

**DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA  
SÍNDROME DE LI-FRAUMENI  
EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS**

**MARIA ISABEL WADDINGTON ACHATZ**

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

**Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: André Luiz Vettore**

**São Paulo**

**2006**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa  
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Achatz, Maria Isabel Waddington.

**Diagnóstico molecular da síndrome de Li-Fraumeni em famílias  
brasileiras/** Maria Isabel Waddington Achatz -- São Paulo 2006.

102p.

Dissertação(mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: André Luiz Vettore

Descritores: 1. SÍNDROME DE LI-FRAUMENI. 2. GENES SUPRESORES  
DE TUMOR. 3. GENES TP53/genética. 4. BIOLOGIA MOLECULAR. 5.  
SÍNDROMES NEOPLÁSICAS HEREDITÁRIAS.

## DEDICATÓRIA

*Aos meus filhos Thiago, Rafaela, Mariana e  
Felipe, e ao Michael, meus amores e  
grande motivo da minha Vida.*

## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço aos meus filhos tão amados, Thiago, Rafaela, Mariana e Felipe, por todas as vezes que abriram mão da minha presença, pela compreensão, carinho e incentivo. Por terem me permitido levar adiante o meu sonho. Agradeço a Deus a cada dia por vocês terem me escolhido.

Agradeço ao meu marido, Michael, pelo seu incentivo e confiança, por todos os momentos em que me levantou, que torceu por mim e junto comigo, desde a faculdade; pelo amor e atenção dado aos nossos filhos na minha ausência e, principalmente, pela nossa família.

Agradeço a Yvonne, pela sua presença constante, por me guiar a cada passo, pelo seu amor.

Agradeço aos meus pais, Ary e Maria Martha, por tudo o que vocês me ensinaram, por tudo que investiram em mim, pela confiança e pelo carinho.

Agradeço aos meus irmãos Eduardo e Roberto, por sempre estarem do meu lado, pela grande amizade que nos liga.

À Tereza, Joana e Alfredo, por me darem todo apoio e suporte para eu poder trabalhar. Pelo amor que vocês têm pelos meus filhos.

À Lídia Aratangy, por ter me ajudado a manter a estrutura e pelo carinho.

Ao Fábio Carramaschi, pela grande amizade e apoio, por sempre me ajudar a abrir meu caminho.

Às minhas amigas Lygia, Drika, Marisa, Alexia, Ana Luisa(s), Tisse e Juliana, que tanto me acompanharam e torceram por mim quando eu mais precisava.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador neste trabalho, Dr. André Vettore, pela disponibilidade, presteza e por me introduzir na Biologia Molecular.

Ao Dr. Pierre Hainaut por tudo que me ensinou. Obrigada por acreditar tanto em meu trabalho e por sempre me mostrar que sou capaz.

Aos amigos do laboratório de Genética do Câncer: ao Fabrício pela amizade e apoio molecular e psicológico, à Andréa Seixas, companheira de todos os momentos, à Letícia por seu grande carinho e atenção, à Valeria Paixão pelos primeiros passos no laboratório, ao Daniel pelas explicações e longas conversas, à Roberta Félix pelo carinho, ao Fábio pelos momentos de força, à Mariana, pelas dicas, à Luciane pela ajuda sempre pronta, à Fernanda, pelo apoio, Luciana e Benjamin pelas dúvidas patológicas, à Dinamar, Roberta Lessa, Cláudia, Simone, Valéria e Manuella pela simpatia diária, ao Alex e ao Emerson pelas ajudas informáticas, ao Luis e a Viviane pelas dicas pediátricas, à Andréa Trevisan pelo alto astral e por todos aqueles do laboratório que tem sempre uma palavra amiga.

Às Dras. Florence le Calvez, Magali Olivier, Ghyslaine Martel-Planche, Emanuella de Moraes, Emmanuelle Gormally e todos do MOC, por todo apoio e amizade. Por terem me acolhido de braços abertos no IARC.

À Dra. Lygia da Veiga Pereira, pelo infindável incentivo, pela primeira porta aberta, pelos conselhos e dicas sempre certeiras.

Ao Dr. Benedito Mauro Rossi, pela disponibilidade, pela sua orientação sempre pertinente e pela sua amizade.

À Dra. Patrícia Aschton-Prolla por trazer resposta a cada uma de minhas perguntas, pela confiança e ajuda e a Edénir Palmeiro pela presteza e carinho.

Ao Dr. Roberto Giuliani pelos controles de Porto Alegre.

Ao Dr. Fernando Regla Vargas pela confiança em me encaminhar as famílias cariocacas.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, pelo seu exemplo de força e coragem.

Ao Dr. Humberto Torloni, pelo grande apoio e incentivo.

Ao Dr. Carlos Lotfí, pela confiança e apoio.

Ao Dr. Décio Brunoni por ter me dado a oportunidade de dar continuidade a Oncogenética na UNIFESP, pelo seu apoio e discernimento.

Ao Dr. Alois Bianchi, pela sua atenção e exemplo de amor ao paciente.

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

Ao Dr. Luis Fernando Lima Reis, pela sua grande atenção e suporte.

Aos Drs. Vilma R. Martins, Dra. Luisa Lina Villa, Dra. Dirce Carraro, Dr. Alex Fiorini e Dra. Adriana Abalen, pelos comentários e pela proximidade que vocês nos propiciam.

Aos funcionários do Ludwig, Paulo Roberto, Birgit, Renata, Viviane, Carla, Andréa, Erica, Roseli, Rubens, Isabel e Sirléia, um grande agradecimento pelo apoio e dedicação.

À Dra. Fernanda Lima, amiga e consultora, por toda base, apoio e amizade.

À Dra. Simône Noronha por todas as dúvidas esclarecidas e pelo estímulo.

Ao Dr. José Cláudio Casali Rocha pelo ensino e introdução a Oncogenética.

Ao Prof. Dr. Fernando Soares, pela confiança e ajuda nos inúmeros pedidos de lâminas.

À Dra. Isabela Werneck, pela sua animação e por estar sempre pronta a ajudar.

A todos os funcionários do Departamento de Anatomia Patologia.

Ao Dr. Gustavo Guimarães, Dr. Luis Fernando Lopes, Dr. Stenio Zechi, Dr. Bachega, Dra. Cecília, Dra. Suzana Malheiros e a todos os médicos que confiaram em meu trabalho, encaminhando seus pacientes.

Ao Dr. André Lopes Carvalho pelas inestimáveis dicas estatísticas e profissionais.

À Dra. Gilda, por todas as longas conversas sobre ADRs.

À Dr. André Montagnini, Dr. Luiz Paulo Kowalsky, Prof. Dr. Ademar Lopes, Dra. Maria Tereza Cruz Lourenço, Dr. Mario Mourão, Dra. Beatriz de Camargo e por todos os departamentos que aceitaram o desafio de acompanhar as famílias SLF.

À enfermeira Erica pelo seu auxílio na compreensão do Cyrillic.

À Dra. Rima Jbili, Dr. Danilo Pena e Dr. Israel Gomy pelo apoio na investigação inicial dos pacientes.

À Dra. Ana Beatriz Perez pelo grande apoio, carinho e confiança, por tudo que me ensinou na Genética Médica.

À Dra. Vera Meloni, pelas palavras sempre amigas, por todos ensinamentos “dismorfológicos” e pelo teu exemplo.

Aos amigos do Centro de Genética Médica – UNIFESP: Dra. Mirlene cernach, Dra. Ana Maria Martins, Dra. Cecília Micheletti, Dra. Sylvia Longhitano, Dra. Leila Russowsky Brunoni, Dr. Luís Alonso, Dra. Ana Luisa Pilla, Dra. Nara Sobrera, Dr. Pablo Domingues, Dra. Flavia Piazon, Dr. Fernando Ferreira Dr. Jordão Correa Neto, Dr. Marco Ramos, Dra. Marli Rio, Dra. Tânia Seches, Dra. Sasndra Kyosen e as amigas Naja Vergani, Mariana Picarelli e Jane Francis.A Karla, Cida e Leandro pelo carinho e apoio.

Ao grupo do GBETH, meu agradecimento aos Dr. Gilles Landman, Dr. Fábio Ferreira, Dr. Samuel Aguiar Jr, Dr. Wilson Nakagaua, Dr. Francisco Coelho e por todos que contribuíram com criticas tão construtivas.

À Inês Nishimoto, por toda sua paciência na estatística e pela grande ajuda.

À psicóloga Christina Tarabay, por todo apoio que me deu ao aceitar acompanhar meus pacientes no aconselhamento pós-teste, por sua presença sempre alegre.

À Ana Maria Kuninari, a Márcia e Luciana, pelo apoio na pós-graduação.

Às bibliotecárias Suely Francisco, Rosinéia Carneiro e Francyne de Lima, pelo apoio sempre carinhoso e bem-humorado.

Às secretárias da Oncogenética Luciele, Leda, Michelle e Thiara, pelo apoio.

Aos funcionários do Lavoisier que me auxiliaram na coleta de sangue dos pacientes.

À FAPESP e ao National Cancer Institute (NCI /NIH - USA) pelo apoio financeiro e pela bolsa de transferência tecnológica (ICRETT) do Union Internationale Contre le Cancer (UICC).

## RESUMO

Achatz MIW. **Diagnóstico molecular da síndrome de Li-Fraumeni em famílias brasileiras.** São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome rara de predisposição ao câncer associada a mutações no gene *TP53*. É transmitida de forma autossômica dominante, predispondo indivíduos afetados ao risco aumentado de desenvolvimento de tumores em idade jovem. Os objetivos deste trabalho são caracterizar mutações germinativas no gene *TP53* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SLF e de sua variante Li-Fraumeni *like* (LFL), avaliar o papel das mutações na síndrome e estabelecer correlações genótipo-fenótipo. Foram incluídas 45 famílias brasileiras que preencheram os critérios clínicos da síndrome. A metodologia incluiu a amplificação dos dez éxons codificantes do gene *TP53* por PCR no DNA genômico e rastreamento de alterações por DHPLC, seguido de seqüenciamento das regiões suspeitas. Foram encontradas 13 mutações germinativas (29.5%), sendo 12 mutações *missense* e uma em sítio de *splicing*. A troca Arg337His (R337H), descrita anteriormente como relacionada exclusivamente a carcinomas adrenocorticais infantis, foi verificada em seis famílias com LFL. Foram detectadas três mutações novas, Val173Met, Val197Met e Gly244Asp, duas mutações já descritas, Arg213Gly e Gly245Ser, em famílias não relacionadas, e uma mutação em sítio doador de *splicing* do íntron 6. Verificou-se baixa prevalência de mutações em famílias SLF (11%). A mutação R337H ocorreu em frequência elevada (46,1%) nas famílias SLF brasileiras, predispondo ao amplo espectro tumoral. Tumores adrenocorticais foram 2,3 vezes mais frequentes em famílias com a mutação R337H se comparado a famílias com outras mutações, sugerindo efeito tecido-específico. Esta é a primeira descrição da prevalência de mutações no gene *TP53* nas SLF e LFL na América Latina, representando 4,6% das mutações descritas na literatura.

## SUMMARY

Achatz MIW. [Molecular diagnosis of Li-Fraumeni syndrome in Brazilian families]. São Paulo; 2006. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Li-Fraumeni syndrome (OMIM #151623) (LFS) is a rare cancer predisposition syndrome associated with germline mutations in the *TP53* gene (OMIM #191170). It is transmitted in an autosomal dominant pattern, which predisposes affected individuals to an increased risk of developing a variety of cancers at an earlier age. The objectives of this study were to analyze *TP53* mutations in Brazilian families who received clinical diagnosis of LFS and its variant, Li-Fraumeni-like syndrome (LFL). The molecular profile of the *TP53* gene was analyzed in 45 Brazilian unrelated individuals with family histories fulfilling the clinical definitions of LFS or LFL. Analysis of *TP53* exons 2 to 11 by PCR in genomic DNA, screening by DHPLC and sequencing of abnormal profiles revealed mutations in 13 patients (29.5%). Twelve missense mutations were detected and one splice site mutation. Arg337His (R337H) mutations, previously described as related only to adrenocortical tumors in children, were detected in 6 families. Three novel germline mutations (Val173Met, Val197Met and Gly244Asp) and two already described mutations (Arg213Gly e Gly 245Ser) were also detected in three families. Families fulfilling the classical definition of LFS presented a low detection rate (11%). R337H mutations were frequent in Brazilian LFS families (46,1%), predisposing to a wide tumour spectrum. Adrenocortical tumors are 2,3 times more frequent among R337H carriers if compared to other mutations, suggesting a tumor-specific effect. This is the first description of *TP53* gene prevalence and mutation pattern among SLF/LFL in Latin America, representing 4.6% of all mutations described in scientific literature.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	O gene <i>TP53</i> e a proteína <i>p53</i> .	13
<b>Figura 2</b>	Perfil de tumores das famílias brasileiras com mutações no gene <i>TP53</i> comparado ao perfil de tumores em outras famílias com a mutação no gene <i>TP53</i> depositadas no banco de dados do IARC.	46
<b>Figura 3</b>	Perfil de tumores das famílias brasileiras com mutações R337H no gene <i>TP53</i> comparado ao perfil de tumores em outras famílias com a mutação no gene <i>TP53</i> depositadas no banco de dados do IARC.	49
<b>Figura 4</b>	Digestão enzimática do códon 337 do éxon 10 do gene <i>TP53</i> pela técnica de RFLP.	55
<b>Figura 5</b>	Heredograma da família Y12.	61
<b>Figura 6</b>	Heredograma da família Y 27.	62
<b>Figura 7</b>	Heredograma da família Y49.	63

