linear mixed effects model. (*) Denotes the group that was considered as baseline. Abbreviations: MP, mutation-positive; MN-PP, mutation-negative from a mutation-positive parent; MN-PN: mutation-negative from a mutation-negative parent.

Supplementary Table 6

Model 1 (Overall sex effect)						Model 2 (No sex effect)			
Genetic Group	Gender	Estimated Telomere Length at Birth	95% Confidence Interval	Estimated Age-Related Telomere Shortening	95% Confidence Interval	Estimated Telomere Length at Birth	95% Confidence Interval	Estimated Age-Related Telomere Shortening	95% Confidence Interval
NCI									
MP	M	-0.0500	(-0.3033, 0.2033)	-0.0102	(-0.0163, -0.0042)	0.0272	(-0.1879, 0.2423)	-0.0125	(-0.0176, -0.0074)
	F	0.0670	(-0.1597, 0.2937)	-0.0135	(-0.0188, 0.0483)				
MN	M	-0.2330	(-0.5511, 0.0851)	-0.0057	(-0.0125, 0.0011)	-0.1968	(-0.5110, 0.1175)	-0.0069	(-0.0135, -0.0003)
	F	-0.1160	(-0.4607, 0.2287)	-0.0090	(-0.0162, -0.0017)				
Brazil									
MP	M	-0.2216	(-0.4475, 0.0042)	0.0003	(-0.0046, 0.0052)	-0.1594	(-0.3525, 0.0338)	-0.0015	(-0.0057, 0.0027)
	F	-0.1047	(-0.3192, 0.1099)	-0.0030	(-0.0077, 0.0018)				
MN	M	0.0478	(-0.2064,0.3020)	-0.0061	(-0.0113, -0.0010)	0.1214	(-0.0872, 0.3301)	-0.0081	(-0.0123,-0.0039)
	F	0.1648	(-0.0555, 0.3850)	-0.0094	(-0.0141, -0.0048)				

Legend - Estimated regression lines according to different genetic groups. MN-PP and MN-PN combined as a single group (MN). Estimated telomere length at birth (intercept) and estimated age-related telomere shortening (slope) from Models 1 and 2 (respectively, overall sex effect across genotype groups and no sex effect), with approximate 95% confidence intervals under the kinship linear mixed effects model. Abbreviations: M, male; F, female; MP, mutation-positive; MN, mutation-negative.

4 METODOLOGIA SUPLEMENTAR

4.1 APROVAÇÃO ÉTICA

Este protocolo de pesquisa recebeu aprovação do comitê de ética em pesquisa do A.C. Camargo Cancer Center (protocolo 1812/13, projeto temático, Anexo 1; projeto afiliado, 1812/13B, Anexo 2) e do NIH (protocolo NCI 11-C-0255, Anexo 3). O envio de material biológico ao exterior foi aprovado pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob número CAAE 20167913.6.1001.5432 (Anexo 4).

4.2 AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

A integridade do DNA de todas as amostras provenientes do A.C. Camargo Cancer Center foi verificada em gel de eletroforese pelo Banco de Macromoléculas da instituição (protocolos de extração e armazenamento aprovados pela CONEP sob número B-001). Apenas amostras classificadas como “excelentes” e “ótimas” foram selecionadas.

4.3 PROCESSO DE ESTADIAMENTO

Um total de 141 amostras (61 portadores da mutação p.R337H e 80 controles) foram enviadas ao *National Cancer Institute* (NCI) – campus de

Frederick/MD para estadiamento, processo cujo objetivo foi verificar a qualidade do DNA e, conseqüentemente, a sua viabilidade para o ensaio do comprimento telomérico. Este processo foi composto por duas etapas principais: checagem de volume e quantificação de DNA, e o ensaio *AmpF ℓ STR[®] Identifier[®]*.

4.3.1 Checagem do volume e quantificação do DNA

Para checagem do volume, foi utilizado o detector de nível líquido *BioMicroLab Volume Check 100* que utiliza tecnologia ultrasônica para medir a distância entre o sensor e a altura do menisco de cada amostra, extrapolando o valor com base em uma tabela de calibração. Após a determinação do volume, cada amostra (2 μ l) passou por uma etapa de quantificação inicial para assegurar que estavam dentro de um intervalo aceitável de concentração e quantidade de DNA (≤ 17 μ g). Para isso, foi utilizado o espectrofotômetro *DropSense 96*. Na sequência, as amostras passaram por uma nova etapa de quantificação, com o ensaio *QuantiFluor dsDNA*, para determinar a quantidade de DNA dupla fita (dsDNA, do inglês double-strand DNA) em cada amostra.

4.3.2 Ensaio *AmpFℓSTR® Identifier®*

Todas as amostras processadas foram geneticamente perfiladas utilizando-se o kit de amplificação por PCR *AmpFℓSTR® Identifier®* de acordo com as especificações sugeridas pelo fabricante e padronizadas pelo NCI. A metodologia é baseada em reações de PCR-Multiplex que amplificam curtas repetições em tandem (STR, do inglês *short tandem repeats*), fornecendo uma “impressão digital” genética para uma amostra específica de DNA. Quinze *loci* STR e o *locus* da Amelogenina (o qual é utilizado para determinação de gênero) foram amplificados. Os quinze *loci* STR são: CSF1PO, D3S1358, D5S818, D7S820, D8S1179, D13S317, D16S539, D18S51, D21S11, FGA, TH01, TPOX, SVA, D2S1338 e D19S433. Cada um destes *locus* STR representa uma região de repetição de tetranucleotídeos.

Os fragmentos foram separados por eletroforese e detectados por meio de quatro corantes fluorescentes ligados aos *primers*. Os tamanhos dos produtos da PCR foram comparados aos padrões de DNA marcados com tamanhos conhecidos (de 75 a 500 bases) adicionados a cada poço da amostra. O genótipo em cada *locus* foi determinado por conversão do tamanho do produto da PCR com o auxílio de uma escala que continha todos os alelos comuns previamente descritos. Os dados finais foram analisados no *Software GeneMapper™* 4.0.

Com base nestes 15 loci altamente polimórficos, a probabilidade de dois indivíduos, não relacionados, apresentarem perfis genéticos idênticos é extremamente pequena. Os resultados deste ensaio foram utilizados na etapa de pré-genotipagem como controle de qualidade. Para que as

amostras fossem aprovadas e pudessem prosseguir para os ensaios de qPCR, além da inexistência de duplicadas inesperadas ou amostras redundantes, a informação quanto ao gênero, previamente enviada ao laboratório, deveria apresentar perfil genético concordante ao identificado pelo controle de qualidade.

4.4 AVALIAÇÃO DO COMPRIMENTO TELOMÉRICO

Para determinar o comprimento relativo dos telômeros, utilizamos a técnica de qPCR (do inglês, quantitative polymerase chain reaction) (CAWTHON 2002 e 2009). Este ensaio mede a abundância de amplificação de sequência telomérica (T) em comparação à abundância de amplificação de sequência única (gene *36B4*) específica de tamanho conhecido (S). Ambos os valores são comparados a um DNA de referência para se obter razões relativas entre T/S que são proporcionais ao comprimento médio dos telômeros.

A montagem da placa de ensaio (Figura 2) se iniciou a partir da adição de quatro ng de DNA em placas LightCycler de 384 poços (Roche, Indianapolis, IN) que foram posteriormente secas por meio de um dissecador. As curvas-padrão foram criadas a partir de seis concentrações de amostras de DNA, preparadas por diluições seriadas (com intervalo de 100 vezes nas concentrações: de 4ng/μl a 0,4 ng/μl). Um poço vazio foi deixado ao acaso como controle negativo (NTC, do inglês no template control) e em outros cinco, amostras de controle interno geradas

previamente para a padronização dos dados e para indicar a qualidade geral do ensaio. Os ensaios foram realizados em triplicatas. Duas placas idênticas foram criadas: “Telômero” e “36B4”.

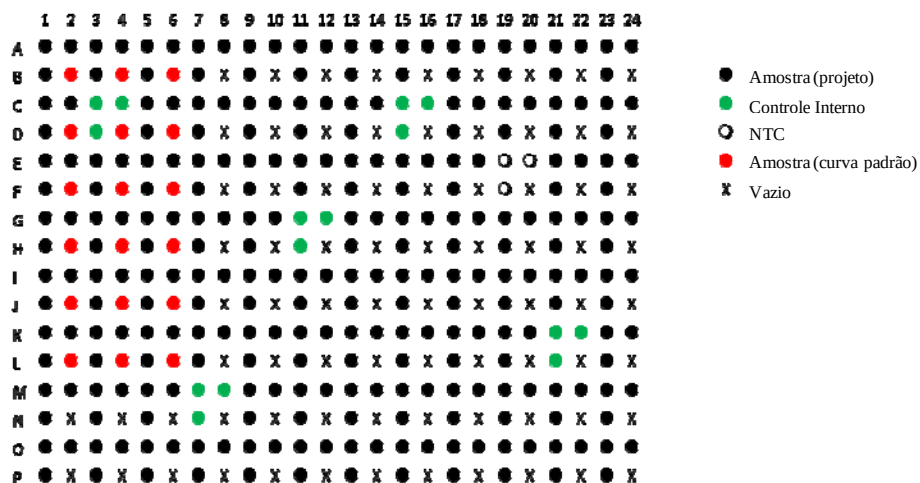


Figura 2 - Distribuição das amostras na placa de ensaio qPCR.