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Perfil clínico das famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SLF e LFL.	35
<b>Tabela 2</b>	Perfil tumoral de pacientes com diagnóstico clínico da SLF e LFL.	37
<b>Tabela 3</b>	Perfil de mutações das famílias brasileiras com mutações no gene <i>TP53</i> .	40
<b>Tabela 4</b>	Espectro tumoral de 13 famílias brasileiras com mutações no gene <i>TP53</i> .	44
<b>Tabela 5</b>	Idade de acometimento de tumores em de pacientes com diagnóstico clínico da SLF e LFL.	48
<b>Tabela 6</b>	Espectro tumoral de 32 famílias brasileiras com diagnóstico clínico da SLF e LFL sem detecção da mutação no gene <i>TP53</i> .	51
<b>Tabela 7</b>	Frequência de polimorfismos no gene <i>TP53</i> na população brasileira.	56
<b>Tabela 8</b>	Protocolo de rastreamento para pacientes portadores da SLF e LFL adaptado à população brasileira.	65

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b>	Tumores mais freqüentemente associados à SLF e LFL.	6
<b>Quadro 2</b>	Critérios diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni.	8
<b>Quadro 3</b>	Protocolo de rastreamento na Síndrome de Li-Fraumeni- <i>National Comprehensive Cancer Network (NCCN).</i>	22
<b>Quadro 4</b>	Seqüência de primers utilizados nas reações de PCR para DHPLC e seqüenciamento.	30
<b>Quadro 5</b>	Descrição de linhagens celulares usadas como controles positivos no DHPLC.	31

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADR</b>	Carcinoma adrenocortical
<b>BSA</b>	<i>Bovine serum albumin</i>
<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>DNA</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>DHPLC</b>	<i>Denaturing High Performance Liquid Chromatography</i>
<b>KD</b>	Quilodalton
<b>IARC</b>	<i>International Agency for the Research on Cancer</i>
<b>LFL-B</b>	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Birch
<b>LFL-E1</b>	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Eeles 1
<b>LFL-E2</b>	Síndrome de Li-Fraumeni <i>like</i> , critérios de Eeles 2
<b>µL</b>	Microlitro
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>OMIM</b>	<i>On-line Mendelian Inheritance in Men</i>
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCR</b>	<i>Polimerase chain reaction</i>
<b>PCR-RFLP</b>	<i>Restriction fragment length polimerase chain reaction</i>
<b>Pellet</b>	Precipitado linfocitário
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SLF</b>	Síndrome de Li-Fraumeni
<b>SNC</b>	Tumores do sistema nervoso central
<b>SNPs</b>	<i>Single nucleotide polymorphisms</i>
<b>SO</b>	Sarcoma ósseo
<b>SPM</b>	Sarcoma de partes moles
<b>WHO</b>	<i>World Health Organization</i>

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	Histórico	1
1.2	Herança genética e penetrância	3
1.3	Quadro clínico e critérios diagnósticos	5
1.4	Diagnóstico diferencial	9
1.5	O gene <i>TP53</i> e proteína p53—estrutura e função	11
1.6	Mutações e polimorfismos no gene <i>TP53</i>	15
1.7	Envolvimento de CHEK2 com a SLF e LFL	17
1.8	Correlação genótipo-fenótipo	18
1.9	Aconselhamento genético e rastreamento	20
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>25</b>
2.1	Objetivo geral	25
2.2	Objetivos específicos	25
<b>3</b>	<b>PACIENTES E MÉTODOS</b>	<b>26</b>
3.1	Seleção dos pacientes	26
3.2	Extração de DNA	28
3.3	Identificação das mutações no gene <i>TP53</i>	29
3.4	Análise de alterações detectadas por PCR-RFLP	33
<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>34</b>
4.1	Caracterização clínica das famílias SLF e LFL avaliadas	34
4.2	Deteção de mutações germinativas em famílias brasileiras com o diagnóstico clínico da SLF e LFL	39
4.3	Perfil tumoral em famílias brasileiras com mutações germinativas e diagnóstico clínico da SLF e LFL	42
4.4	Perfil tumoral em famílias brasileiras sem a detecção de mutações germinativas e com diagnóstico clínico da SLF e LFL	50

4.5	Avaliação dos polimorfismos encontrados no gene <i>TP53</i>	54
4.6	Aconselhamento genético e acompanhamento	57
4.7	Deteção de mutação em familiares sintomáticos e assintomáticos	59
4.8	Adaptação do protocolo de rastreamento clínico multidisciplinar	64
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>91</b>

## ANEXOS

**Anexo 1** Artigo original em periódico: “Achatz MIW, Olivier, Vettore A, Hainaut P. Cancer letters, *in press*; MS. Ref. No: CAN-D-05-00532R1. (Recebido em 15 de novembro de 2005; revisado em 22 de dezembro de 2005; aceito em 22 de dezembro de 2005. Disponível *online* 21 de fevereiro de 2006.).

**Anexo 2** Artigo de revisão em periódico: “*TP53* gene and Li-Fraumeni syndrome”. Achatz MIW and Hainaut P. Applied Cancer Research 2005; 25(2):51-57.

**Anexo 3** Capítulo de livro: “Síndrome de Li-Fraumeni”. Organizadores: Carlos Gil Ferreira e José Cláudio Rocha. In: Oncologia Molecular (ISBN: 85-7379-692-8). Editora Atheneu, 2004.

**Anexo 4** Ficha de avaliação clínica

**Anexo 5** Consentimento informado

**Anexo 6** Carta de Aprovação do comitê de ética

**Anexo 7** Heredogramas

**Anexo 8** Laudos fornecidos aos probandos

**Anexo 9** Laudos fornecidos aos familiares

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 HISTÓRICO

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

A caracterização inicial do espectro tumoral da síndrome incluía como critérios principais para o diagnóstico a presença de osteossarcomas, sarcomas de partes moles, câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, tumores cerebrais, tumores adrenocorticais e leucemias agudas sendo inicialmente denominada SBLA (*sarcoma, breast, leukemia and adrenocortical tumor syndrome*). No entanto, desde a descrição inicial da síndrome, verificou-se um amplo espectro tumoral, incluindo tumores primários malignos de estômago, cólon, pâncreas, esôfago, além de tumores

de células germinativas e melanoma (LI et al. 1988; HARTLEY et al. 1989; VARLEY et al. 1997a).

Em 1990, a SLF foi associada a mutações germinativas no gene *TP53* (OMIM #191170) (MALKIN et al. 1990). O gene *TP53* foi escolhido como candidato por ser o gene mais freqüentemente mutado na maior parte dos tumores malignos esporádicos. Estudos subseqüentes demonstraram que a mutação no gene *TP53* estava presente em grande parte de famílias com o perfil clínico da síndrome (SRIVASTAVA et al. 1990).

Em 1994, BIRCH et al. analisaram 21 famílias, sendo que 12 preenchiam os critérios clássicos propostos por Li e Fraumeni, além de nove famílias que apresentavam características semelhantes à síndrome, mas que, no entanto, não preenchiam todos os pré-requisitos para receberem o diagnóstico clínico de SLF. Das nove famílias que apresentavam perfil semelhante à SLF, sete tiveram a caracterização da mutação germinativa no gene *TP53*. Visando definir o diagnóstico clínico e molecular das famílias que não tinham a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome, mas que apresentavam tumores típicos em idade precoce, um critério diagnóstico adicional ao da SLF clássica foi proposto, sendo denominado Li-Fraumeni variante ou Li-Fraumeni *Like* (LFL) (BIRCH et al. 1994). Posteriormente, EELES (1995) propôs a inclusão de critérios mais abrangentes para a variante da SLF, incluindo famílias nas quais eram detectados pelo menos dois tumores típicos do espectro da síndrome.

O espectro tumoral inicialmente relacionado à SLF e LFL foi revisto após a descrição de diversos outros tipos de tumores ocorridos em famílias que receberam o diagnóstico da síndrome. CHOMPRET et al. (2001) demonstraram a presença de

melanoma, tumores de células germinativas, tumores gástricos e tumores de Wilms nas famílias portadoras da síndrome. NICHOLS et al. (2001) avaliaram 738 tumores malignos provenientes de 45 indivíduos portadores da mutação em *TP53* e em seus familiares de primeiro grau, além de 140 casos relatados na literatura, e concluíram que os seis tumores inicialmente descritos como critérios da SLF (mama, sarcoma. SNC, leucemia, osteossarcoma e adrenocortical) correspondiam a 77% dos tumores apresentados nas famílias portadoras das mutações germinativas no gene *TP53*. BIRCH et al. (2001) descreveram o espectro tumoral de 28 famílias com a SLF e LFL e referiram como tumores mais freqüentes o câncer de mama, sarcomas de partes moles, tumores adrenocorticais, osteosarcomas, tumores cerebrais e tumores de Wilms’.

## **1.2 HERANÇA GENÉTICA E PENETRÂNCIA**

A SLF é uma síndrome rara de predisposição ao câncer de alta penetrância, que apresenta caráter autossômico dominante. Estima-se que pacientes com SLF e sua variante LFL apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, comparados a 1% na população geral, e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 60 anos de idade (BIRCH et al. 2001). LE BIHAN et al. (1995) avaliaram a estimativa do risco de desenvolvimento de algum tumor maligno associada à idade dos pacientes SLF e LFL. Os pesquisadores consideraram que do nascimento até os 16 anos de idade o risco para o desenvolvimento de câncer era de 42%, de 17 a 45 anos o risco era de 38% e que após os 45 anos esse risco chegaria a 63%, sendo o risco total ao longo da vida de 85%. VARLEY et al. (1997b)

compararam as idades ao diagnóstico dos tumores em pacientes provenientes de famílias com SLF e LFL. Na série estudada, dentre os pacientes com o diagnóstico de SLF, 56% apresentaram tumores malignos antes dos 30 anos e 100% até os 50 anos. Na mesma série, avaliando-se os pacientes com o diagnóstico de LFL, verificou-se que 44% dos apresentaram tumores malignos antes dos 30 anos e 78% destes pacientes desenvolveram câncer antes dos 50 anos. Este fato demonstrou que pacientes com o diagnóstico clínico de LFS apresentam um maior risco para o desenvolvimento de tumores malignos.

Os pacientes portadores da SLF e LFL têm risco aumentado de desenvolvimento de múltiplos tumores primários, sendo que os indivíduos portadores que desenvolveram algum tumor na infância são mais susceptíveis a apresentar mais de um tumor primário (HISADA et al. 1998). Neste estudo, realizado em famílias residentes nos Estados Unidos da América com diagnóstico de SLF e LFL, HISADA et al. (1998) avaliaram 200 membros de famílias SLF nos quais já havia sido diagnosticado algum tumor e, dentre os indivíduos avaliados, 15% desenvolveram um novo tumor primário, 4% apresentaram um terceiro tumor primário e 2 % tiveram quatro tumores primários diagnosticados.

Alguns outros fatores demonstraram estar envolvidos no aumento de risco no desenvolvimento de tumores na SLF e LFL. LIMACHER et al. (2001) sugeriram haver uma maior incidência de tumores secundários em regiões tratadas por radioterapia. Isto foi verificado em uma paciente portadora da mutação germinativa no gene *TP53* que havia apresentado um câncer de mama e que apresentou dois novos tumores primários, sendo estes adenocarcinoma de células pequenas de pulmão e adenocarcinoma de cólon, ambos os tumores ocorridos no campo

radioterápico da mama interna e no campo envolvido na irradiação do ovário. NUTTING et al. (2000) relataram a incidência de 17 tumores primários em uma única paciente portadora da mutação germinativa característica da SLF que havia sido submetida à radioterapia e a quimioprevenção com o uso do Tamoxifeno após ter apresentado um câncer de mama. Além disso, a exposição à radiação ionizante, radiação gama, raios UV, agentes oxidantes, drogas citotóxicas e agentes químicos causadores de câncer podem aumentar o risco de desenvolvimento de tumores relacionados à síndrome (HISADA et al. 1998; NUTTING et al. 2000; LIMACHER et al. 2001).

Acredita-se que o risco de desenvolvimento de tumores nos portadores da SLF e LFL seja maior em mulheres. CHOMPRET (2002) definiu o risco em mulheres portadoras da síndrome de desenvolvimento de câncer de 100% enquanto que em homens esse risco seria de 73%, sendo esta diferença atribuída, em parte, ao alto risco de desenvolvimento de câncer de mama, no entanto outros estudos que corroborem esta afirmação precisam ser realizados.

### **1.3 QUADRO CLÍNICO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS**

As manifestações clínicas da SLF e LFL são caracterizadas pela alta incidência de tumores malignos de ocorrência em idade jovem. É uma doença multissistêmica e de penetrância variável. Os tumores mais verificados na SLF e LFL são sarcomas de partes moles (SPM), cânceres de mama, sarcomas ósseos (SO), tumores do sistema nervoso central (SNC), tumores adrenocorticais (ADR) e leucemias de início precoce. Devem-se relacionar ainda outros tipos de câncer que

podem ocorrer nesta síndrome, dentre eles tumores colorretais (CCR), estômago, pulmão, melanoma e tumores de células germinativas (Quadro 1).