Os *primers* utilizados foram: “Telômero” *forward* [5'-CGGTTT(GTTTGG)₅GTT- 3'] e “Telômero” *reverse* [5'-GGCTTG(CCTTAC)₅CCT-3']; “36B4” *forward* [5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'] e “36B4” *reverse* [5'-CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA- 3']. O ensaio “Telômero” foi específico para a sequência (TTAGGG)_n enquanto o ensaio “36B4” foi referente ao gene de cópia única que foi utilizado para normalização. Ambos ensaios tiveram um volume total de 5 µl para cada reação (Tabela 1).

Tabela 1 - Reagentes utilizados nos ensaios de qPCR

Componente	Quantidade por reação (µl)
4ng de DNA	-
Água ultrapura Milli-Q®	2,0
SYBR Green PCR Master Mix®	2,5
Mix de <i>primers assay</i> -específico	0,5
Volume total	5,0

Com exceção do Mastermix, que foi preparado manualmente, todas as outras etapas de plaqueamento foram realizadas na estação automatizada Biomek FX - 96 Span - 8. As placas foram cicladas termicamente de acordo com a Tabela 2 e analisadas utilizando-se o aparelho LightCycler 480 (Versão 15.0).

Tabela 2 - Condições da ciclagem

Ensaio	Etapas	Temperatura (°C)	Tempo	Ciclos
Telômero	1	95	5 minutos	<i>Hold</i>
	2	98	15 segundos	35
		54	2 minutos	
36B4	1	98	5 minutos	<i>Hold</i>
	2	98	15 segundos	43
		58	1 minuto	

5 COMENTÁRIOS ADICIONAIS

Estabelecemos uma colaboração com a Dra. Patrícia Ashton-Prolla, chefe do serviço de Oncogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e professora do departamento de Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), que também é integrante do protocolo financiado pelo programa *Bench-to-Bedside* do NIH. A Dra. Ashton-Prolla enviou aos EUA cerca de 100 amostras (de 50 portadores p.R337H e 50 familiares não portadores) após o termino destas análises para que nossos resultados sejam validados em uma outra coorte de portadores da mutação p.R337H. O ensaio de qPCR já foi realizado e a análise está em andamento (informação atualizada em 22 de Fevereiro de 2016).

6 CONCLUSÕES

- Não foram identificadas diferenças significativas nos parâmetros analisados entre os diferentes grupos controles separados de acordo com o perfil genético dos pais. Portanto, estes participantes foram agrupados em um único grupo dentro de cada coorte para as análises subsequentes.
- Na coorte brasileira, identificamos diferenças estatisticamente significativas quando comparamos portadores da mutação p.R337H e o grupo controle: - Os portadores da mutação p.R337H apresentaram menor valor estimado de encurtamento telomérico relacionado à idade, possivelmente devido a um efeito modificador de risco associado à mutação p.R337H.
- Os portadores da mutação p.R337H apresentaram menor valor estimado de comprimento telomérico ao nascimento, possivelmente devido ao efeito permanente causado por tratamentos quimioterápicos recebidos pela parte de pacientes afetados por câncer.
- Na coorte americana, não identificamos diferença significativa entre os dois parâmetros analisados quando comparamos portadores de mutações germinativas em *TP53* e o grupo controle. Observamos, porém, encurtamento telomérico visivelmente mais acentuado em

portadores de mutações germinativas em *TP53*, de acordo com resultados demonstrados em publicações anteriores.

- Quando comparamos as coortes brasileira e americana, identificamos que portadores da mutação germinativa p.R337H apresentaram valor estimado de encurtamento telomérico relacionado à idade significativamente menor em relação a portadores de outras mutações germinativas em *TP53*. Quanto aos grupos controles, não identificamos nenhuma diferença na comparação entre os dois parâmetros analisados. Contudo, o grupo controle do Brasil apresentou um maior valor estimado de comprimento telomérico ao nascimento, possivelmente devido a fatores populacionais.
- Com base nos nossos resultados, podemos sugerir que a mutação p.R337H pode ter um efeito duplo associado tanto a mecanismos moleculares carcinogênicos quanto a mecanismos de senescência celular. A observação de menor valor estimado de encurtamento telomérico em portadores da mutação p.R337H sugere que a biologia telomérica nestes indivíduos pode estar associada ao desenvolvimento de câncer em idades mais tardias e ao perfil clínico de envelhecimento saudável.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol** 2009; 10:920-5.

Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer** 2008; 8:357.

Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, et al. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107 Suppl 1:1710-7.

Aubert G, Lansdorp PM. Telomeres and aging. **Physiol Rev** 2008; 88:557-79.

Bakaysa SL, Mucci LA, Slagboom PE, et al. Telomere length predicts survival independent of genetic influences. **Aging Cell** 2007; 6:769-74.

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.

Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, et al. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. **Epidemiology** 2006; 17:190-4.

Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing cancer and beyond. **Nat Rev Genet** 2005; 6:611-22.

Bond GL, Hu W, Bond EE, et al. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 promoter attenuates the p53 tumor suppressor pathway and accelerates tumor formation in humans. **Cell** 2004; 119:591-602.

Bond GL, Hu W, Levine A. A single nucleotide polymorphism in the MDM2 gene: from a molecular and cellular explanation to clinical effect. **Cancer Res** 2005; 65:5481-4.

Bougeard G, Baert-Desurmont S, Tournier I, et al. Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. **J Med Genet** 2006; 43:531-3.

Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. **J Clin Oncol** 2015; 33:2345-52.

Buettner D. **The blue zones: lessons for living longer from the people who've lived the longest**. Washington D.C: National Geographic Society; 2010. Discovering Costa Rica's blue zone; p.163-218.

Calado RT, Young NS. Telomere diseases. **N Engl J Med** 2009; 361:2353-65.

Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. **Nucleic Acids Res** 2002; 30:e47.

Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. **Lancet** 2003; 361:393-5.

Cawthon RM. Telomere length measurement by a novel monochrome multiplex quantitative PCR method. **Nucleic Acids Res** 2009; 37:e21.

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.

Cohen S, Janicki-Deverts D, Turner RB, et al. Association between telomere length and experimentally induced upper respiratory viral infection in healthy adults. **JAMA** 2013; 309:699-705.

Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2007;104:2205-10.

Cury NM, Ferraz VE, Silva WAT. P53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. **Hered Cancer Clin Pract** 2014; 12:8.

Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. **PLoS One** 2011; 6:e18015.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol** 2013; 31:2619-26.

Daniali L, Benetos A, Susser E, et al. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. **Nat Commun** 2013; 4:1597.

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.

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

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.

Fortes FP, Kuasne H, Marchi FA, Miranda PM, Rogatto SR, Achatz MI. DNA methylation patterns of candidate genes regulated by thymine DNA glycosylase in patients with TP53 germline mutations. **Braz J Med Biol Res** 2015; 48:610-5.

Friedrich U, Griesse E, Schwab M, Fritz P, Thon K, Klotz U. Telomere length in different tissues of elderly patients. **Mech Ageing Dev** 2000; 119:89-99.

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.

Giacomazzi J, Selistre S, Duarte J, Ribeiro JP, et al. TP53 p.R337H is a conditional cancer-predisposing mutation: further evidence from a homozygous patient. **BMC Cancer** 2013; 13:187.

Giacomazzi J, Koehler-Santos P, Palmero EI, et al. A TP53 founder mutation p.R337H is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. **Virchows Arch** 2013; 463:17-22.

Giacomazzi, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS One** 2014; 9n6, e99893.

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

Halaschek-Wiener J, Vulto I, Fornika D, et al. Reduced telomere length variation in healthy oldest old. **Mech Ageing Dev** 2008; 129:638-41.

Haycock PC, Heydon EE, Kaptoge S, et al. Leucocyte telomere length and risk of cardiovascular disease: systematic review and meta-analysis. **BMJ** 2014; 349:g4227.

Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp Cell Res** 1965; 37:614-36.

Lalli E. Adrenal cortex ontogenesis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab** 2010; 24:853-64.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2001; 86:4970-3.

Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, et al. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. **J Mol Biol** 2003; 327:699-709.

Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1969a; 43:1365-73.

Li FP, Fraumeni JF. Soft-tissue sarcomas breast cancer and other neoplasmsA familial syndrome? **Ann Intern Med** 1969b; 71:747-52.

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

Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, et al. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. **J Med Genet** 2004; 41:354-9.

López-Otín C, Blasco MA, Partridge L, Serrano M, Kroemer G. The hallmarks of aging. **Cell** 2013; 153:1194-217.

Ma H, Zhou Z, Wei S, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. **PLoS One** 2011; 6:e20466.

Macedo GS, Lisboa da Motta L, Giacomazzi J, et al. Increased oxidative damage in carriers of the germline TP53 p.R337H mutation. **PLoS One** 2012; 7:e47010.

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.

Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, et al. TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. **J Med Genet** 2009; 46:766-72.

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.

Martin-Ruiz CM, Gussekloo J, van Heemst D, von Zglinicki T, Westendorp RG. Telomere length in white blood cells is not associated with morbidity or mortality in the oldest old: a population-based study. **Aging Cell** 2005; 4:287-90.

Metcalfe JA, Parkhill J, Campbell L, et al. Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. **Nat Genet**. 1996;13:350-3.

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, et al. A highly conserved repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n present at the telomeres of human chromosomes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1988; 85:6622-6.

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.

O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2010; 11:171-81.

Olovnikov AM. A theory of marginotomyThe incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. **J Theor Biol** 1973; 41:181-90.

Palm W, de Lange T. How shelterin protects mammalian telomeres**Annu Rev Genet** 2008; 42:301-34.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, 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, Achatz MI, Ashton-Prolla P, Olivier M, Hainaut P. Tumor protein 53 mutations and inherited cancer: beyond Li-Fraumeni syndrome. **Curr Opin Oncol** 2010; 22:64-9.

Paskulin DD, Giacomazzi J1,2, Achatz MI, et al. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLoS One** 2015; 10:e0143262.

Pereira RM, Michalkiewicz E, Pianovski MA, et al. [Treatment of childhood adrenocortical tumor]. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2005; 49:747-52.

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.

Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, et al. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba Brazil. **Pediatr Blood Cancer** 2006; 47:56-60.

Pinto C, Veiga I, Pinheiro M, et al. TP53 germline mutations in Portugal and genetic modifiers of age at cancer onset. **Fam Cancer** 2009; 8:383-90.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol** 2004; 48:647-50.

Rehkopf DH, Dow WH, Rosero-Bixby L, Lin J, Epel ES, Blackburn EH. Longer leukocyte telomere length in Costa Rica's Nicoya Peninsula: a population-based study. **Exp Gerontol** 2013; 48:1266-73.

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.

Rode L, Nordestgaard BG, Bojesen SE. Peripheral blood leukocyte telomere length and mortality among 64 637 individuals from the general population. **J Natl Cancer Inst** 2015; 107:djv074.

Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, Zambetti GP, Ribeiro RC. Biology clinical characteristics and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatr Blood Cancer** 2005; 45:265-73.

Rosero-Bixby, L.; Dow, W. H.; Rehkopf, D. H. The Nicoya region of Costa Rica: a high longevity island for elderly males. **Vienna Yearb Popul Res** 2013, v. 11, p. 109-136.

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.

Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LL. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Horm Metab Res** 2005; 37:231-5.

Savage SA, Alter BP. Dyskeratosis congenita. **Hematol Oncol Clin North Am** 2009; 23:215-31.

Seidinger AL, Mastellaro MJ, Paschoal Fortes F, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer** 2011; 117:2228-35.

Seidinger AL, Fortes FP, Mastellaro MJ, et al. Occurrence of neuroblastoma among TP53 p.R337H carriers. **PLoS One** 2015; 10:e0140356.

Shlien A, Tabori U, Marshall CR, et al. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2008; 105:11264-9.

Silva AG, Achatz IM, Krepischi AC, Pearson PL, Rosenberg C. Number of rare germline CNVs and TP53 mutation types. **Orphanet J Rare Dis** 2012; 7:101.

Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrinol Metab** 1999; 84:1110-5.

Tabori U, Nanda S, Druker H, Lees J, Malkin D. Younger age of cancer initiation is associated with shorter telomere length in Li-Fraumeni syndrome. **Cancer Res** 2007; 67:1415-8.

Terry DF, Nolan VG, Andersen SL, Perls TT, Cawthon R. Association of longer telomeres with better health in centenarians. **J Gerontol A Biol Sci Med Sci** 2008; 63:809-12.

Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol** 2009; 27:e108-9.

Trkova M, Prochazkova K, Krutilkova V, Sumerauer D, Sedlacek Z. Telomere length in peripheral blood cells of germline TP53 mutation carriers is shorter than that of normal individuals of corresponding age. **Cancer** 2007; 110:694-702.

Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1994; 91:9857-60.

Wentzensen IM, Mirabello L, Pfeiffer RM, Savage SA. et al. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2011; 20:1238-50.

Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, et al. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol** 2006; 28:513-24.

Zekry D, Krause KH, Irminger-Finger I, et al. Telomere length comorbidity functional nutritional and cognitive status as predictors of 5 years post hospital discharge survival in the oldest old. **J Nutr Health Aging** 2012; 16:225-30.

Zhao J, Miao K, Wang H, Ding H, Wang DW. Association between telomere length and type 2 diabetes mellitus: a meta-analysis. **PLoS One** 2013; 8:e79993.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Projeto Temático



Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 16 de junho de 2014.

A
Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz.

Aluno: Kelvin César de Andrade (Mestrado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1812/13B

"Análise comparativa entre o comprimento telomérico e características clínicas de portadores da mutação germinativa p.R337H no gene TP53".

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 10/06/2014, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado "Mitocôndrias, telômeros, estilo de vida e desfechos na síndrome de Li-Fraumeni", registrado neste CEP sob nº 1812/13. O projeto afiliado em referência será a tese de Mestrado do aluno *Kelvin César de Andrade*.
- Projeto de Mestrado, datado de 19 de maio de 2014.

Atenciosamente,

Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Projeto afiliado



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 13 de Novembro de 2013.

À

Dra. Maria Isabel A. S. Waddington Achatz

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1812/13

“Mitocôndrias, telômeros, estilo de vida e desfechos na 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 12/11/2013, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 20/08/2013, **aprovaram** a realização do projeto (Versão 2), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Principal (Versão 2), o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Validação de Questionários (Versão 2), Questionário de História Dietética, Questionário de Informações Individuais, Questionário Kaiser de atividade física e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Declaração sobre o plano de recrutamento dos sujeitos de pesquisa, circunstâncias e responsáveis pela obtenção do TCLE;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Plano de custos detalhado;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando amostras Fornecidas e Processadas Pelo Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética;
- Lista de Centros Participantes da Pesquisa;
- Carta-convite da Dra. Sharon A. Savage - National Cancer Institute;
- Declaração de Concordância do Pesquisador com o Delineamento do Protocolo (Dra. Maria Isabel A. S. Waddington Achatz);
- Declaração de Concordância do Pesquisador com o Delineamento do Protocolo (Dra. Ana Carolina Leite Vieira Costa);
- Declaração de Concordância do Pesquisador com o Delineamento do Protocolo (Dra. Patricia Ashton-Prolla – Hospital de Clínicas - Porto Alegre - RS);

1/2



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

- Declaração de Concordância do Pesquisador com o Delineamento do Protocolo (Dra. Sharon A. Savage – National Cancer Institute);
- Carta de Aprovação do projeto no país de origem;
- Identificação dos Currículos na Plataforma Lattes.

Para iniciar o projeto, é necessário aguardar a aprovação da CONEP para este primeiro centro.

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

Atenciosamente,

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

Anexo 3 - Carta de aprovação do the National Institutes of Health (NIH)



Department of Health & Human Services

Public Health Service

National Institutes of Health
National Cancer Institute
Bethesda, Maryland 20892

iRIS Reference Number 315309

Sponsor Protocol #: NA
Project Number: P11858
Version Date: 08/08/2011

8/30/2011

TO: Sharon A Savage, M.D.
NCI - Clinical Genetics Branch

FROM: Chairperson, Institutional Review Board, NCI

SUBJECT: Action on Clinical Research Protocol

Your revised protocol and consent documents, "Clinical, Epidemiologic, and Genetic Studies of Li-Fraumeni Syndrome," were reviewed by the National Cancer Institute Institutional Review Board (NCI-IRB) by expedited review.

The IRB has taken the following action:

X	Approved as written. Forwarded to the CC OPS for administrative processing.
	Approved with recommendations. See review comments. Forwarded to the CC OPS for administrative processing.
	Approved with stipulations pending re-review by IRB Chair. See review comments.
	Approved with stipulations. Subsequent amendment required. See review comments. Forwarded to the CC OPS for administrative processing.
	Deferred pending response to stipulations and re-review by the full IRB. See review comments.
	Tabled pending response to stipulations and re-review by the full IRB. See review comments.

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Mitocôndrias, telômeros, estilo de vida e desfechos na síndrome de Li-Fraumeni.