**Quadro 1** - Tumores mais freqüentemente associados à SLF e LFL.

Tumores infantis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sarcomas de partes moles e ósseos</li> <li>• Sistema nervoso central</li> <li>• Câncer adrenocortical</li> <li>• Linfoma / Leucemia</li> <li>• Tumor de células germinativas</li> <li>• Tumor de Wilms</li> </ul>
Tumores em adultos	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Câncer de Mama</li> <li>• Sarcomas de partes moles e ósseos</li> <li>• Sistema nervoso central</li> <li>• Câncer de pulmão</li> <li>• Linfoma / Leucemia</li> <li>• Câncer gástrico</li> <li>• Câncer de cabeça e pescoço</li> <li>• Câncer de próstata</li> <li>• Câncer de pâncreas</li> <li>• Câncer de ovário</li> <li>• Câncer de endométrio</li> </ul>

A anamnese e história familiar dos pacientes que desenvolveram tumores típicos da síndrome devem ser minuciosas e seguidas da investigação sobre outros casos de câncer na família. A SLF e LFL acometem várias gerações, sendo freqüente o acometimento de tumores em múltiplos familiares em cada geração. O diagnóstico da síndrome inicialmente é clínico, realizado a partir da observação e anotação dos diversos casos relatados pelas famílias avaliadas. O diagnóstico clássico da SLF é realizado a partir de um paciente índice, ou probando, que apresentou sarcoma em idade jovem (antes dos 45 anos); com um parente de primeiro grau com qualquer

câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) além de outro parente de primeiro ou segundo grau com diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade (LI et al. 1988) (Quadro 2).

BIRCH et al. (1994) sugeriram critérios diagnósticos mais abrangentes do que a definição clássica da síndrome, que foram denominados critérios de Li-Fraumeni *like*. Estes critérios sugerem que a variante da síndrome pode ser definida a partir da existência de um probando com câncer infantil ou que apresentou sarcoma, tumor cerebral ou carcinoma adrenocortical em idade jovem (antes dos 45 anos), associado à presença de um parente de primeiro ou segundo grau com câncer típico da SLF (sarcoma, câncer de mama, câncer do sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade e, além disso, mais um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos (Quadro 2).

Em 1995, EELES propôs critérios diagnósticos definindo a LFL a partir de dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumores relacionados à SLF em qualquer idade (Quadro 2). Nestes critérios, foi proposta a inclusão de pacientes que apresentam múltiplos tumores primários e que por si próprios preenchem os critérios para SLF ou LFL, associados ou não a outros tumores na família. EELES (2000) propôs ainda a inclusão de famílias nas quais tivesse ocorrido um sarcoma em qualquer idade associado a outro caso de tumores típicos da síndrome em qualquer idade.

Posteriormente, CHOMPRET et al. (2001) sugeriram critérios diagnósticos que elegeriam pacientes para detecção de mutações no gene *TP53*. Estes critérios são muito amplos e por este motivo não são frequentemente empregados no diagnóstico clínico da síndrome. Além disso, é verificada a baixa taxa de detecção de mutação

em pacientes que receberam o diagnóstico de SLF e LFL a partir destas definições (VARLEY et al. 1997a) (Quadro 2).

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

Clássico Li e Fraumeni	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) e</li> <li>• Parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e</li> <li>• Parente de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.</li> </ul>
Birch	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Câncer na infância ou sarcoma, tumor do sistema nervoso central ou câncer adrenocortical antes dos 45 anos e</li> <li>• Parente de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, tumor do sistema nervoso central, câncer adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade e</li> <li>• Parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.</li> </ul>
Eeles	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>LFL-E1</b> presença de dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, tumor adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático).</li> <li>• <b>LFL-E2:</b> sarcoma em qualquer idade no probando com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo) câncer de mama &lt;50 anos e/ou tumor SNC, leucemia, tumor adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático aos &lt;60 anos ou sarcoma em qualquer idade.</li> </ul>
Chomperet	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical antes dos 36 anos e             <ul style="list-style-type: none"> <li>a) Parente de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos</li> <li><b>ou</b></li> <li>b) Parente com múltiplos tumores primários em qualquer idade</li> </ul> </li> <li>• Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar.</li> <li>• Câncer adrenocortical em qualquer idade e independente da história familiar.</li> </ul>

## 1.4 DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

Algumas famílias SLF e LFL apresentam quadros clínicos que se sobrepõem aos de outras síndromes genéticas ligadas ao câncer. A alta incidência de tumores de mama em idade jovem é uma característica marcante da SLF e LFL e também é verificada em outras síndromes levando a dificuldade no diagnóstico preciso. Aproximadamente 80 a 90% dos tumores da mama hereditários estão relacionados à Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário que está associada a mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Pacientes portadores desta síndrome apresentam um risco de 87% de desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos de idade (THULL e VOGEL 2004). Além dos tumores de mama, pacientes portadores de mutações nos genes *BRCA1* ou *BRCA2* apresentam maior risco para o desenvolvimento de câncer de ovário, que acomete 44% das mulheres portadoras da síndrome, além de melanoma, tumores malignos de próstata, pâncreas e estômago (*Breast Cancer Linkage Consortium* 1999).

Outra síndrome na qual é verificado o alto risco para o desenvolvimento de câncer de mama é a Síndrome de Cowden, relacionada a mutações germinativas no gene *PTEN*. Indivíduos portadores desta síndrome apresentam o risco de 22 a 50% de desenvolvimento de câncer de mama em idade jovem, com o diagnóstico ocorrendo entre 38 e 46 anos, além da ocorrência de outros tumores relacionados à SLF e LFL, como o câncer de endométrio (BROWNSTEIN et al. 1978; STARINK et al. 1986; BLACK et al. 2005).

A presença de casos de câncer gástrico difuso associado ao câncer lobular da mama pode levantar a suspeita da Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário,

causado pela mutação germinativa no gene *CDHI*. Em uma família portuguesa com os critérios diagnósticos incompletos para o diagnóstico da Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário e sem mutação no gene *CDHI* foi verificada a mutação germinativa do gene *TP53* característica da SLF (OLIVEIRA et al. 2004). KIM et al. (2004) relataram a presença de uma mutação germinativa no gene *TP53* em uma família previamente descrita como portadora da Síndrome do Câncer Gástrico Difuso Hereditário.

A Síndrome do Câncer Colorretal não Polipose (HNPCC) ou síndrome de Lynch, relacionada às mutações nos genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hPMS1*, *hPMS2*, *GTBP/hMSH6*, é caracterizada pela presença de casos de tumores colorretais em idade jovem podendo ser associada à presença de tumores de endométrio, bexiga e mama, que também fazem parte do espectro da SLF e LFL (LYNCH 1994; ROSSI et al. 2002; COURA et al. 2005). A presença de tumores malignos de outras etiologias em idade jovem em famílias com este diagnóstico devem ser estudada detalhadamente, aventando-se o diagnóstico diferencial com a SLF e LFL.

A presença de mutações germinativas no gene *TP53* em pacientes que apresentam tumores esporádicos, sem história familiar de outros tumores, foi verificada em diversos tipos histológicos. Este fato é verificado em portadores de tumores adrenocorticais, nos quais se estima que 50 a 97% apresentem mutações germinativas no gene *TP53* (WAGNER et al. 1994; VARLEY et al. 1997a; FIGUEIREDO et al. 2005). Estima-se que até 10% das crianças que apresentam tumores de sistema nervoso central sem outros casos de câncer na família são portadores da mutação germinativa no gene *TP53* (FELIX et al. 1995; LI et al. 1995). Acredita-se que pacientes com diagnóstico de rhabdomyosarcoma serão portadores

em 9% dos casos de mutações germinativas no gene *TP53*, independente de terem ou não história familiar de outros tumores (DILLER et al. 1995). O mesmo pode ser verificado em pacientes com osteosarcoma, nos quais se estima que 2 a 3% dos casos apresentem mutações germinativas no mesmo gene (McINTYRE et al. 1994). A ocorrência de mutações germinativas no gene *TP53* nestes tumores isoladamente, na ausência de história familiar, pode ser explicada pela ocorrência de mutações de novo. Em famílias nas quais múltiplos tumores precoces ocorrem, mas que não apresentam, no entanto, os critérios diagnósticos da SLF e LFL, a taxa de detecção de mutação é de 7 a 20% (MALKIN et al. 1992).

Frente ao fato de existirem diversas síndromes genéticas ligadas ao câncer com quadros clínicos que podem se sobrepor e frente à presença da mutação germinativa no gene *TP53* em tumores esporádicos, torna-se fundamental a realização de uma investigação mais aprofundada das famílias acometidas. A obtenção da história familiar de forma adequada, aprofundando-se quanto aos detalhes sobre os tumores ocorridos e incluindo informações sobre familiares provenientes de no mínimo três gerações deve ser sempre realizada, possibilitando a realização do diagnóstico diferencial das diferentes síndromes.

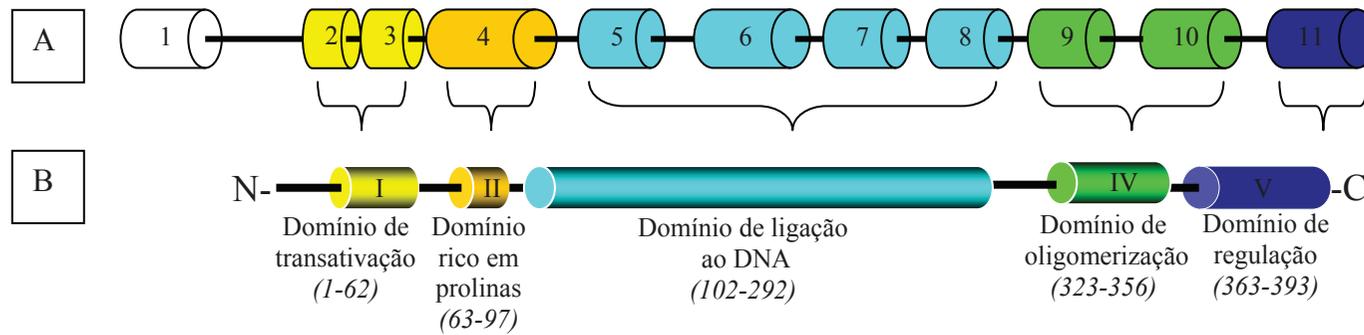
## **1.5 O GENE *TP53* E A PROTEÍNA *P53* – ESTRUTURA E FUNÇÃO**

O gene envolvido na SLF e LFL é o gene supressor de tumor *TP53* (OMIM #191170), localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13). Este gene tem o tamanho aproximado de 20 kb, é composto por onze éxons, sendo o primeiro deles não codificante, e produz um mRNA de 2.508 pb. O *TP53* codifica a fosfoproteína

nuclear p53, formada por 393 aminoácidos e de peso molecular de 53 KDa, que se liga a seqüências específicas de DNA e age como fator de transcrição dos genes reguladores do crescimento celular (CRAWFORD et al. 1981; HAINAUT 1995)

A proteína p53 humana possui cinco domínios, cada um deles responsável por funções específicas (MAY e MAY 1999). O domínio inicial (aminoácidos 1 a 62), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína Mdm2. É seguido por um domínio rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97) e pela região central da p53 (aminoácidos 102 a 292), que abriga o domínio de ligação ao DNA. Este domínio de ligação ao DNA é alvo de mais de 90% das mutações encontradas nos tumores humanos e na SLF e LFL. O domínio de oligomerização (aminoácidos 323 a 356) é fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros. O domínio final é o de regulação (aminoácidos 363 a 393) (Figura 1).

A proteína p53 foi descrita por dois grupos distintos de pesquisadores em 1979, liderados por David Lane, da Universidade de Dundee, no Reino Unido (RU) e Arnold Levine, da Universidade de Princeton, nos Estados Unidos da América (EUA) (LANE e CRAWFORD 1979; REICH e LEVINE 1979). Inicialmente, foi considerada como produto de um oncogene, porém no final dos anos 80 verificou-se que esta propriedade devia-se a apenas algumas formas mutantes do gene, enquanto que o gene selvagem tinha a capacidade de suprimir a transformação de um tumor, seja *in vitro* ou *in vivo* (FINLAY et al. 1989).



Legenda: (A): Representação dos éxons (cilindros) 1 a 11 do gene *TP53*; (B): Representação da proteína p53. As cores representadas nos éxons correspondem aos domínios correlacionados na proteína.

**Figura 1** - O gene *TP53* e a proteína p53.

Em 1990, o gene *TP53* foi apontado como gene candidato da SLF, uma vez que mutações foram detectadas em pacientes com o diagnóstico clínico da síndrome (MALKIN et al. 1990; SRIVASTAVA et al. 1990). Dois anos mais tarde foram produzidos camundongos nocauteados (*Trp53*) ou *knock-out*, portadores de mutações no gene *TP53*. Os camundongos apresentaram desenvolvimento físico normal, porém apresentaram tumores múltiplos em idade precoce demonstrando, a partir de um modelo animal, a importância da proteína p53 na etiologia dos tumores malignos (DONEHOWER et al. 1992).

A proteína p53 é um fator de transcrição expresso constitutivamente nos mais variados tipos celulares e tecidos. Danos ao DNA, tais como quebras ou oxidação do DNA e hipóxia, emitem sinais que ativam a p53. Devido a seu reduzido tempo de atividade, variando de cinco a 20 minutos, a proteína não se acumula no núcleo. Em resposta a certos estímulos a sua produção aumenta e passa então a se acumular no núcleo da célula. Desta forma, a p53 irá exercer o seu efeito através do controle transcricional, ativando ou reprimindo genes específicos envolvidos em sua via, promovendo a parada do ciclo celular, principalmente na fase G1, ou induzindo a célula à apoptose (HAINAUT 1995). O papel fundamental da p53 na regulação do ciclo celular, na apoptose e no reparo do DNA consagrou-a com a denominação de “guardião do genoma” (LANE 1992).

O principal regulador da p53 é a proteína Mdm2, uma proteína que se liga à região N-terminal da p53, formando o complexo p53/Mdm2. Este complexo possibilita o redirecionamento da p53 do núcleo para o citoplasma, onde a p53 será degradada pelos proteassomas. A extensão e conseqüências da ativação da p53 vão depender da intensidade dos sinais de indução e da sua origem. No caso da resposta a

exposição à radiação ionizante, a ativação da p53 ocorrerá a partir da fosforilação de sua região N-terminal por quinases tais como Atm e Chk2, quinases regulatórias do ciclo celular. A fosforilação levará a dissociação do complexo p53/Mdm-2 e logo a estabilização da p53 (MOLL e PETRENKO 2003).

## 1.6 MUTAÇÕES E POLIMORFISMOS NO GENE *TP53*

Mais de 18.000 mutações pontuais no gene *TP53* foram detectadas, sendo 97% somáticas e 3% germinativas. Mutações somáticas no *TP53* estão presentes em mais de 50% de todos os tumores somáticos, podendo variar de 10 to 60%, dependendo do tipo de tumor ou da população estudada, o que faz com que este gene seja considerado um dos genes mais freqüentemente mutados em cânceres humanos (LEVINE 1997; HAINAUT e HOLLSTEIN 2000).

As mutações germinativas encontradas no gene *TP53* levam ao desenvolvimento de câncer hereditário, representando um exemplo do primeiro passo do modelo de KNUDSON (1971). Mutações germinativas no gene *TP53* foram encontradas em aproximadamente 71% das famílias com SLF clássica e em 8% a 22% a das famílias com LFL, de acordo com os critérios de Eeles e Birch respectivamente (VARLEY et al. 1997b). Até o momento, foram identificadas 283 mutações germinativas no gene *TP53* descritas em 280 indivíduos ou famílias, depositadas no banco de dados de mutações em *TP53* da Agência Internacional para Pesquisa do Câncer – *International Agency for the Research on Cancer* (IARC *TP53* Database R10) (OLIVIER et al. 2002).

As mutações germinativas no gene *TP53* tendem a ocorrer predominantemente no domínio central de ligação ao DNA, codificado pelos éxons 5 a 8 e ainda nos éxons 4 e 9 (OLIVIER et al. 2003). Cerca de 75% destas mutações, tanto somáticas como germinativas, são do tipo *missense*, ou seja, promovem alterações que levam a troca de aminoácidos, ocorrendo principalmente transições de guanina para adenina. As mutações *frameshift* (que alteram a janela de leitura) ocorrem em 6% dos casos enquanto que alterações nos sítios de *splicing* representam 2% dos casos (IARC *TP53* Database R10). Mutações *non-sense*, nas quais ocorre uma inserção de um códon de terminação da tradução prematuro, podem ocorrer, além de duplicações nas diferentes regiões (VARLEY 2003a). Deleções no gene *TP53* aparentemente não são freqüentes, porém já foram relatadas (BOUGEARD et al. 2003).

A pesquisa por alterações na região promotora do gene é fonte de grande interesse atual, sendo vislumbrada como possível sítio de alteração nos pacientes com SLF e LFL sem a detecção da mutação no gene *TP53*. ATTWOOLL et al. (2002) descreveram uma deleção na região promotora deste gene em dois probandos dentre 18 indivíduos com diagnóstico SLF e LFL, mas concluíram que se tratava de um polimorfismo raro.

O padrão ouro, ou *gold standard*, para rastreamento das mutações no gene *TP53* é o seqüenciamento direto de DNA genômico de todos os éxons codificantes (exons 2 a 11), do primeiro éxon que não é codificante, da região promotora, da região 3' não traduzida e todos os sítios de junção de *splicing* (VARLEY 2003a). Aproximadamente 95% das mutações podem ser detectadas pelo seqüenciamento direto dos éxons 4 a 9, mas devem-se procurar alterações em todos os éxons

codificantes. Deve-se levar em conta que caso a alteração seja devida a inversões, duplicações ou grandes deleções, a alteração poderá não ser detectada pela técnica de seqüenciamento (BOUGEARD et al. 2003).

Mais de 30 polimorfismos no gene *TP53* foram descritos até o momento (IARC *TP53* Database R10). Estes polimorfismos ocorrem tanto em regiões intrônicas como nos éxons. A presença do polimorfismo no códon 72, localizado no éxon 4 do gene *TP53*, já foi extensamente estudada e relacionada à maior incidência de neoplasias de pulmão, esôfago, cérvix e estômago (SUL et al. 2005). Existem diversas evidências de que este polimorfismo possa ter impacto funcional na susceptibilidade ao câncer e na resposta à quimioterapia (BERGAMASCHI et al. 2003; XU et al. 2005). Outros polimorfismos vem sendo alvo de estudos recentes. O polimorfismo 13964, no íntron 6, foi relacionado à maior incidência de câncer de tireóide em crianças da Bielorrússia e a câncer de mama familiar, porém não foi confirmado como fator determinante na SLF (HILLEBRANDT et al. 1997; LEHMAN et al. 2000).

## **1.7 ENVOLVIMENTO DO GENE *CHK2* COM A SLF e LFL**

Alguns estudos foram realizados correlacionando as SLF e LFL e mutações germinativas no gene *CHK2*. BELL et al. (1999) detectaram a presença de mutações germinativas no gene *CHK2* (*Cell-cycle checkpoint kinase-2*) (OMIM #604373) em famílias com o fenótipo SLF e LFL e na ausência de mutações germinativas no gene *TP53*. VAHTERISTO et al. (2001) verificaram a ocorrência de mutações germinativas no gene *CHK2* em duas dentre 44 famílias finlandesas com as SLF e LFL que não apresentavam mutações germinativas no gene *TP53*. SIDDIQUI et al.

(2005) avaliaram a incidência de mutações germinativas no gene *TP53* e da alteração *CHK2\*1100delC* no gene *CHK2* (a mais frequentemente relacionada ao aumento de risco na síndrome) em 23 famílias com fenótipo SLF e LFL. Foram detectadas mutações no gene *TP53* em sete famílias e apenas uma delas apresentou a alteração *CHK2\*1100delC*.

Até o presente, cinco famílias com mutação germinativa no gene *CHEK2* foram incluídas no banco de dados de mutações germinativas do IARC, todas com a detecção da mutação no gene *TP53* e sendo duas destas com o diagnóstico clínico de SLF e três com LFL (IARC *TP53* Database R10). Outra correlação foi estabelecida, descrevendo uma maior predisposição ao desenvolvimento do fenótipo da síndrome de câncer de mama e câncer colorretal hereditário em portadores da alteração *CHEK2\*1100delC* (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2003).

Atualmente se acredita que mutações no gene *CHK2* estejam envolvidas no aumento da susceptibilidade para o câncer de mama sugerindo que este gene possa exercer ação supressora de tumor (VAHTERISTO et al. 2002; INGVARSSON et al. 2002; SODHA et al. 2002; VARLEY et al. 2003b).

## **1.8 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO**

Várias tentativas foram feitas no intuito de correlacionar mutações germinativas no gene *TP53* à maior incidência de tumores em algum órgão alvo ou célula alvo. Em estudo realizado por HORIO et al. (1994) foi verificada maior incidência de tumores gástricos em uma família japonesa portadora de uma mutação germinativa no códon 213 do gene *TP53*. LEHMAN et al. (2000) verificaram a

presença do polimorfismo 13964 no gene *TP53* em três mulheres com câncer de mama e história familiar de câncer de mama, dentre 42 avaliadas, levantando a possibilidade desta alteração ser uma mutação de baixa penetrância.

Em 2001, RIBEIRO et al. avaliaram a presença da mutação no gene *TP53* em 36 crianças com tumores adrenocorticais, provenientes da região da periferia de Curitiba, no Brasil. Dentre as 36 crianças avaliadas, 35 apresentavam a mesma mutação germinativa específica no domínio de oligomerização da p53, no éxon 10, com a troca de uma arginina por uma histidina (R337H – CGC para CAC no codon 337). Esta mutação só havia sido descrita anteriormente em uma família com SLF na Inglaterra (IARC *TP53* Database R10). Os autores relataram não haver história familiar documentada de outros tumores e referiram não haver a existência de efeito fundador, a partir do qual um ancestral comum a todas essas crianças haveria levado a preservação da alteração nas gerações seguintes. A partir destes resultados, os autores propuseram que esta mutação era tumor-específica, ou seja, indivíduos portadores apresentariam um risco aumentado para o desenvolvimento apenas um tipo de tumor – o carcinoma adrenocortical.

Para confirmar esta hipótese, RIBEIRO et al. (2001) conduziram estudos funcionais e estruturais, identificando que a mutação R337H no gene *TP53* apresentava um defeito pH-dependente na região de oligomerização, tornando o gene inativo apenas em condições de aumento de pH intracelular. Segundo estes autores, a troca da arginina 337 por uma histidina alteraria a capacidade de formação das pontes de hidrogênio entre dois monômeros de p53, logo impedindo que a dimerização ocorresse e que a forma ativa da p53 pudesse se formar. Quando a célula tem um pH 7,0, a histidina está protonada, o que permite a formação das pontes de

hidrogênio, enquanto que em pH 8,0 a histidina se torna desprotonada, prevenindo a formação deste tipo de ligação química. Com isso, a oligomerização da p53 não pode ocorrer, levando à inativação da sua capacidade de se ligar nas regiões regulatórias dos genes. Assim, especulou-se que a R337H seria uma mutação que predispõe apenas ao desenvolvimento de câncer em tecidos que apresentariam um aumento do pH intracelular. Esse aumento ocorre em células apoptóticas e pode estar envolvido no extenso processo de remodelamento que ocorre na glândula adrenocortical nos períodos de desenvolvimento pré e pós-natal.

## **1.9 ACONSELHAMENTO GENÉTICO E RASTREAMENTO**

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

Pelo menos 10% dos casos de câncer em tratamento hoje têm origem hereditária. Famílias que apresentam múltiplos casos de câncer, ou a presença de tumores em idades atípicas devem ser avaliadas. A possibilidade de identificar familiares de elevado risco para o desenvolvimento de câncer torna possível o emprego de uma abordagem preventiva e de detecção precoce do câncer. Os indivíduos considerados de alto risco devem ser encaminhados para o aconselhamento genético onde receberão todas as informações sobre a doença

diagnosticada, informações sobre a herança e suporte para o rastreamento precoce (ROCHA et al. 2001).

A SLF é uma síndrome de difícil acompanhamento por apresentar um espectro tumoral amplo e diversificado (VARLEY et al. 1997a). Até o momento, existem poucas estratégias de rastreamento reconhecidamente eficazes. O rastreamento de lesões em mama a partir de idade jovem apresentou-se como única estratégia efetiva no acompanhamento destes pacientes (*National Comprehensive Cancer Network-NCCN* 2005). (Quadro 3). Foi sugerido por THULL e VOGEL (2004) que mulheres portadoras da mutação no gene *TP53* deveriam considerar a possibilidade da realização da mastectomia profilática bilateral para redução do risco de desenvolvimento de câncer de mama.

Uma vez iniciado o acompanhamento aos pacientes com diagnóstico da SLF e LFL, estes devem ser bem informados quanto à dificuldade do rastreamento. Deve ser ressaltada a importância do acompanhamento clínico freqüente e especializado. Os pacientes devem ter conhecimento do amplo espectro tumoral da síndrome, assim como a sua expressão variável, e saber como detectar possíveis sintomas relacionados a tumores, tais como emagrecimento repentino, hiperemias e pruridos na região da mama ou sangramentos em mucosa gengival. O rastreamento baseado nos tumores mais freqüentemente apresentados pelas famílias deve ser implementado, ou seja, em famílias com alto índice de câncer colorretal, o exame de colonoscopia deve ser realizado em todos os indivíduos em risco, e lesões suspeitas devem ser acompanhadas por um proctologista. Pacientes portadores da síndrome que sobreviveram à primeira neoplasia devem intensificar o rastreamento devido ao alto risco de desenvolvimento de novas lesões primárias. (HISADA 1998)

**Quadro 3** - Protocolo de rastreamento na SLF e LFL - NCCN.

<b>Rastreamento</b>	<b>Anual</b>	<b>Semestral</b>	<b>Mensal</b>
<b>Adultos em risco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico - foco na detecção de tumores raros e novos tumores primários</li> <li>• Mamografia anual a partir de 20-25 anos (M)</li> <li>• Acompanhamento direcionado aos tumores ocorridos nas famílias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico das mamas a partir dos 20-25 anos ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama em parente mais jovem (M)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auto-exame da mama a partir dos 18 anos (M)</li> </ul>
<b>Crianças em risco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico com foco na detecção de tumores raros</li> <li>• Hemograma completo</li> </ul>		
<b>Outras possibilidades de manejo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclarecer famílias sobre limitações no rastreamento de tumores relacionados à síndrome</li> <li>• Informar sobre mastectomia profilática bilateral (individualizar a cada família)</li> <li>• Informar pediatras sobre risco de tumores infantis</li> <li>• Educação ao paciente e aos médicos sobre possíveis sinais e sintomas de câncer</li> </ul>		

**Legenda:** (M)- exame realizado em mulheres

O acompanhamento de crianças que são possíveis portadoras é controverso devido ao fato de não existir nenhum exame específico que venha reduzir a incidência ou mesmo levar ao diagnóstico precoce dos tumores relacionados à SLF e LFL na infância. Os pediatras que acompanham crianças que são possíveis portadores da síndrome devem ser informados sobre o diagnóstico e risco, e o acompanhamento clínico deve ser frequente (*National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2005*).