Pesquisador: Maria Isabel Waddington Achatz

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá envio para o exterior de material genético ou qualquer material biológico humano para obtenção de material genético, salvo nos casos em que houver cooperação com o Governo Brasileiro;);

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais;);

Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro;

Versão: 6

CAAE: 20167913.6.1001.5432

Instituição Proponente: Fundação Antônio Prudente-Hospital do Câncer-A C Camargo

Patrocinador Principal: Bedside-to-Bench Program

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 649.396

Data da Relatoria: 23/04/2014

Apresentação do Projeto:

Introdução:

"A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer autossômica dominante altamente penetrante, e associada a um grande espectro de tipos tumorais que ocorrem em uma idade muito mais precoce do que o esperado na população geral. A síndrome foi descrita inicialmente em 1969 e a associação da maioria dos casos com mutações germinativas no gene TP53 foi descoberta em 1990. Apesar deste conhecimento, rastreamento e tratamento ideais não estão inteiramente determinados e o nosso entendimento acerca dos modificadores genéticos e/ou ambientais dos diferentes tipos de câncer ou da idade ao diagnóstico de câncer na LFS é bastante limitado. O espectro de tumores que ocorre na LFS é heterogêneo, incluindo tumores pediátricos e tumores de diagnóstico na vida adulta. Os tumores mais fortemente associados a síndrome são sarcomas ósseos e de partes moles, câncer de mama

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

pré-menopáusico, tumores de sistema nervoso central. A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer autossômica dominante altamente penetrante, e associada a um grande espectro de tipos tumorais que ocorrem em uma idade muito mais precoce do que o esperado na população geral. A síndrome foi descrita inicialmente em 1969 e a associação da maioria dos casos com mutações germinativas no gene TP53 foi descoberta em 1990. Apesar deste conhecimento, rastreamento e tratamento ideais não estão inteiramente determinados e o nosso entendimento acerca dos modificadores genéticos e/ou ambientais dos diferentes tipos de câncer ou da idade ao diagnóstico de câncer na LFS é bastante limitado. O espectro de tumores que ocorre na LFS é heterogêneo, incluindo tumores pediátricos e tumores de diagnóstico na vida adulta. Os tumores mais fortemente associados a síndrome são sarcomas ósseos e de partes moles, câncer de mama pré-menopáusico, tumores de sistema nervoso central TP53*PIN3 (Polimorfismo no Intron 3, rs17878362), é uma duplicação de 16 pares de bases associada a idade mais precoce no diagnóstico de câncer em pacientes com LFS. O polimorfismo MDM2 SNP309 é um polimorfismo de uma base única (SNP) associado com risco para vários tipos de câncer na população geral. Em portadores de mutações germinativas de TP53, o alelo variante também está associado com idade mais precoce ao diagnóstico de câncer. Um estudo de variantes de número de cópias de DNA germinativo (CNVs) em portadores de mutações de TP53 revelou que os portadores de mutação apresentavam mais CNVs do que os controles e que portadores com câncer tinham mais CNVs do que aqueles sem câncer. A proteína p53 é muito importante também na regulação da utilização do oxigênio mitocondrial, na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e na disposição das ROS, estando demonstrado recrutamento e translocação da proteína p53 para a mitocôndria em resposta a sinais de estresse celular. Ligação e ativação proteica subsequentes resultam na permeabilização da membrana mitocondrial externa que libera enzimas de indução de apoptose e degradação da cromatina. Adicionalmente, mutações e alterações no número de cópias do DNA mitocondrial têm sido identificadas em células somáticas derivadas de diferentes tumores em estudos populacionais. Estudos epidemiológicos sugerem que um aumento no número de cópias de DNA mitocondrial nas células sanguíneas pode estar associado com um aumento no risco de câncer de mama e pulmão. A relação de p53 com metabolismo energético também foi demonstrada em estudos experimentais em modelos murinos knockout e mutantes para TP53 que sugerem que restrição calórica e condicionamento físico nesses animais se associam com redução do risco de câncer. Taxas aumentadas de sedentarismo e obesidade já foram associadas com maior risco de câncer na população geral. Em pacientes com LFS, o efeito do status nutricional e exercício sobre risco de câncer não foram avaliados. Outro potencial

modificador de risco em pacientes com LFS é o telômero. Uma vez que p53 é uma proteína crucial para o reparo do DNA e manutenção da estabilidade cromossômica, é possível que alterações nos componentes da via biológica dos telômeros possam contribuir para os desfechos nas síndromes LFS/LFL. Telômeros sofrem um encurtamento a cada divisão celular e essa perda pode resultar em uma redução crítica no seu comprimento, levando a senescência ou crise, apoptose, instabilidade genômica ou redução no ciclo da vida celular. Células tumorais continuam a se dividir apesar da presença de telômeros criticamente encurtados por uma superexpressão do gene da telomerase e de genes de outras vias que incluem p53 e RB. Telômeros mais curtos estão associados com risco de diversos tumores na população geral e sua relação com o câncer fica evidente em indivíduos com disceratose congênita, uma doença causada por mutações nos genes envolvidos na biologia dos telômeros, que tem risco 11 vezes maior de câncer em geral e um risco 1000 vezes maior de desenvolver tumores das células escamosas da língua. Três estudos avaliaram comprimento de telômeros em grupos relativamente pequenos de pacientes portadores de mutações germinativas de TP53. Estes dados sugerem que portadores de mutação tem telômeros mais curtos que não portadores, e que o comprimento telomérico está associado com o fenômeno de antecipação (idade cada vez mais precoce ao diagnóstico de câncer em sucessivas gerações) observado em algumas famílias com a síndrome. O presente estudo é um esforço colaborativo conjunto apresentado pelo Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos EUA, NHLBI, e dois centros no Brasil que irão: 1) coletar dados clínicos e amostras biológicas para permitir estudos estatísticos mais robustos desta doença rara; 2) identificar a contribuição de mutações germinativas de TP53 para a função mitocondrial e determinar se função mitocondrial anormal é um marcador de risco de câncer; e 3) determinar o papel da biologia telomérica como modificador do risco de câncer. Essa proposta é complementar a um estudo sobre LFS já existente no NCI desde 2011 que inclui 3 subprojetos: caracterização clínica e genética de pacientes, colaboração multi-institucional que envolve uso de uma nova estratégia de rastreamento do câncer e um estudo de quimioprevenção em colaboração com o Medical Oncology Branch, CCR, NCI. Em conjunto, este e os demais estudos em andamento contribuirão para uma melhor estratificação de risco dos pacientes com LFS, e para melhorar o nosso entendimento das consequências biológicas de uma mutação germinativa em TP53, achados que poderão também ser aplicáveis a tumores esporádicos do mesmo tipo daqueles vistos em famílias com a síndrome."

Hipótese:

"Apesar de todos os estudos em andamento, atualmente há dados limitados sobre efeito de

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

exposições ambientais, status nutricional e atividade física/estilo de vida sobre desfechos clínicos na LFS, os quais são objeto do presente estudo. Relatos prévios demonstraram dano oxidativo e alterações musculares em pacientes com LFS ou LFL. Esta observação é somada com os relatos de especialistas na área que associaram aspecto fenotípico mais jovem em relação à idade cronológica em portadores de mutação TP53*p.R337H. Partindo-se do conhecimento pré-existente de que a função mitocondrial influencia os processos de envelhecimento, função muscular e equilíbrio oxidativo e de que tanto declínio na função mitocondrial como a perda no número de cópias de DNA mitocondrial estão associado ao envelhecimento e ao câncer, foi levantada a hipótese de que portadores de mutação germinativa em TP53 apresentam alterações primárias na função mitocondrial. Uma vez que o encurtamento telomérico é parte do processo habitual de envelhecimento, nossa hipótese é de que indivíduos portadores da mutação TP53*R337H sem câncer terão telômeros mais longos do que aqueles com a mesma mutação, mas diagnosticados com câncer, ou do que aqueles sem mutações em TP53. O objetivo principal do estudo é caracterizar clinicamente indivíduos com LFS e LFL, examinando se fatores de risco (exposições ambientais, estado nutricional e atividade física) podem estar associados com a ocorrência de câncer. Conjuntamente, o estudo visa determinar se alterações na função mitocondrial devido as a mutações germinativas de TP53 contribuem para o fenótipo clínico ou espectro tumoral em pacientes com LFS. Busca-se também caracterizar o papel da biologia telomérica nos riscos de câncer e desfechos associados à LFS."

Metodologia:

"Antes de iniciar o estudo, será realizada a validação da tradução e validação transcultural dos três questionários elaborados e validados pelo Clinical Genetics Branch (CGB), NIH que serão aplicados no grupo de estudo deste projeto a fim de coletar vastas informações sobre questões individuais, psicológicas, familiares e de hábitos de vida, como dieta e atividade física. Para validar a tradução e a adaptação transcultural dos questionários que serão aplicados neste estudo, 20 indivíduos saudáveis com faixa etária e sexo representativos da população com LFS, que assinem o termo de consentimento de participação no estudo serão submetidos aos três questionários no momento da inclusão e novamente 20 dias após. O estudo será proposto para 60 pacientes LFS do Departamento de Oncogenética positivos para mutação no TP53; 50 pacientes LFS do Ambulatório de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre positivos para mutação no TP53; e 40 pacientes LFS do NIH positivos para mutação no TP53 não p.R337H. Ao menos 1 familiar não portador de mutação de cada paciente portador será incluso. Após a assinatura do TCLE os

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

pacientes preencherão os questionários clínicos, epidemiológicos e de história dietética para conduzir análises de possíveis fatores de risco ambientais que estejam atuando nas famílias LFS. Pacientes LFS com perfil genético já determinado, serão convocados para coleta de sangue ou saliva para extração do DNA caso não haja material suficientemente disponível no Banco de Macromoléculas. Pacientes novos, que passem no Departamento de Oncogenética durante o período do estudo, e que preencham os critérios da síndrome de LFS, serão convidados a participar do estudo. Nestes pacientes será realizado o teste genético para pesquisa de mutações no gene TP53 (pesquisa de mutação germinativa em região codificante através de sequenciamento direto). O DNA dos pacientes portadores de mutação e os respectivos familiares não-portadores será encaminhado ao centro colaborador nos EUA para o estudo do número de cópias do DNA mitocondrial e o tamanho dos telômeros. O estudo da função mitocondrial será realizado apenas nos pacientes do NIH."