Os pacientes devem ser esclarecidos sobre a possibilidade de realização do diagnóstico molecular da SLF e LFL. O teste genético deve ser oferecido como confirmação do diagnóstico clínico, porém o paciente deve estar bem informado que o resultado obtido no teste não irá mudar a conduta nem o diagnóstico clínico da síndrome. Caso haja a detecção da mutação, esta poderá ser rastreada em seus familiares possibilitando a identificação de indivíduos assintomáticos. No entanto, caso a mutação não seja detectada pelos métodos utilizados, o paciente deve estar ciente de que outros fatores não identificados podem ocasionar a síndrome e que, mesmo sem o diagnóstico molecular, a família deverá continuar o rastreamento clínico (HEMMINKI e ENG 2004).

Caso o paciente opte pela realização do teste genético, este deve ser realizado mediante aconselhamento genético continuado. O aconselhamento genético pré-teste fornecerá informações sobre a doença, esclarecendo os riscos e o benefício do teste. Este deverá ser individualizado e não direcionado, de modo que o geneticista não interferirá nas decisões do paciente. O paciente deve estar ciente que o teste genético e a identidade do indivíduo são confidenciais, impedindo assim quaisquer dificuldades relacionadas à discriminação e proporcionando uma relação de confiança entre o paciente e o médico geneticista. O consentimento informado contendo informações detalhadas sobre a síndrome e o teste a ser realizado deve ser assinado pelo indivíduo candidato ao teste ou pelo seu responsável legal. Após a realização do teste, o aconselhamento pós-teste fornecerá ao paciente as informações sobre o risco, as opções terapêuticas e preventivas e o acompanhamento clínico multidisciplinar adequado. O resultado é divulgado ao paciente que é orientado

quanto à importância de convocar seus familiares em risco para o aconselhamento genético (ROCHA et al. 2001).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho é avaliar o papel de mutações no gene *TP53* na etiologia da Síndrome de Li-Fraumeni e, de sua variante Li-Fraumeni *Like* em pacientes da população brasileira.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Caracterizar as mutações germinativas no gene *TP53* em famílias brasileiras com diagnóstico clínico das Síndromes de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *Like*;
- 2- Correlacionar a presença e a localização da mutação germinativa no gene *TP53* com o fenótipo apresentado pelo paciente e os familiares portadores das Síndromes de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni *Like*;
- 3- Correlacionar os genótipos e fenótipos encontrados com os dados de outras famílias depositados no banco de dados de mutações em *TP53* do IARC.

### **3 PACIENTES E MÉTODOS**

#### **3.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES**

Inicialmente, foram revisados 1.485 prontuários de pacientes atendidos no Departamento de Oncogenética do Hospital do Câncer – A.C. Camargo, São Paulo, no período de dezembro de 1999 a agosto de 2004. Os pacientes foram encaminhados a este serviço por apresentarem agrupamento familiar de tumores e síndromes genéticas ligadas ao câncer. Dentre as famílias avaliadas, 32 foram selecionadas de acordo com os critérios clássicos (LI et al. 1988), recebendo o diagnóstico clínico de SLF e com os critérios variantes, de BIRCH et al. (1994) e de EELES (1995), recebendo o diagnóstico clínico de LFL. Pacientes que fossem portadores de tumores que por si próprios preenchessem um dos critérios da síndrome também foram incluídos. Dez pacientes provenientes do Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas, Porto Alegre, e que preenchiam os critérios da SLF e LFL foram adicionados a este grupo. Três famílias provenientes da Divisão de Genética Médica – INCA, Rio de Janeiro diagnosticadas como portadoras de SLF ou LFL também foram incluídas, totalizando 45 famílias.

Os prontuários das famílias com diagnóstico clínico de SLF e LFL foram revisados visando à obtenção das informações sobre os tumores familiares. A partir de entrevista com cada paciente foi possível detalhar as informações obtidas. Foram solicitados aos pacientes comprovantes dos tumores ocorridos em seus familiares de primeiro, segundo e terceiro grau. Foram aceitos como comprovantes relatórios de

anatomia-patológica ou relatório médico. Dados relacionados à idade de acometimento do tumor, ao tipo de tumor e ao gênero do familiar foram incluídos na ficha clínica do paciente sempre que estivessem disponíveis (Anexo 4). As outras instituições que também incluíram pacientes neste estudo (Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas, Porto Alegre e Divisão de Genética Médica – INCA, Rio de Janeiro) forneceram as informações clínicas sobre os pacientes assim como sobre suas famílias. Os heredogramas foram confeccionados na ficha clínica de cada paciente na fase inicial do estudo visando compor um painel clínico dos tumores apresentados pelas famílias. Após a atualização dos dados referentes aos tumores apresentados nas famílias, novos heredogramas foram elaborados a partir do programa Cyrillic 2 for pedigree drawing (Cherwell Scientific).

As famílias receberam aconselhamento pré-teste, no qual foram elucidados os aspectos clínicos da doença e os potenciais benefícios do teste genético, assim como suas limitações. O teste preditivo não foi oferecido para menores de 18 anos. Todos os pacientes assinaram o termo de consentimento pós-informado antes de ser realizada a coleta de sangue para a realização do teste genético (Anexo 5). O acompanhamento clínico para rastreamento de tumores foi oferecido a todos os familiares e o teste genético foi oferecido apenas aos familiares que tinham a mutação no paciente índice da família detectada.

Amostras de DNA genômico de 53 voluntários saudáveis provenientes do Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas - Porto Alegre foram analisadas buscando avaliar a presença das alterações encontradas na população deste estudo e pouco descritas na literatura existente.

Este estudo, assim como o consentimento informado a ele relacionado, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente na reunião realizada no dia 30.09.2003, sob o número 531/03 (Anexo 6).

### **3.2 EXTRAÇÃO DE DNA**

Amostras de 20mL de sangue periférico dos pacientes foram coletadas de maneira convencional em tubos contendo EDTA e estocadas a 4°C. A separação dos linfócitos ocorreu em um período inferior a cinco dias após a data da coleta e foi realizada conforme o método descrito por ENGLISH e ANDERSEN (1974). O precipitado linfocitário (*pellet*) foi obtido a partir das amostras de sangue através de centrifugação a 1.500rpm por 15 minutos, sendo o plasma sobrenadante transferido para tubos de 1,5mL e estocado a -70°C. O sangue restante foi homogeneizado e transferido para tubos Falcon de 50mL, aos quais foram adicionados 15mL (aproximadamente o mesmo volume do sangue homogeneizado) de solução PBS 1X pH 7,4 (123mM de NaCl; 2,7mM de KCl; 4,3mM de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,4mM de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Em seguida, foram adicionados 15mL de solução de Ficoll-Hypaque (*Amersham Biosciences*). Após centrifugação a 1.200rpm por 30 minutos a 24°C, o halo linfocitário foi aspirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur e transferido para um tubo Falcon de 15mL. Foi realizada lavagem com 10mL de PBS 1X seguida de centrifugação por 15 minutos a 2.000rpm e descarte do sobrenadante. O *pellet* de linfócitos foi ressuspendido em 1,5mL ml de PBS 1X e transferido para tubo 1,5mL. Repetiu-se então o processo de lavagem das células com PBS 1X. Após

centrifugação por 4 minutos a 13.000rpm e aspiração do sobrenadante, os *pellets* de linfócitos foram estocados a-70°C.

A extração de DNA foi feita com a utilização do *Wizard Genomic DNA Purification Kit* (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e o DNA assim obtido foi quantificado em espectrofotômetro *GeneQuant Pro* (*Amersham-Pharmacia Biotech*) e estocado a-20°C. No caso das amostras provenientes de outros estados do Brasil, o DNA foi extraído no centro de origem e enviado através de empresas privadas de transporte. As amostras levaram um período máximo de sete dias entre o envio e o seu recebimento e quando recebidas foram estocadas a-20°C.

### **3.3 IDENTIFICAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO GENE *TP53***

As etapas de identificação das mutações e comparação com o banco de dados de mutações em *TP53* foram realizadas pela pesquisadora na Unidade de Carcinogênese Molecular, Agência Internacional para a Pesquisa do Câncer - *International Agency for Research on Cancer* (IARC - WHO), Lyon, França, sob a orientação do Dr. Pierre Hainaut, diretor do laboratório.

As amostras de DNA foram amplificadas por PCR e os éxons codificantes 2 a 11 do gene *TP53* foram analisados. Os éxons foram amplificados a partir da utilização de primers intrônicos específicos (Quadro 4), a partir de 100ng de DNA genômico, na presença da enzima *Taq Platinum DNA polymerase* (Invitrogen). As condições da reação de PCR foram: 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM de dNTPs; 1,2µM de cada primer; 1,25U de *Taq Platinum DNA polymerase* (Invitrogen); 2,5µL de tampão

de reação para *Taq Platinum 10X* (concentração final 1X) e água em quantidade suficiente para 25µL.

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

**Quadro 4** - Seqüência de primers utilizados nas reações de PCR para DHPLC e seqüenciamento.

	Primer direto	Primer reverso	Fragmento (pb)
Éxons 2-3	p558: 5'-ccaggtgacccagggttga-3'	p228: 5'-agcatcaaatcatcattgc-3'	428
Éxon 4	p326: 5'-tgaggacctgtcctctgac-3'	p327: 5'-agaggaatcccaagtcca-3'	412
Éxon 5-6	P236: 5'-tggtcactgtgcctgact-3'	p256: 5'-cggaggccactgacaacca-3'	488
Éxon 7	p333: 5'-cttgccacaggtctcccaa-3'	p313: 5'-aggggtcagcggcaagcaga-3'	237
Éxon 8-9	p314: 5'-ttggagtagatggagcct-3'	p315: 5'-acttgataagaggtccaag-3'	372
Éxon 10	p10li: 5'-caattgtaactgaaccatc-3'	p563: 5'-cttccaacctaggaaggca-3'	191
Éxon 11	p564: 5'-atctctcctcctgctctg-3'	pE11Ri: 5'-aggctgtcagtgggaacaa-3'	145

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

por ATEENYI-AGABA et al. (2004). Em cada análise de DHPLC foi usado como controle o DNA de linhagens celulares tumorais (controles positivos da presença de alterações) (Quadro 5) e o DNA de linfócitos de indivíduos sem câncer (controles negativos).

Os fragmentos que apresentaram suspeita de alteração na análise por DHPLC foram reamplificados e submetidos à nova reação de PCR e analisados por seqüenciamento automático em ambas as direções, direta e reversa. A reação de amplificação para o seqüenciamento foi realizada utilizando-se 5pmol de primer direto ou reverso para cada éxon e o kit *BigDye 1.1 (Applied Biosystems)* conforme especificações do fabricante. O kit utilizado baseia-se no uso da metodologia do seqüenciamento com dideoxynucleotídeos marcados com fluorescência, acoplado a PCR com apenas um primer. O produto desta reação foi analisado no aparelho de seqüenciamento automático *ABI Prism 3100 (Applied Biosystems)*.

**Quadro 5** - Descrição de linhagens celulares com diferentes mutações no gene TP53 usadas como controles positivos no DHPLC.

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

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

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

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

Todos os pacientes foram convocados para divulgação do resultado do teste genético, mediante o aconselhamento genético pós-teste. Os pacientes nos quais foi encontrada a mutação no gene *TP53* foram estimulados a contactar seus familiares considerados em risco para que estes pudessem ser também submetidos ao rastreamento para a detecção da mutação. Todos os familiares que se mostraram interessados foram submetidos ao teste genético, após a realização do aconselhamento genético e a assinatura do consentimento informado. O teste genético para detecção de mutações nos familiares foi realizado no Laboratório de Genética do Câncer do Instituto Ludwig, São Paulo, sob orientação do Dr. André Luiz Vettore.

### **3.4 ANÁLISE DE ALTERAÇÕES DETECTADAS POR PCR-RFLP**

A técnica de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism* reação), ou reação com cadeia da polimerase associado à análise do polimorfismo de tamanho dos fragmentos de DNA obtidos por enzimas de restrição, foi empregada na avaliação da frequência da alteração R337H no éxon 10 do gene *TP53* em 53 voluntários saudáveis. Um fragmento de 238 pb contendo o códon 337 foi amplificado a partir de DNA genômico com primers específicos para a região (Quadro 4 – éxon 10) e digerido com a enzima de restrição HhaI. (*Amersham Biosciences*). A 5 $\mu$ L do DNA amplificado, foi adicionado 1 $\mu$ L da enzima HhaI (20.000U/mL) (*New England Biolabs*), 2 $\mu$ L de tampão de reação 10X, 2 $\mu$ L BSA 10X e água para o volume final de reação de 20 $\mu$ L. A reação foi incubada a 37°C por 4 horas. O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose 3% contendo 20 $\mu$ L de brometo de etídio (1mg/mL), submetido a eletroforese (120 volts, por 30 minutos aproximadamente) e visualizado sob luz UV.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DAS FAMÍLIAS SLF E LFL AVALIADAS

Foram incluídas neste estudo 45 famílias brasileiras sem parentesco e residentes há pelo menos três gerações no país. Todas as famílias preenchiam critérios clínicos para a definição da SLF ou pelo menos um dos outros critérios correspondentes à LFL descritas por BIRCH et al. (1994) e por EELES (1995). Dentre as 45 famílias avaliadas, 11 (24,4%) apresentavam os critérios diagnósticos clássicos da SLF e 34 (75,6%) apresentaram critérios diagnósticos da LFL. Das 34 famílias LFL, 14 preenchiam os critérios de LFL-Birch e 20 preenchiam somente os critérios de LFL-Eeles, dentre as quais apenas um indivíduo isolado com múltiplos tumores preenchendo critérios (Tabela 1).

A maioria dos indivíduos portadores de tumores incluídos neste estudo era do sexo feminino, sendo que 66,7% dos probandos (n=30) e 56,7% dos familiares (n=140) eram mulheres. Todos os probandos referiram ser filhos de pais brancos ou pardos e quando questionados sobre a qual raça pertenciam, optaram pela branca. A maior parte das famílias avaliadas era proveniente das regiões sudeste (n=31, 68,9%) e sul (n=11, 24,4%) do país. Dentre as famílias avaliadas, duas (Y14 e Y15) relataram consangüinidade (4,5%), sendo que nas duas famílias os pais eram primos irmãos.

**Tabela 1** - Perfil clínico das famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SLF e LFL.

	Probandos	Familiares
Pacientes (n=292)	45 (100%)	247 (100%)
Diagnóstico		
SLF	11 (24,4%)	52 (21,1%)
LFL	34 (75,6%)	195 (78,9%)
Gênero		
Mulheres	30 (66,7%)	140 (56,7%)
Homens	15 (33,3%)	107 (43,3%)
Raça		
Branca	45 (100%)	N/D
Outras	0	N/D
Consangüinidade	2 (4,5%)	N/D
Gerações acometidas		
4	9 (20%)	N/A
3	19 (42,2%)	N/A
2	15 (33,3%)	N/A
1	2 (4,5%)	N/A
Origem geográfica		
Sudeste	31 (68,9%)	N/A
Sul	11 (24,4%)	N/A
Nordeste	1 (2,2%)	N/A
Tumores (n=338)	89 (100%)	249 (100%)
Mulheres	49 (55,1%)	142 (57,0%)
Homens	40 (44,9%)	107 (43,0%)

**Legenda:** N/D: não disponível; N/A: não aplicável.

O total de 338 tumores foi referido em 292 indivíduos pertencentes às famílias estudadas. Dentre estes tumores, 46,1% foram confirmados a partir de laudos histopatológicos, relatórios médicos ou atestados de óbito. Os tumores ocorreram predominantemente em mulheres, sendo um total de 191 tumores malignos no sexo feminino (56,5%) (Tabela 1). Dentre as famílias avaliadas, nove relataram tumores acometendo quatro gerações, 19 relatavam o acometimento de três

gerações, 15 relatavam o acometimento de duas gerações e duas famílias tiveram apenas uma geração acometida. O número de familiares acometidos por neoplasias malignas variou de um a 18 membros por família. Uma das famílias avaliadas tinha apenas um membro afetado, sendo que este paciente havia desenvolvido múltiplos tumores do espectro da síndrome e por si próprio preenchia os critérios LFL-E1.

Dentre os 338 tumores relatados, 99,7% eram tumores malignos (n=337). Apenas um tumor benigno foi incluído, sendo este um caso de mola hidatiforme que apresentava um laudo histopatológico com áreas suspeitas de malignização, ocorrido em um dos probandos (Y1). O total de 338 tumores presentes nas 45 famílias foi subdividido em 24 grupos, de acordo com o tipo e/ou sistema acometido para melhor compreensão do espectro tumoral apresentado, seguindo o agrupamento utilizado pelo banco de dados do IARC (IARC *TP53* Database R10). Os tumores referidos pelos familiares como originários de sítio inespecífico, por não terem indicações precisas da origem ou por terem sido denominados como tumores generalizados, foram classificados em um grupo suplementar de origem indeterminada (Tabela 2).

O tumor mais freqüente nas famílias incluídas neste estudo foi o tumor de mama (21,3%), acometendo principalmente mulheres em idade jovem, antes dos 45 anos (idade pré-menopausal) (n=44, 61,1 %). Apenas um caso de câncer de mama foi relatado em um paciente do sexo masculino aos 75 anos (Y20). Verificou-se alta incidência de sarcomas de partes moles (n=37, 10,9%), segundo tumor mais freqüente nas famílias estudadas, ocorridos predominantemente antes dos 45 anos (n=28, 75,6%). O terceiro grupo de tumores mais freqüentes foi o de tumores de estômago (n=30, 8,9%), acometendo principalmente adultos acima dos 46 anos. A maior parte dos tumores de sistema nervoso central, quarto tumor mais freqüente,

ocorreram na infância, antes dos 15 anos de idade (n=9, 36,4%), sendo verificado um segundo pico de incidência no adulto, entre os 31 e 45 anos (n=6, 23,1%). Foram verificados oito casos de tumores de adrenocortical nas famílias brasileiras, sendo que cinco destes tumores foram diagnosticados predominantemente em idade jovem, antes dos 15 anos de idade (n=5, 62,5%).

**Tabela 2** - Perfil tumoral de pacientes com diagnóstico clínico da SLF e LFL.

Tumores	n	0-15 anos	16-30 anos	31-45 anos	Acima de 46 anos	Idade indeterminada
Total	338 (100%)	31 (9,1%)	49 (14,5%)	81 (23,9%)	125(37,0%)	52 (15,4%)
Mama	72 (21,3%)	0	13 (18,0%)	31 (43,1%)	24 (33,3%)	4 (5,5%)
Sarcoma de partes moles	37 (10,9%)	8 (21,6%)	8 (21,6%)	12 (32,4%)	8 (21,6%)	1 (2,7%)
Estômago	30 (8,9%)	0	2 (6,7%)	4 (13,4%)	18 (60%)	6 (11,5%)
Sistema nervoso central	26 (7,7%)	9 (34,6%)	4 (13,3%)	6 (23,1%)	3 (11,6%)	4 (7,7%)
Colorretal	21 (6,2%)	0	5 (23,8%)	5 (23,8%)	8 (25,8%)	3 (5,8%)
Leucemia/ Linfoma	21 (6,2%)	4 (19,0%)	5 (23,8%)	3 (14,3)	5 (23,8%)	4 (7,7%)
Pulmão	15 (4,4%)	0	2 (13,3%)	2 (13,3%)	9 (60,0%)	2 (3,8%)
Próstata	12 (3,5%)	0	0	1 (8,3%)	8 (6,7%)	3 (5,8%)
Trato genital feminino	11 (3,2%)	0	0	3 (27,3%)	6 (54,5%)	2 (3,8%)
Pele não melanoma	10 (2,9%)	0	0	4 (40,0%)	4 (40,0%)	2 (3,8%)
Esôfago	9 (2,7%)	0	0	0	6 (66,7%)	3 (5,8%)
Sarcoma ósseo	9 (2,7%)	0	4 (44,4%)	2 (22,2%)	1 (11,1%)	2 (3,8%)
Cabeça e pescoço	9 (2,7%)	0	1(11,1%)	1(11,1%)	5 (55,5%)	2 (3,8%)
Adrenocortical	8 (2,4%)	5 (62,5%)	2 (25,0%)	1 (12,5%)	0	0
Melanoma	7 (2,1%)	1 (14,3%)	0	2 (28,6%)	4 (57,1%)	0
Fígado	7 (2,1%)	0	1(14,3%)	1(14,3%)	3 (42,9%)	2 (3,8%)
Pâncreas	6 (1,8%)	0	0	2 (33,3%)	3 (50,0%)	1 (1,9%)
Tireóide	6 (1,8%)	0	1 (16,7%)	0	5 (83,3%)	0
Renal	4 (1,2%)	2 (50,0%)	0	0	2 (50,0%)	0
Bexiga	3 (0,9%)	0	0	0	2 (66,6%)	11 (1,9%)
Papila duodenal	2 (0,6%)	0	0	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0
Wilms´	1(0,3%)	1 (100%)	0	0	0	0
Ósseo	1 (0,3%)	1 (100%)	0	0	0	0
Mola Hidatiforme	1 (0,3%)	0	1 (100%)	0	0	0
Indeterminado	10 (2,9%)	N/A	N/A	N/A	N/A	10 (19,2%)

**Legenda:** N/A: não aplicável.

A ocorrência de múltiplos tumores primários também foi verificada em algumas famílias. A incidência de dois tumores primários em um único paciente foi

verificada em 15 indivíduos (6,1%). Três tumores primários ocorreram em cinco indivíduos (2,0%) com a SLF ou LFL, quatro indivíduos apresentaram quatro tumores primários (1,6%), um indivíduo apresentou cinco tumores primários (0,4%) e foi verificada ainda a ocorrência de um indivíduo que apresentou oito tumores primários (0,4%). A associação entre tumores mais frequentes foi a de tumores de mama e sarcomas de partes moles, ocorrida em quatro indivíduos do sexo feminino, pertencentes a famílias distintas.

Todos os probandos foram submetidos a um exame físico buscando avaliar a existência de possíveis alterações dismorfológicas. Dismorfias foram detectadas apenas na probanda Y15, filha de um casal consanguíneo (primos irmãos). A paciente apresentou sinais de maturação sexual precoce, sendo verificada pilificação pubiana e axilar aos 20 meses. Aos seis anos, um tumor adrenocortical esquerdo foi diagnosticado e tratado. Aos sete anos foi diagnosticado um carcinoma de córtex renal esquerdo e tratado. Aos oito anos a paciente apresentou a menarca. Ao exame físico realizado após a avaliação clínica deste estudo, quando a probanda apresentava 21 anos, foram detectadas algumas importantes dismorfias. Além das alterações esperadas relacionadas ao quadro endocrinológico que envolve o tumor adrenocortical, tais como baixa estatura, fascies Cushingóide e hirsutismo, outras dismorfias que puderam ser verificadas foram: macrocefalia, ponte nasal deprimida e braquidactilia com a presença de hipoplasia de quarto e quinto metacarpos (mão esquerda) e de quinto metacarpo (mão direita). Nenhum outro membro da família foi avaliado para a presença de dismorfias.

Todos os pacientes e suas famílias foram questionados quanto à exposição ambiental a pesticidas, venenos ou radiação. Cinco famílias (Y1, Y6, Y12, Y15 e

Y31) referiram exposição prévia a pesticidas, sem proteção física, em um período que variou de oito a 30 anos. Os probandos não souberam referir a dose empregada a cada aplicação e nem quantas vezes se submeteram à exposição direta, porém todos referiram ao menos uma vez a cada ano. Apenas dois probandos (Y12 e Y31) souberam definir qual pesticidas utilizados, referindo o uso em quantidade grande, porém indeterminada, de Aldrin®, um composto organo-clorado e de fosfanil-metabisulfito, um composto organo-fosforado.

Uma das famílias (Y38) referiu exposição intensa a Diazinon (Neocid®), sendo o produto aplicado semanalmente no colchão e roupa de cama de cada indivíduo, durante aproximadamente os 12 anos iniciais de vida de três irmãos que apresentaram tumores típicos da síndrome em idade jovem. A família Y27 refere ter vivido a menos de 300 metros de uma usina de energia nuclear por 20 anos.

Os probandos foram questionados quanto a tabagismo, atual ou pregresso. Dentre os 45 pacientes, 22 (48,9%) referiram exposição prévia a tabaco, em um período que variou de seis meses a 35 anos, com um consumo diário de cinco a 40 cigarros ao dia, porém apenas quatro (8,9%) mantinham o hábito tabagista na última avaliação realizada.

## **4.2 DETECÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM O DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SLF E LFL**

Mutações germinativas no gene *TP53* foram encontradas em 13 (28,9%) das 45 famílias avaliadas (Tabela 3). Todas estas mutações eram transições de G para A, sendo que 12 (91,7%) eram do tipo *missense* e em uma família foi verificada a

presença de uma alteração no sítio doador de *splicing* do íntron 6. Dentre as 12 mutações *missense* encontradas em famílias SLF e LFL, seis ocorreram no segundo par de bases do códon 337, especificando uma substituição de uma arginina por uma histidina (R337H), na região de oligomerização da proteína p53. A ocorrência de uma mutação específica, R337H, foi detectada em taxas elevadas nas famílias brasileiras com LFL, representando 46% (6/13) de todas as mutações detectadas e 5,1% de todas as mutações já descritas em famílias LFL.

**Tabela 3** - Perfil de mutações das famílias brasileiras com mutações no gene *TP53*.

	SLF/LFL Brasil			SLF/LFL - IARC	
	N	SLF	LFL	SLF	LFL
<b>Famílias</b>	45			148	118
Diagnóstico clínico	45 (100%)	11 (24,4%)	34 (75,6%)	N/D	N/D
Gene <i>TP53</i> mutado	13 (28,9%)	1/11 (9,1%)	12/34 (35,3%)	148	118
<b>Mutações</b>	13			268*	
Missense	12 (92,3%)	1 (8,3%)	11(91,7%)	111 (41,4%)	94 (35,1%)
Sítio de <i>splicing</i>	1(7,8%)	0	1 (100%)	5 (1,9%)	0
Outras	0	0	0	FS:16; S:8; O:7; S:1	FS:9; NS:13; O:2; S:2
<b>Mutações (Bases trocadas)</b>					
V173M ( <u>G</u> TG > <u>A</u> TG)	1 (7,7%)	0	1	0	0
V197M ( <u>G</u> TG > <u>A</u> TG)	1(7,7%)	1	0	0	1
R213Q ( <u>C</u> GA > <u>C</u> AA)	1(7,7%)	0	1	4	4
G244D ( <u>G</u> GC > <u>G</u> AC)	1(7,7%)	0	1	0	0
G245S ( <u>G</u> GC > <u>A</u> GC)	2 (15,4%)	0	2	7	4
R337H( <u>C</u> GC > <u>C</u> AC)	6 (46,1%)	0	6	0	1
Íntron 6 (sítio de <i>splicing</i> )	1(7,7%)	0	1	0	0

**Legenda:** N/D: dado não disponível, NS: *Nonsense* (sem sentido), FS: *Frameshift* (alteração na janela de leitura), S: Silenciosa, O: Outras. \* Dados disponíveis para famílias com diagnóstico de SLF e LFL incluídas no banco de dados, excluindo mutações germinativas detectadas em tumores esporádicos (n= 15).