Critérios de Inclusão/ Exclusão:

Critérios de inclusão:

"Na região Sudeste do Brasil serão inclusos 60 pacientes LFS com mutação no TP53 serão recrutados a partir do Departamento de Oncogenética do A.C. Carmargo Cancer Center, São Paulo (sob responsabilidade da Dra Maria Isabel Achatz). Na região Sul do Brasil serão inclusos 50 LFS com mutação no TP53 pacientes serão recrutados a partir do Ambulatório de Oncogenética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (sob responsabilidade da Dra. Patricia Ashton-Prolla). Nos EUA serão inclusos 40 pacientes LFS com mutação no TP53 não p.R337H serão recrutados pelo NIH (sob responsabilidade da Dra. Sharon A. Savage). Serão recrutados ao menos 1 familiar não-portador de mutação de cada paciente portador."

Critérios de Exclusão:

"Não informado."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

"O objetivo principal do estudo é caracterizar clinicamente indivíduos com LFS e LFL, examinando se fatores de risco (exposições ambientais, estado nutricional e atividade física) podem estar associados com a ocorrência de câncer."

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

Objetivos Secundários:

"O objetivo principal do estudo é caracterizar clinicamente indivíduos com LFS e LFL, examinando se fatores de risco (exposições ambientais, estado nutricional e atividade física) podem estar associados com a ocorrência de câncer."

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo a pesquisadora:

Riscos:

"No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações. Os questionários poderão causar um sentimento de desconforto ou ansiedade frente às perguntas realizadas. Os pesquisadores estarão disponíveis para conversar e prestar apoio se necessários, frente a estas situações. Com o conhecimento do resultado do teste genético alguns pacientes podem desenvolver ansiedade, raiva e depressão. O aconselhamento genético e psicológico tem como objetivo ajudá-lo(a) a lidar com a informação."

Benefícios:

"O maior benefício do estudo é permitir a identificação de fatores que possam estar associados ao maior risco ou proteção para o desenvolvimento de certos tumores da síndrome de Li-Fraumeni. A partir desse estudo espera-se melhorar o conhecimento geral (e não individual) sobre risco de câncer em pessoas com a síndrome de Li-Fraumeni. Estas informações poderão trazer uma melhor compreensão dos tumores relacionados à doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes aplicáveis não somente para pessoas com a síndrome de Li-Fraumeni como também na população geral."

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da análise das respostas da pesquisadora ao parecer CONEP:571.267, de 27 de janeiro de 2014.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

No item IV.2 (página 2 de 4) da versão corrigida do TCLE, o trecho referente ao direito do participante da pesquisa em escolher se permite ou não o armazenamento de suas amostras biológicas, lê-se: "Você terá o direito de escolher se permite o armazenamento de suas amostras biológicas (sangue/saliva) para a utilização em outros protocolos de pesquisa, ou se deseja que elas sejam utilizadas exclusivamente para este estudo, sendo o seu excedente, inutilizado pelo Biobanco da Instituição". Recomenda-se substituir o termo "outros protocolos de pesquisa" por "outras pesquisas" no trecho supracitado, uma vez que o termo "protocolo" pode não ser esclarecedor para o público em geral.

Adicionalmente, recomenda-se que o TCLE não seja impresso em papel com o logotipo da Instituição.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas ao PARECER CONEP nº 571.267

Referente ao estudo clínico supracitado, gostaríamos de providenciar as respostas às pendências do Parecer da CONEP nº 545.245 de 05 de março de 2014, conforme abaixo descrito:

1. O arquivo "PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_201679.pdf" informa que o país de origem da pesquisa é os Estados Unidos da América e informa ainda que as amostras brasileiras serão mandadas para este país. Caracteriza-se, portanto, que a pesquisa em tela possui coordenação estrangeira. Solicita-se a inclusão da área temática "pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro" (Resolução CNS 466/2012, item IX.4.8) e adequação da Folha de Rosto.

RESPOSTA: Conforme solicitado, a Folha de Rosto foi adequada com a inclusão da área temática: "Pesquisas com coordenação e/ou patrocínio originados fora do Brasil, excetuadas aquelas com copatrocínio do Governo Brasileiro".

ANÁLISE : PENDÊNCIA ATENDIDA.

2. Ainda que constem os arquivos "16 A - Orçamento financeiro detalhado.doc" e "17 A - Plano de custos detalhado.doc" que informam, respectivamente, o detalhamento dos gastos previstos no centro A. C. Camargo e o total de gastos previsto para cada centro participante, não há nenhuma

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

Continuação do Parecer: 649.396

informação quanto à origem dos recursos destinados à realização da pesquisa. Solicita-se esclarecer se haverá apenas uma fonte financiadora de toda a pesquisa ou mesmo se cada centro será responsável por custear os gastos previstos com a pesquisa.

RESPOSTA: Conforme solicitado, foi descrita a origem dos recursos destinados à realização da pesquisa:

Quanto ao arquivo "16 A. Orçamento financeiro detalhado", agora substituído pelo documento "Orçamento financeiro detalhado – versão 2":

- Foi incluída a seguinte frase: "Declaro também que todo o financiamento para a realização deste projeto será proveniente do programa Bench-to-Bedside program (B2B NIH/NCI)";

- Ressaltamos que o arquivo já apresentava a coluna "Fonte Financiadora", explicitando que para cada item do orçamento descrito, seriam utilizados recursos do Bench-to-Bedside program (B2B NIH/NCI).

Quanto ao arquivo "17 A - Plano de custos detalhado", agora substituído pelo documento "Plano de custos detalhado – versão 2":

- Foi incluída a seguinte frase: "Desta forma, declaro que todo o financiamento para a realização deste projeto será proveniente do programa Bench-to-Bedside program (B2B NIH/NCI)";

- Foi incluída a coluna "Fonte Financiadora", descrevendo que para cada item, serão utilizados recursos provenientes do Bench-to-Bedside program (B2B NIH/NCI);

- Ressaltamos que o arquivo já apresentava o trecho que lê-se: "Um acordo entre o NCI e cada instituição foi criado a fim de apoiar estas iniciativas de pesquisa". Portanto, para nosso entendimento, esta informação (acompanhada dos valores descritos em moeda americana), já destacava que a origem dos recursos seriam oriundos do Bench-to-Bedside program (B2B NIH/NCI).

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

3. Quanto ao Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão 2 [arquivo "TCLE-Principal (corrigido).doc"]:

a) O texto faz uso de termos do jargão científico sem as devidas explicações ou com explicações equivocadas, tais como: gene (página 1), mitocôndrias e telômeros (página 2). Tendo em vista que a definição "estruturas celulares" é muito imprecisa, uma vez que os telômeros, por exemplo, não são propriamente "estruturas celulares", mas sim, as porções terminais dos cromossomos, que, sim, são estruturas celulares. Solicita-se, portanto, que o texto traga explicações coerentes para os termos científicos utilizados.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

RESPOSTA: Conforme as sugestões do relator, o texto do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi revisto e alterado:

No item III (página 1 de 4), foram dadas as seguintes explicações para os termos científicos abaixo:

DNA: (...) moléculas que contém o material genético responsável pelo desenvolvimento dos seres vivos e pela transmissão das características hereditárias (...);

Gene: (...) em uma parte, chamada gene TP53, que é responsável pela informação que permite a produção da proteína p53 em nossas células (...).

No item IV.1 (página 2 de 4), para correto emprego dos termos científicos, reescrevemos o trecho em questão. No novo texto lê-se: "(...) Entre esses fatores, podemos citar: alterações no DNA e em outras estruturas da célula, como as mitocôndrias, parte da célula envolvida na respiração celular; ou em componentes dos cromossomos, como os telômeros (...)"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

b) Na página 2 de 4, item "2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS", lê-se: "O sangue SERÁ DESTINADO para o Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, responsável pelo PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO de amostras biológicas (Protocolo aprovado pela CONEP sob número B-001). Uma parte da amostra de DNA obtida de seu sangue será enviada para o COLABORADOR NOS ESTADOS UNIDOS que realizará parte das análises biológicas a fim de verificar a ocorrência de alterações" (destaques nossos). Quanto ao texto transcrito e os pontos destacados, cabem as seguintes considerações:

I. O texto já afirma que as amostras serão enviadas para o biobanco da instituição sem a obtenção de consentimento prévio do participante da pesquisa. Cabe ressaltar que, caso o participante recrutado concorde em participar da pesquisa, ele não pode ser obrigado a permitir que sua amostra seja armazenada. Solicita-se a adequação.

RESPOSTA: Conforme solicitado, foi incluído no item IV.2 (página 2 de 4) do TCLE, o trecho referente ao direito do participante da pesquisa em escolher se permite ou não o armazenamento de suas amostras biológicas. O novo trecho lê-se: "Você terá o direito de escolher se permite o armazenamento de suas amostras biológicas (sangue/saliva) para a utilização em outros protocolos de pesquisa, ou se deseja que elas sejam utilizadas exclusivamente para este estudo, sendo o seu excedente, inutilizado pelo Biobanco da Instituição".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

II. O texto segue informando que as amostras serão enviadas para o "colaborador nos Estados Unidos", entretanto, não consta qualquer informação sobre a identificação e localização do "colaborador" estrangeiro. Solicita-se que o texto do documento informe clara e precisamente a identificação da contraparte estrangeira que receberá e processará as amostras.