A mutação no códon 245 (G245S), que leva a substituição de uma glicina por uma serina, foi detectada em duas famílias distintas e não relacionadas. Esta é uma mutação somática e germinativa comum, sendo que sete famílias já foram descritas como portadoras desta mutação germinativa (IARC *TP53* Database R10). Quatro outras famílias avaliadas apresentaram mutações distintas: no códon 173 (V173M), causando a substituição de uma valina por uma metionina, nunca descrita; no códon 197 (V197M), causando a substituição de uma valina por uma metionina, também nunca descrita; no códon 213 (R213Q), causando a substituição de uma arginina por uma glutamina, descrita em uma família com a SLF proveniente do Reino Unido e rara em tumores esporádicos e no códon 244 (G244D), causando a substituição de uma glicina por uma molécula de ácido aspártico, não descrita anteriormente. Estas quatro mutações ocorreram no domínio de ligação ao DNA.

As mutações *missense* são as mais frequentes tanto no banco de dados do IARC (76,5%) como neste estudo (92,3%), porém sete das 13 mutações (53,8%) estão localizadas no domínio de ligação ao DNA, região onde 95% das mutações descritas pelo banco de dados estão localizadas. As mutações em sítio de splicing representaram 7,8% das mutações detectadas neste estudo, enquanto que foram detectadas em 1,9% das famílias com SLF e LFL do banco de dados do IARC.

Nota-se a ocorrência neste estudo das mutações V173M, V197M e G244D que até o presente não foram descritas no banco de dados do IARC. Amostras de DNA genômico de 53 voluntários saudáveis provenientes do Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas - Porto Alegre foram submetidas ao rastreamento por DHPLC para se avaliar a frequência das alterações V173M, V197M e G244D na população brasileira. Este grupo controle foi escolhido por esta amostra ser

considerada semelhante à composta pelas famílias incluídas neste estudo, que eram provenientes principalmente das regiões sul e sudeste, e por estar disponível para ser implicado em pesquisas científicas. Nenhum caso dentre os controles apresentou o perfil sugestivo das alterações V173M, V197M e G244D. Frente ao fato de ensaios de transativação em levedura demonstrarem que estas alterações proporcionam a perda de função da p53 (KATO et al. 2003), as alterações G244D, V173M e V197M foram consideradas mutações novas.

A detecção das mutações no gene *TP53* ocorreu predominantemente em famílias com o diagnóstico clínico de LFL. Foi detectada a presença de mutações no gene *TP53* em 12 das 34 famílias (35,3%) com critérios clínicos para LFL. As famílias LFL que preenchiam os critérios de Birch (LFL-B) apresentaram a maior taxa de detecção de mutações (41,8%) dentre a amostra avaliada. Aquelas que preenchiam apenas os critérios de Eeles apresentaram uma taxa de detecção de mutação de 31,8%. Das onze famílias que apresentavam os critérios clínicos para a SLF clássica, apenas uma (9%) teve a presença de mutação no gene *TP53* detectada. No banco de dados do IARC verifica-se uma maioria de famílias com diagnóstico clínico de SLF com a detecção de mutação (n=148) se comparado às famílias incluídas com LFL e detecção da mutação (n=118).

#### **4.3 PERFIL TUMORAL EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS COM MUTAÇÕES GERMINATIVAS E DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SLF E LFL**

O espectro tumoral apresentado pelas famílias deste estudo com detecção da mutação foi bastante amplo, incluindo a maior parte dos tumores relacionados às SLF e LFL (Tabela 4). Foram relatados 119 tumores ocorridos nas 13 famílias que tiveram a mutação no gene *TP53* detectada, sendo possível a obtenção de confirmações histopatológicas ou relatórios médicos de 64 tumores (53,8%).

O tumor que ocorreu em um maior número de famílias com a detecção da mutação foi o tumor de mama, acometendo mulheres em 12 das 13 famílias afetadas, não sendo detectado na família Y15 (Tabela 4). Em uma das famílias com mutação detectada (Y12), verificaram-se dois casos de tumores de tireóide. Dois outros probandos (Y1 e Y58) apresentaram carcinoma de papila duodenal, tumor nunca antes descrito como parte do espectro da síndrome.

Os casos de carcinoma de papila duodenal ocorreram em duas famílias não relacionadas entre si com o diagnóstico clínico de LFL. Na família (Y1) a probanda também apresentou mola hidatiforme invasiva e dentre os familiares ocorreu um caso de tumor de adrenocortical aos 11 anos, um caso de tumor de sistema nervoso central aos 31 anos, um caso de câncer de mama aos 62 anos, dois casos de tumores colorretais aos 38 e 39 anos, cinco casos de tumores de pulmão, todos acima dos 45 anos de idade e um caso de tumor de estômago aos 22 anos (Tabela 4). Na família Y58 foram também descritos três casos de tumor de sistema nervoso central, sendo dois antes dos 18 anos de idade; cinco casos de tumor de mama, três deles em idade pré-menopausal (antes dos 45 anos de idade); além de um caso de tumor colorretal aos 22 anos, um caso de tumor de próstata, um caso de tumor de esôfago e um caso de sarcoma ósseo (Tabela 4).

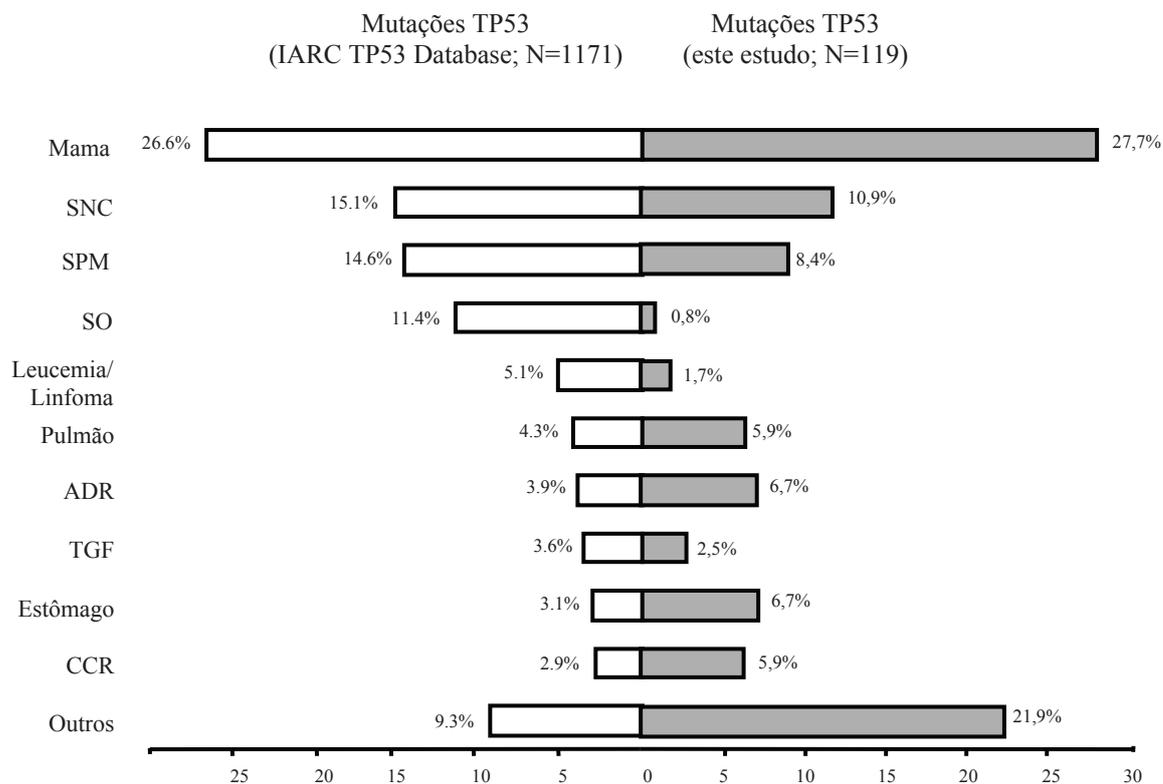
**Tabela 4** - Espectro tumoral de 13 famílias brasileiras com mutações no gene *TP53*.

Família	Éxon	Codon	Tumores em probando (Gênero-Idade de acometimento, anos) <sup>a</sup>	Tumores em familiares (Genero-Idade de acometimento, anos) <sup>a b</sup>	Classificação Clínica <sup>c</sup>
Y33	5	173	SPM ( <b>F-23*</b> ), Mama ( <b>F-43*</b> )	ADR ( <b>M-29</b> ), SNC (M-9), Mama (F-60), Fígado (M-53), Estômago (F-N/D), Leucemia (M-N/D)	SLF
Y58	Íntron 6	Sítio doador	Papila duodenal ( <b>F-60*</b> )	SNC ( <b>M-18, M-15</b> , M-N/D <sup>d</sup> ), Mama (F-55, F-35, <b>F-45, F-33, F-49</b> ), Próstata (M-57), Esôfago (M-50), SO (M-N/D), CCR ( <b>F-22</b> )	LFL-B
Y65	6	197	CCR ( <b>F-45*</b> )	ADR ( <b>F-18</b> ), Mama ( <b>F-54</b> ), CCR (F-24), C/P (M-60)	LFL-B
Y1	6	213	Mola Hidatiforme ( <b>F-23*</b> ), Papila duodenal ( <b>F-41*</b> )	ADR ( <b>F-11</b> ), SNC (M-31), Mama ( <b>F-62</b> ), CCR ( <b>M-38, M-39</b> ), Fígado (M-28), Pulmão ( <b>F-60, M-50</b> , M-45, M-50, F-52), Estômago (M-22)	LFL-B
Y57	7	244	Mama ( <b>F-40*</b> ), CCR (F-N/D*)	Ósseo ( <b>F-21</b> ), Mama ( <b>F-30</b> ), TGF (F-34), SPM (F-21), C/P (M-59)	LFL-E1
Y53	7	245	Mama ( <b>F-36*</b> )	SNC (M-9), Mama ( <b>F-33</b> ), CCR ( <b>M-18</b> ), Esôfago ( <b>M-50</b> ), Leucemia ( <b>M-45</b> ), Estômago (M-56), C/P (M-50)	LFL-E1
Y59	7	245	Mama ( <b>F-26*</b> )	SPM ( <b>F-3, F-4</b> ), Mama ( <b>F-27, F-27</b> ), SNC ( <b>M-40</b> ), Fígado ( <b>F-36</b> )	LFL-B
Y12	10	337	SPM ( <b>F-57*</b> ), Tireóide ( <b>F-58*</b> ), Mama ( <b>F-61*</b> ), Pulmão ( <b>F-62*</b> )	ADR ( <b>F-1, F-13, F-36</b> ), Mama ( <b>F-35</b> , F-35, F-40, F-45, F-52, F-60, F-60), Melanoma (F-80), Estômago (M-61, F-62), Tireóide ( <b>F-25*</b> )	LFL-B
Y15	10	337	ADR ( <b>F-7*</b> ), Renal ( <b>F-8*</b> )	ADR ( <b>F-3</b> ), SNC (M-3, M-5, <b>M-50</b> ), Renal (M-2), SPM (M-2)	LFL-B
Y27	10	337	Mama ( <b>F-36*</b> )	Mama ( <b>F-37, F-64</b> ), Estômago (M-59, M-69), SPM ( <b>F-59</b> ), N/D (F-N/D)	LFL-B
Y35	10	337	SPM ( <b>F-50*</b> ), Pele ( <b>F-58*</b> )	SNC (M-39), Mama (F-41), SPM (F-38), TGF (F-83)	LFL-E2
Y49	10	337	Renal ( <b>M-64*</b> )	Renal ( <b>F-9</b> ), Mama ( <b>F-44*</b> , <b>F-36</b> ), Pulmão (M-72), Próstata (M-72, M-N/D, M-N/D), Pâncreas (F-58), TGF (F-62), Estômago (M-60)	LFL-E1
Y60	10	337	SPM ( <b>F-44*</b> )	Mama ( <b>F-24, F-31, F-53</b> ), Esôfago (M-59), SNC ( <b>M-2</b> , M-N/D)	LFL-B

**Legenda:** (a): ADR: carcinoma adrenocortical; C/P: cabeça e pescoço; CCR: câncer colorretal; SNC: sistema nervoso central; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; TGF: Trato genital feminino; M: masculino; F: feminino. (b): Mais de um tumor pode ocorrer em um paciente; (c): Critérios diagnósticos Clássico de Birch e de Eeles da Síndrome de Li-Fraumeni; (d): N/D: dado não disponível; (negrito): tumores confirmados por laudos histopatológicos ou relatório médico; (\*): tumores em indivíduos testados positivos para a mutação em *TP53*

O perfil de tumores das famílias brasileiras com mutações no gene *TP53* comparado ao perfil de tumores em outras famílias com a mutação no gene *TP53* depositadas no IARC é apresentado na figura 2. O tumor mais freqüente entre as famílias acometidas pela mutação no gene *TP53* foi o de mama em idade jovem (27,7%) (Figura 2). Tanto neste estudo como no banco de dados do IARC, o segundo tipo de tumor maligno mais freqüente foi o dos tumores de sistema nervoso central (10,9% e 15,1% respectivamente). O mesmo se verificou quanto ao terceiro tipo de tumor mais freqüente, constituído por sarcomas de partes moles, representado por 8,4% neste estudo e em 14,6% de acordo com os dados do IARC. Foi verificado um aumento na presença de tumores adrenocorticais, representados por 6,7% neste estudo e por 3,9% dos tumores do banco de dados do IARC. O aumento também foi verificado nos tumores gástricos, presentes em 6,7% dos casos neste estudo e em 3,1% dos tumores do banco de dados. Tumores colorretais, ocorridos em 5,9% dos casos neste estudo, foram verificados em 2,9% dos casos do IARC. Tumores de pulmão e tumores do trato genital feminino estavam presentes em menor freqüência em ambos os grupos. A baixa freqüência de sarcomas ósseos (0,8%) e de tumores do grupo das leucemias e linfomas (1,7%) diferiu dos dados do IARC (11,4% e 5,1% respectivamente).