RESPOSTA: No texto do item III (página 1 de 4) do TCLE, foi detalhada a localização da colaboração estrangeira, onde agora lê-se: (...) Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos da América (NCI/NIH – EUA) (...).

No texto do item IV.2 (página 2 de 4) do TCLE, foi incluída a identificação da contraparte estrangeira, substituindo o termo "colaborador nos Estados Unidos" por "NCI/NIH - EUA".

No item II.3 (página 1 de 4) do TCLE, adequamos também a identificação do pesquisador internacional envolvido. Foi incluído o termo "Estados Unidos da América", referente à sigla (EUA) do país onde a referida instituição está localizada.

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

c) Na página 2 de 4, item "2. PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS E PROPÓSITOS", lê-se: "Se você decidir participar, serão marcadas outras consultas (TOTAL DE 4) para preenchimento de formulários/questionários e coleta de sangue para exames genéticos" (destaque nosso). O texto informa que o participante que concordar em participar da pesquisa terá que comparecer diversas vezes ao centro para cumprir as solicitações da pesquisa. Entretanto, o texto não traz qualquer informação acerca do ressarcimento das despesas com transporte e alimentação dos participantes da pesquisa nos dias em que terão que comparecer ao centro para realizar as etapas da pesquisa. Solicita-se adequação.

RESPOSTA: Conforme solicitado, no item IV.2 (página 2 de 4) do TCLE versão 3, foi inserido o trecho que lê-se: "Informamos que os questionários serão aplicados durante o seu comparecimento no departamento de Oncogenética no dia de sua consulta semestral de rotina com a equipe médica responsável, ou aproveitará a sua vinda devido a consultas com outras especialidades. Desta forma, não haverá custos adicionais relacionados a este estudo referentes ao transporte e alimentação dos participantes."

Apesar de não referido, o item 3.1 (página 6 de 19) do projeto compatível - versão 3, foi revisto e o texto readequado com o TCLE. No arquivo "Projeto - versão 3", onde lia-se: "(...) serão submetidos aos três questionários no momento da inclusão e novamente 20 dias após. Os questionários serão enviados via Correios para os indivíduos selecionados (o custo desta remessa está previsto no orçamento do projeto).", agora lê-se: "(...) serão submetidos aos três

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

questionários. Os questionários serão aplicados durante o comparecimento no departamento de Oncogenética no dia de consulta semestral de rotina com a equipe médica responsável, ou aproveitará a vinda devido a consultas com outras especialidades. Desta forma, não haverá custos adicionais relacionados a este estudo referentes ao transporte e alimentação dos participantes."

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

d) Não constam quaisquer informações acerca de uma possível suspensão do estudo. Ressalta-se que o documento deve informar que a pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização por motivo de segurança dos participantes da pesquisa (ainda que no caso do estudo em tela seja praticamente descartada esta possibilidade), ou mesmo caso o CEP entenda que a pesquisa esteja sendo conduzida de maneira eticamente inaceitável. Solicita-se a inclusão no documento da informação de que a pesquisa poderá ser interrompida enquanto ainda em andamento.

RESPOSTA: Conforme solicitado, foi incluído no item V (página 4 de 4) do TCLE, o trecho que lê-se: "Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa por em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável".

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

e) Na página 4 de 4, item "V. OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES", lê-se: "As amostras coletadas serão processadas e armazenadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, e O EXCEDENTE NÃO UTILIZADO POR ESTE PROJETO DE PESQUISA PODERÁ SER UTILIZADO EM OUTROS PROJETOS, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição. EM CASO DA UTILIZAÇÃO DAS SUAS AMOSTRAS EM OUTRAS PESQUISAS, FAVOR ASSINALAR UMA DAS SEGUINTE OPÇÕES:

() Quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.

() Não quero receber um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa." (destaques nossos). Quanto ao trecho transcrito e os pontos destacados, cabem as seguintes considerações:

I. A pesquisa visa à investigação de aspectos genéticos relacionados à síndrome de Li-Fraumeni e

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde

Bairro: Asa Norte

CEP: 70.750-521

UF: DF

Município: BRASILIA

Telefone: (61)3315-5878

E-mail: conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

não à formação de banco de amostras biológicas. Portanto, a afirmação de que "o excedente não utilizado por este projeto de pesquisa poderá ser utilizado em outros projetos" impõe o armazenamento da amostra biológica do participante. Solicita-se a alteração da informação dando a possibilidade de escolha ao participante de decidir se permitirá ou não o armazenamento de sua amostra biológica ao final do estudo.

RESPOSTA: Vide documento "TCLE - versão 3 (com alterações destacadas).doc"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

II. Ademais, o texto solicita que o participante decida se quer ou não ser contatado para dar o seu consentimento para cada nova pesquisa a ser realizada com a amostra armazenada. Tal possibilidade de escolha é restrita à amostra armazenada em biobanco. Solicita-se, portanto, a apresentação de modelo do TCLE para armazenamento em biobanco (de acordo com os requisitos do item 5 do Art. 1º da Resolução CNS 441/2011), uma vez que não se pode simplesmente informar que as amostras excedentes serão armazenadas no biobanco da instituição.

RESPOSTA: Vide documento "TCLE - versão 3 (com alterações destacadas).doc"

ANÁLISE: PENDÊNCIA ATENDIDA.

Situação do Parecer:

Aprovado

Considerações Finais a critério da CONEP:

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/2012 e na Norma Operacional Nº 001/2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 649.396

BRASILIA, 15 de Maio de 2014

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 1º SUBSOLO, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br

Early-onset breast cancer patients in South and Southeastern Brazil should be also considered for germline *TP53* p.R337H mutation testing

ANDRADE, K. C.¹; SANTIAGO, K. M.¹; FORTES, F. P.¹; MAMBELLI, L.I.¹, NOBREGA, A.^{1,2}; ACHATZ, M. I.¹²

¹ International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, SP 01508-010, Brazil

² Department of Oncogenetics, A.C. Camargo Cancer Center, Sao Paulo, SP 01509-900, Brazil

Keywords: Breast cancer, Li-Fraumeni syndrome, p.R337H, *TP53*,

Running title: Considerations for p.R337H testing

Authors' names and e-mails:

Kelvin César de Andrade: kelvincesar.an@gmail.com

Karina Miranda Santiago: karina.santiago@accamargo.org.br

Fernanda Paschoal Fortes: ferpfortes@gmail.com

Lisley Inata Mambelli: lis_mambelli@yahoo.com

Amanda França de Nóbrega: amanda.nobrega@accamargo.org.br

Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz: miachatz@cipe.accamargo.org.br

Corresponding author:

Maria Isabel Waddington Achatz MD, MSc, PhD

Director, Department of Oncogenetics

Chief, Laboratory of Molecular Oncogenetics

A.C. Camargo Cancer Center

440, Tagua Street - Liberdade

Zip Code: 01508-010- São Paulo - SP - Brazil

Phone: 55 11 2189-5181 Fax: 55 11 2181-5180

Email: miachatz@cipe.accamargo.org.br

ABSTRACT

Germline *TP53* mutations are associated with Li-Fraumeni syndrome (LFS), a disease that predisposes carriers to a wide variety of early onset tumors. In Southern and Southeastern Brazil, a high frequency of a germline *TP53* mutation, p.R337H, was diagnosed in 0,3% of population due to a founder effect. Carriers are at risk for developing cancer but penetrance is lower than in typical DNA binding domain mutations. To date, only a few families were detected and diagnosis of carriers remains a challenge. Therefore, the definition of more stringent criteria to detect p.R337H carriers is necessary for the Brazilian population. We assessed the A.C. Camargo Cancer Center Oncogenetics Department database in search of common characteristics belonging to p.R337H families that did not fulfill LFS/LFL clinical criteria. Among 42 p.R337H families, three did not meet any LFS/LFL criteria. All cases were young female patients with breast cancer diagnosed before age 45 with no family history of LFS linked-cancers. Our results suggest that screening for the germline *TP53* p.R337H mutation should be indicated, along with *BRCA1* and *BRCA2* genetic testing, for this group of patients especially in South and Southeast regions of Brazil.

INTRODUCTION

Li-Fraumeni syndrome (LFS, OMIM #151623) is a rare autosomal dominant genetic disorder inherited by germline *TP53* mutations (Malkin *et al.*, 1990). Carriers are predisposed to the development of a wide variety of early onset tumors especially to those denominated as LFS core tumors: premenopausal breast cancer, soft-tissue sarcoma (STS), central nervous system tumors (CNS), and adrenocortical carcinomas (ADR) (Li e Fraumeni, 1969a; b).

In order to identify at-risk families who carry these mutations, different criteria for clinical diagnosis have been established (**Table 1**). Since its publication, classical criteria has been modified due to the presence of families who although did not fulfill its definition, were positive for germline *TP53* mutations. This group of patients belongs to a variant form of LFS, named Li-Fraumeni-like (LFL), which is composed by either more inclusive parameters or additional criteria (Birch *et al.*, 1994; Eeles, 1995; Chompret *et al.*, 2001; Tinat *et al.*, 2009)

Interestingly, a specific germline *TP53* mutation (NC_000017.9: c.1010G>A; p.R337H) was reported as highly associated with LFS/LFL families in Brazil (Achatz *et al.*, 2007). It is present in 0,3 % of the local population from Southern and Southeastern regions of the country (Palmero *et al.*, 2008; Custódio *et al.*, 2013) due to a founder effect (Pinto *et al.*, 2004; Garritano *et al.*, 2010). One of the hypotheses to explain why this deleterious mutation has persisted is based on its relatively reduced penetrance, which confers tumor risk of 30% before the age of 30 to its carriers, but lifetime cancer risk similar to other *TP53* mutations (Garritano *et al.*, 2010). Thus, most young adults who are carriers may have their offspring before developing cancer, spreading the mutation throughout generations. Also, tumor profile among Brazilian carriers is similar to DNA-binding domain mutations found elsewhere in the world but some age difference and a higher risk for other types of tumors

might exist. However, in spite of its elevated prevalence, appropriate criteria to identify carriers as well as guidelines to facilitate and direct its genetic testing are still missing and, therefore, the number of carriers may be underrepresented. Hence, our aim was to investigate family history of p.R337H carriers who did not fulfill any LFS/LFL criteria and define when individuals without criteria would benefit from testing for p.R337H TP53

PATIENTS AND METHODS

This study is based on the A.C. Camargo Cancer Center Oncogenetics Department's database. The department has been following patients at high-risk for cancer development since 1999 and has currently 7059 individuals from 607 families enrolled. For each family, it was obtained a detailed family history regarding tumor diagnosis and clinical data for both index patients and their relatives. Patients eligible for either *TP53* sequencing or point mutation directed genetic testing are also registered in this database. From 348 families tested for germline *TP53* mutations, 42 were found to carry p.R337H (Achatz et al. 2007, Formiga et al. in press).

RESULTS

Table 2 shows how many families fulfilled each LFS/LFL criteria. From the 42 families identified as p.R337H carriers, three did not meet any LFS/LFL criteria. According to their respective pedigrees (**Figure 1**), family Y0347 (**Fig 1. A**) presented only two cases of malignancy: the proband with an invasive ductal carcinoma (IDC) diagnosed at the age 41 and her paternal uncle with prostate cancer at the age 60, which is not considered as a LFS-core tumor. Family Y0348 (**Fig 1. B**) also demonstrates cases of early-onset breast cancer; an

IDC and a ductal carcinoma in situ (DCIS) diagnosed in proband at the ages of 42 and 46, respectively, in addition to a breast cancer diagnosed in her mother at the age 61. Lastly, family Y0349's pedigree (**Fig 1. C**) is composed by a proband diagnosed with breast cancer at the age of 29 and cases of uterus and prostate cancers in her second- and third- degree relatives.

DISCUSSION AND CONCLUSIONS

We identified three different p.R337H families that did not fulfill any clinical criteria for LFS diagnosis. The main common observations in these families were the cases of breast cancer (BC), diagnosed before age 45, irrespective of family history.

It has been suggested that women diagnosed with breast cancer before age 30 along with a family history of one or more core LFS cancers in a first- or second-degree relative should also be considered for *TP53* genetic testing. In this scenario, Gonzalez *et al.*, 2009 found a likelihood of 100% (5 of 5) of harboring a germline *TP53* mutation. In contrast, the authors did not detect any mutation carrier in the group composed by 15 women diagnosed with invasive ductal carcinoma between the interval of 30-49 years of age and who did not have any core LFS tumor in the family history. Similar results were described afterwards (Mouchawar *et al.*, 2010) and the probability of identifying a germline *TP53* mutation in women diagnosed with early onset breast cancer and who have a negative family history was defined as ranging from 5% to 8%, (McCuaig *et al.*, 2012).

The three families detected in our study presented some features that should be carefully interpreted based on specific p.R337H characteristics. Differently from the findings described by Gonzalez *et al.*, two positive cases (Y0347T000 and Y0349T000) did not display

any core LFS tumor in their first- or second-degree relatives. In addition, although the family Y348 is composed by two cases of breast cancer, it did not meet any LFS criteria due to the relatively older age at tumor diagnosis of proband's mother. These particularities could be consequences of the low penetrance presented by the p.R337H especially before the age of 30 (Garritano *et al.*, 2010) which raises the possibility of later-than-expected ages at cancer development when compared to those described in currently applied LFS clinical criteria. Therefore, this might be a plausible explanation for both the absence of other affected individuals in the pedigree as well as a slightly older age at cancer onset.

The indication of simultaneous genetic testing for *BRCA1/BRCA 2* and *TP53* has been proposed especially for women with breast cancer diagnosed before age 35 who have a family history of LFS-linked cancers (Lee *et al.*, 2012). Conversely, Tinat *et al.*, 2009 suggested *TP53* testing only for women diagnosed with early onset BC who are negative for mutations in *BRCA1* and *BRCA2*, irrespective of family history. However, the authors state that it should be avoided in those who do not present a family history of cancer or multiple primary tumors, mainly due to the low estimated prevalence of positive cases in this category (less than 5%) and the psychosocial burden induced by a *TP53* genetic testing. In accordance to our observations, Gomes *et al.*, 2012 described two p.R337H carriers diagnosed with BC before the age 40 in an unselected BC-cohort with 390 participants (0,5%), indicating that the genetic testing for the p.R337H could potentially be inserted in existing screening panels. Similarly, Giacomazzi *et al.*, 2014 investigated the prevalence of the p.R337H mutation in two different Brazilian groups of women diagnosed with BC: one composed by affected individuals with a family history (FH) compatible with hereditary breast cancer but no LFS/LFL features and another one, by women unselected for FH. The authors found the values of 3,4% and 8,6% for each group, respectively. Due to this frequency, they proposed that this mutation may play an important role in the incidence of BC in Brazil.

These findings, along with ours, strengthen the importance of suggesting concomitant *TP53* p.R337H genetic testing for women affected by BC before age 45, irrespective of family history, particularly in the Southern and South regions of Brazil, where the prevalence of a germline *TP53* is considerably higher than elsewhere in the world. The inclusion of this group of patients would potentially avoid LFS/LFL underdiagnosis and inappropriate genetic counseling.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank the participation of all the families included in this research; Oncogenetics Department for selection of candidate families; A.C. Camargo Cancer Center BioBank staff for technical support. Financial support provided by the National Institute of Science and Technology in Oncogenomics (INCITO – process 2008/57887-9). Hereby, all the authors declare that they have no conflict of interest.

REFERENCES

Achatz, M. I. et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett**, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, Jan 2007.

Birch, J. M. et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the *p53* gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res**, v. 54, n. 5, p. 1298-1304, March 1, 1994.

Chompret, A. et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **J Med Genet**, v. 38, n. 1, p. 43-7, Jan 2001.

Custódio, G. et al. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the TP53 R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. **J Clin Oncol**, v. 31, n. 20, p. 2619-26, Jul 2013.

Eeles, R. A. Germline mutations in the *TP53* gene. **Cancer Surv**, v. 25, p. 101-24, 1995.

Garritano, S. et al. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat**, v. 31, n. 2, p. 143-50, Feb 2010.

Giacomazzi, J. et al. Prevalence of the TP53 p.R337H mutation in breast cancer patients in Brazil. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99893, 2014.

Gomes, M. C. et al. The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. **Hered Cancer Clin Pract**, v. 10, n. 1, p. 3, 2012.

Gonzalez, K. D. et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1250-6, Mar 2009.

Lee, D. S. et al. Comparable frequency of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutations in a multi-ethnic Asian cohort suggests TP53 screening should be offered together with BRCA1/2 screening to early-onset breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v. 14, n. 2, p. R66, 2012.

Li, F. P.; Fraumeni, J. F. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. **J Natl Cancer Inst**, v. 43, n. 6, p. 1365-73, Dec 1969a.

Li, F. P.; Fraumeni, J. F. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med**, v. 71, n. 4, p. 747-52, Oct 1969b.

Malkin, D. et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-8, Nov 1990.

McCuaig, J. M. et al. Routine TP53 testing for breast cancer under age 30: ready for prime time? **Fam Cancer**, v. 11, n. 4, p. 607-13, Dec 2012.

Mouchawar, J. et al. Population-based estimate of the contribution of *TP53* mutations to subgroups of early-onset breast cancer: Australian Breast Cancer Family Study. **Cancer Res**, v. 70, n. 12, p. 4795-800, Jun 15 2010.

Palmero, E. I. et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett**, v. 261, n. 1, p. 21-5, Mar 8 2008.

Pinto, E. M. et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 5, p. 647-50, Oct 2004.

Tinat, J. et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 26, p. e108-9; author reply e110, Sep 2009.

LEGENDS

Table 1. Clinical criteria for LFS diagnosis

Table 2. Families carriers of the p.R337H mutation distributed according to different LFS criteria

Figure 1. Pedigrees of the families affected by the germline *TP53* p.R337H mutation. The proband is indicated by an arrow; black symbol: patient affected by malignant tumor; yellow symbol: patient carrier of the p.R337H mutation; first information below the symbol: type of tumor and age at diagnosis.

Table 1

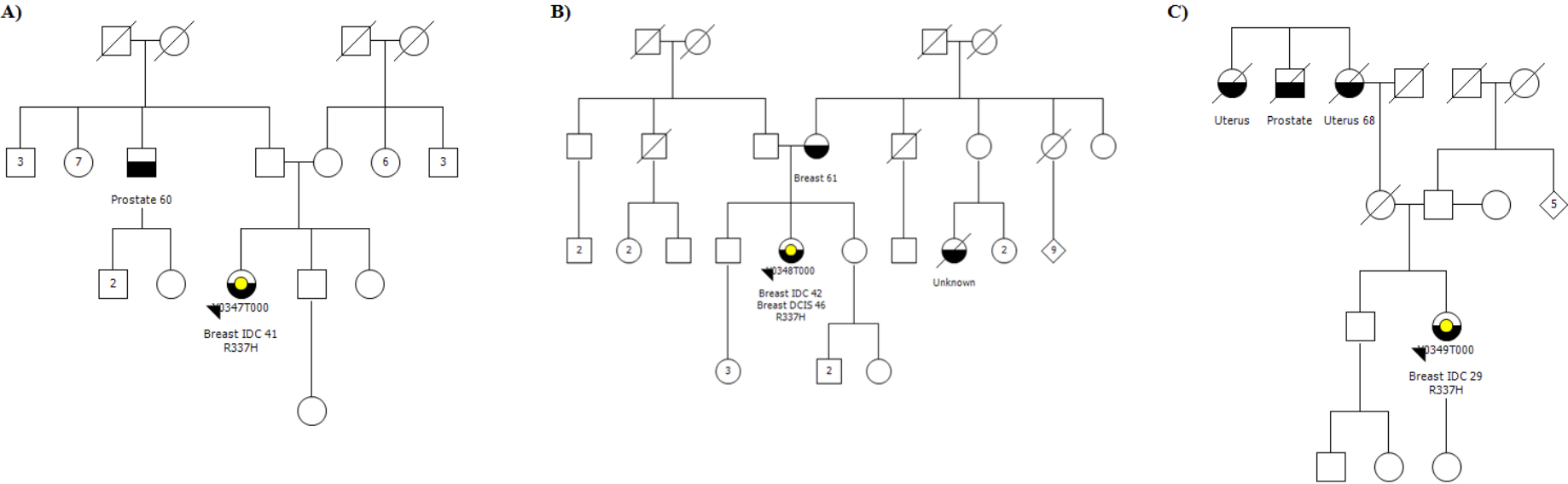
Criteria	Description	Reference
<i>Classic</i>	• Proband diagnosed with a STS before age 45 AND; – One first-degree relative with any tumor diagnosed before age 45 AND; – Another first- or second-degree relative diagnosed with any cancer before age 45 or a STS at any age	Li and Fraumeni, 1988
<i>Birch</i>	• Proband with a cancer diagnosed in childhood (STS, CNS, ADR) OR; • Proband diagnosed with a STS, SNC, or ADR before age 45 AND; – One first- or second-degree relative diagnosed with a tumor from the LFS spectrum at any age AND; – First- or second-degree relative diagnosed with any cancer before age 60	Birch, 1994
<i>Eeles</i>	• <i>LFL-Eeles 1</i> – Two first-or second- degree relatives diagnosed with a typical LFS tumor at any age • <i>LFL-Eeles 2</i> – Proband diagnosed with a STS at any age AND; – Two first-or second-degree relatives diagnosed with two different typical LFS tumors at any age	Eeles, 1995
<i>Chompret</i>	• Proband diagnosed with a typical LFS tumor before age 36 AND; – One first- or second-degree relative diagnosed with any cancer before age 46 OR; – One relative with multiple tumors diagnosed at any age • Proband with multiple primary tumors - including two typical LFS tumors - with the first diagnosed before age 36 regardless of family history • Proband with ADR at any age regardless of family history	Chompret, 2001
<i>Chompret 2009</i>	• Proband with a typical LFS tumor diagnosed before age 46 AND; – At least one first- or second-degree relative diagnosed with a typical LFS tumor (except breast cancer if the proband is/was affected by breast cancer) before age 56 OR a relative with multiple primary tumors OR; • Proband with multiple primary tumors (other than multiple breast tumors) - including at least two from LFS tumor spectrum - with the first diagnosed before age 46; • Proband diagnosed with ADR or CPC at any age irrespective of family history	Tinat, 2009

Abbreviations: STS: soft-tissue sarcoma; CNS: central-nervous system tumors; ADR: adrenocortical carcinoma; CPC: choroid-plexus carcinoma

Table 2

LFS/LFL Criteria	Number of families
Classic	1
Birch	13
Eeles	
Eeles 1	10
Eeles 2	5
Chompret	
Chompret 2001	7
Chompret 2009	3
None	3

Figure 1





Kelvin Andrade <kelvinesar.an@gmail.com>

Fwd: Genetics and Molecular Biology - Decision on Manuscript ID GMB-2014-0343.R2

3 mensagens

Maria Isabel <miachatz@gmail.com>
Para: Kelvin Andrade <kelvinesar.an@gmail.com>

29 de setembro de 2015 12:26

Início da mensagem encaminhada

De: editor@gmb.org.br
Data: 29 de setembro de 2015 12:17:04 BRT
Para: miachatz@gmail.com
Cc: editor@gmb.org.br
Assunto: Genetics and Molecular Biology - Decision on Manuscript ID GMB-2014-0343.R2

29-Sep-2015

Dear Dr. Achatz:

Your manuscript entitled "Early-onset breast cancer patients in South and Southeastern Brazil should be tested for the <i>TP53</i> p.R337H mutation." submitted for publication in Genetics and Molecular Biology has been evaluated by the assigned Associate Editor who concluded that you have adequately addressed the concerns raised by the reviewers.

Therefore, I am pleased to inform you that your manuscript is now accepted for publication.

As a next step, your manuscript will be checked by one of our copy editors for correction of language errors and technical inconsistencies.

You will receive an edited manuscript by e-mail for appreciation and approval of eventual corrections before starting the layout process.

From now on, all correspondence will be directly with the Editorial Office by e-mail: editor@gmb.org.br. Please remember to refer to your Manuscript ID number whenever you contact us.

On behalf of the Editors of Genetics and Molecular Biology, I would like to take the opportunity to thank you for submitting your interesting contribution to our journal.

Sincerely,
Dr. Carlos Menck
Editor in Chief, Genetics and Molecular Biology
editor@gmb.org.br

Reviewer(s)' Comments to Author:

Kelvin Andrade <kelvinesar.an@gmail.com>
Para: Maria Isabel <miachatz@gmail.com>

29 de setembro de 2015 13:21

Anexo 7 – Comprovante de submissão do artigo ao periódico Nature Genetics


manuscripttrackingsystem



[tracking system home](#) |
 [author instructions](#) |
 [reviewer instructions](#) |
 [help](#) |
 [tips](#) |
 [logout](#) |
 [journal home](#)

Detailed Status Information

Manuscript #	NG-A42967
Current Revision #	0
Submission Date	15th Feb 16
Current Stage	Manuscript submitted
Title	Lower than Expected Age-related Telomere Shortening in Individuals with the Germline TP53 p.R337H Mutation
Manuscript Type	Article
Manuscript Comment	Suggested reviewers: 1) David Malkin, MD, FRCP(C), FAAP Area of expertise: Li-Fraumeni syndrome Institution: The Hospital for Sick Children, Toronto/ON - Canada Phone: 416-813-5348 E-mail: david.malkin@sickkids.ca 2) Judy Garber, MD, MPH Area of expertise: Li-Fraumeni syndrome Institution: Dana-Farber Cancer Institute, Boston/MA - USA Phone: 617-632-5961 E-mail: judy_garber@dfci.harvard.edu 3) Alison Bertuch, M.D., Ph.D. Area of expertise: Telomeres and telomere biology disorders Institution: Baylor College of Medicine, Houston, TX - USA Phone: 832-824-4579 E-mail: abertuch@bcm.edu
Corresponding Author	Dr. Sharon Savage (National Cancer Institute, NIH)
Contributing Authors	Mr. Kelvin César de Andrade , Dr. Ana Best , Dr. Shahinaz Gadalla , Mrs. Karina Santiago , Ms. Casey Dagnall , Mrs. Payal Khincha , Ms. Fernanda Fortes , Mrs. Amanda Nobrega , Ms. Kedest Teshome , Dr. Pierre Hainaut , Dr. Phuong Mai , Dr. Maria Achatz
Authorship	Yes
Abstract	Features of healthy aging have been observed in Li-Fraumeni syndrome patients with the TP53 p.R337H founder mutation. Leukocyte telomere length, a marker of age-associated diseases, was measured by qPCR in 66 individuals with the TP53 p.R337H mutation, 65 with other germline TP53 mutations, and 112 controls. Multivariable analyses with kinship linear mixed effects models revealed statistically significant lower than expected age-related telomere shortening in individuals with the p.R337H mutation compared with other LFS patients ($p=0.0014$) and controls ($p=0.033$). This suggests that the p.R337H mutation may be involved not only in TP53-related carcinogenesis, but also in cellular senescence mechanisms such as telomere biology. The p.R337H mutation may confer a selective advantage which has led to its persistence across generations despite its association with increased cancer risk.
Subject Terms	Biological sciences/Genetics Biological sciences/Cell biology/Senescence
Show Author Information	Allow Reviewers to see Author information.
Competing Financial Interest	There is NO Competing Interest.
Applicable Funding Source	No Applicable Funding
Databank Requirements	I have no data to deposit in a repository