Todas as famílias avaliadas que apresentaram casos de tumores adrenocorticais tiveram a mutação detectada. O mesmo ocorreu nas famílias que apresentaram tumores renais (quatro casos), tumores de papila duodenal (dois casos) e mola hidatiforme (um caso). Nenhuma das famílias nas quais houve a detecção de mutação apresentou tumor de bexiga ou tumor de Wilms', tumores estes presentes no grupo sem detecção de mutações.



**Legenda:** (a): ADR: carcinoma adrenocortical; CCR: câncer colorretal; SNC: sistema nervoso central; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; TGF: Trato genital feminino.

**Figura 2** - Perfil de tumores das famílias brasileiras com mutações no gene *TP53* comparado ao perfil de tumores em outras famílias com a mutação no gene *TP53* depositadas no banco de dados do IARC.

A idade de acometimento dos diferentes tumores referidos pelas famílias deste estudo foi predominantemente em idade jovem, com exceção dos tumores de estômago, tumores colorretais e pulmão (Tabela 5). A idade de acometimento dos tumores de mama e sarcomas de partes moles em famílias nas quais foi possível a detecção da mutação foi semelhante àquelas sem a detecção da mutação. O mesmo foi verificado nos tumores de estômago, tumores de cabeça e pescoço e tumores do trato genital feminino.

**Tabela 5** - Idade de acometimento de tumores em de pacientes com diagnóstico clínico da SLF e LFL.

	Total	Idade média (anos)	
		Mutação presente	Mutação não detectada
Tumores	338 (100%)		
Mama	72 (21,3%)d	43,5	44,9
Sarcoma de partes moles	37 (10,9%)a	30,1	31,8
Estômago	30 (8,9%)e	55,6	51,6
Sistema nervoso central	26 (7,7%)d	19	32
Colorretal	21 (6,2%)c	32,4	51,6
Leucemia/ Linfoma	21 (6,2%)c	45	33,2
Pulmão	15 (4,4%)b	55,9	46,6
Próstata	12 (3,5%)c	64,5	72
Trato genital feminino	11 (3,2%)b	59,7	54,2
Pele não melanoma	10 (2,9%)b	58	48,7
Esôfago	9 (2,7%)c	53	68,3
Sarcoma ósseo	9 (2,7%)b	N/A	17,3
Cabeça e pescoço	9 (2,7%)b	54,5	48,8
Adrenocortical	8 (2,4%)	14,7	N/A
Melanoma	7 (2,1%)	80	47
Fígado	7 (2,1%)b	39	60,5
Pâncreas	6 (1,8%)a	58	47,5
Tireóide	6 (1,8%)	41,5	58
Renal	4 (1,2%)	20,7	N/A
Bexiga	3 (0,9%)a	N/A	54
Papila duodenal	2 (0,6%)	49,5	N/A
Wilms´	1(0,3%)	N/A	1
Ósseo	1 (0,3%)	21	N/A
Mola Hidatiforme	1 (0,3%)	23	N/A

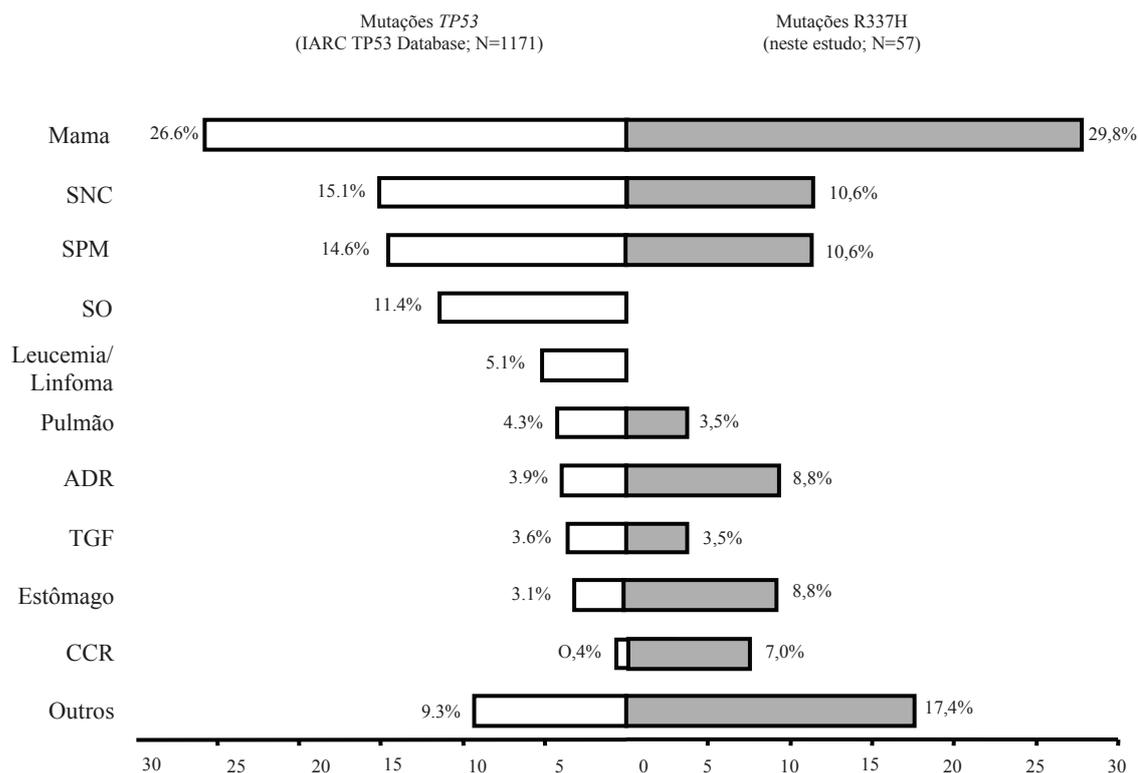
**Legenda:** (a) 1 tumor idade indefinida, (b) 2 tumores idade indefinida,(c) 3 tumores idade indefinida; (d) 4 tumores idade indefinida; (e) 5 tumores idade indefinida; N/A: não aplicável.

Alguns tumores foram mais precoces em indivíduos pertencentes a famílias com a detecção da mutação. Os tumores de sistema nervoso central ocorreram em idade mais precoce nas famílias que tiveram a mutação detectada (19 anos) se comparado às famílias sem mutação detectada (32 anos) (Tabela 5). O mesmo pode

ser verificado nos pacientes com tumores colorretais, que apresentaram idade média de acometimento de 32,4 anos nas famílias com a mutação e 51,6 anos naquelas que não tiveram a mutação detectada. Tumores de próstata, tumores de esôfago, tumores de fígado, tumores de pulmão e tumores de tireóide também ocorreram mais precocemente nas famílias com a detecção da mutação. O mesmo não foi verificado em outros tipos tumorais. Pacientes com leucemias, tumores de pele, melanoma, tumores de cabeça e pescoço e tumores de pâncreas foram acometidos mais tardiamente quando pertencentes a famílias com a detecção da mutação.

A Figura 3 apresenta a comparação entre o espectro tumoral apresentado pelas seis famílias com a mutação R337H detectada e os tumores apresentados pelas famílias incluídas no banco de dados do *IARC* (*IARC TP53 Database R10*).

Foram descritos 57 tumores nas seis famílias brasileiras R337H, sendo que o tumor mais prevalente foi o câncer de mama (29,8%), semelhante ao encontrado no banco de dados do *IARC* (26,6%). A segunda maior prevalência de tumores foi representada por tumores do sistema nervoso central (10,6%) e sarcoma de partes moles (10,6%), dados também compatíveis com os dados do *IARC* (15,1% e 14,6% respectivamente). Verificou-se alta prevalência de tumores adrenocorticais (8,8%) nestas famílias, quarto tipo de tumor mais prevalente, sendo a sua frequência 2,3 vezes maior nas famílias brasileiras portadoras da mutação R337H do que nas outras famílias descritas no *IARC* (3,9%). Dentre os oito tumores adrenocorticais ocorridos nas famílias R337H, sete ocorreram em mulheres, sendo que cinco deles antes dos 15 anos.



**Legenda:** ADR: carcinoma adrenocortical; C/P: cabeça e pescoço; CCR: câncer colorretal; SNC: sistema nervoso central; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; TGF: Trato genital feminino; M: masculino; F: feminino.

**Figura 3** - Perfil de tumores das famílias brasileiras com mutações R337H no gene *TP53* comparado ao perfil de tumores em outras famílias com a mutação no gene *TP53* depositadas no banco de dados do IARC.

Os sarcomas ósseos, tumores típicos da síndrome e presentes em 11,4% dos portadores de mutações do banco de dados do IARC, não foram verificados na população brasileira com a mutação R337H. O mesmo foi verificado em casos de leucemia, presentes em 5,5% no banco de dados do IARC e ausente na população brasileira R337H. As famílias R337H apresentaram ainda tumores pouco frequentes na SLF, incluindo três casos de adenocarcinoma de células claras renais e dois casos de tumores papilíferos de tireóide (Figura 3). Os tumores ocorreram predominantemente em idade jovem, com distribuição entre homens e mulheres de modo semelhante ao relatado na literatura.

#### **4.4 PERFIL TUMORAL EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS SEM A DETECÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINATIVAS E COM DIAGNÓSTICO CLÍNICO DA SLF E LFL**

Em 32 famílias que preencheram pelo menos um dos critérios clínicos para SLF e LFL não foi detectada a mutação no gene *TP53* (Tabela 6). O perfil tumoral destas famílias era constituído predominantemente de tumores relacionados à síndrome e as idades de acometimento dos tumores eram precoces.

Frente ao amplo espectro tumoral verificado nas SLF e LFL, algumas famílias acometidas por múltiplos tumores puderam ser classificadas a partir de critérios característicos de mais de uma síndrome genética ligada ao câncer. Na família Y36, na qual a mutação no gene *TP53* não foi detectada, foram relatados quatro casos de câncer colorretal sendo dois deles em idade jovem. A presença de outros tumores em idade jovem foi verificada, sendo dois casos de tumor de mama, um caso de linfoma e um tumor do trato genital feminino acometendo quatro gerações consecutivas. Deste modo, esta família preencheu os critérios de Eeles 1 e ao mesmo tempo poderia ser classificada como Síndrome do Câncer Colorretal não Polipose (HNPCC) a partir dos critérios de Amsterdam II.

**Tabela 6** - Espectro tumoral de 32 famílias brasileiras com diagnóstico clínico da SLF e LFL sem detecção da mutação no gene *TP53*.

Família	Tumores no probando (Gênero-Idade de acometimento, anos) <sup>a</sup>	Tumores nos familiares (Genero-Idade de acometimento, anos) <sup>a</sup>	Classificação Clínica <sup>b</sup>
Y2	SPM (F-42*)	Leucemia (F-26, M-62), Estômago (M-49)	LFL-B
Y3	Mama (F-44*)	SNC (M-34), Mama (F-36, 43), Bexiga (M-48)	LFL-E1
Y6	SO (F-15*), Mama (F-32*)		LFL-E1
Y7	SPM (F-37*), Mama (F-40*)	Mama (F-35), N/D (F-70)	SLF
Y8	SNC (M-25*)	SNC (M-28), Estômago (F-54, F- N/D), N/D (M-N/D)	LFL-B
Y9	SPM (F-18*), Mama (F-46*)	SPM (F-46), TGF (F-66), Pulmão (M-55, F-66), Estômago (M-47, M- 50, F-65)	SLF
Y10	SPM (F-55*)	CCR (F-50), Estômago (F- 38) Pulmão (M-25, M-35) Mama (F-36)	LFL-E1
Y11	Tireóide (F-73*), Melanoma (F-75)	Pele (M-72), Mama (F-42, F-53), Melanoma (M-9), Pâncreas (F-63) CCR(M-60)	LFL-E1
Y14	SPM (M-35*), Linfoma (M-55*), Próstata (M-63*)	CCR (M-38), Mama (F-29)	SLF
Y17	Mama (F-43, 46*)	Mama (F-63), Linfoma (M-26), Pele (F-N/D), Pulmão (F-N/D), SO (F-63), C/P (F- N/D), TGF (F- N/D), Próstata (M-43)	LFL-E1
Y20	Renal (M-1*), SPM (M-5, 11,16, 17*), SNC (M-15*), SO (M-18*)	Mama (F-60, M-75), Leucemia (F- 62, F-N/D)	SLF
Y21	SPM (M-39, 40, 41, 44, 45 *)	Bexiga (M-60), Linfoma (M-20, F- 69), Melanoma (F- 40), Próstata (M-78), Estômago (F- 63, F-64), N/D (M-40, M-70)	SLF
Y22	SPM (F-14*)	Estômago (M-21, M-45, M- N/D), N/D (F- N/D)	SLF

Cont/Tabela 6

Y23	SNC ( <b>M-1*</b> )	Leucemia ( <b>M-34</b> ), Mama ( <b>F-66</b> ), Esôfago (M-68, F-80), Tireóide (F-47)*	LFL-B
Y24	Linfoma ( <b>F-73*</b> ), Mama ( <b>F-79*</b> ), Pele ( <b>F-81*</b> )	SNC ( <b>F-30</b> ), C/P (F- 45), Fígado (F-57), TGF (F-32, F-78)	LFL-E1
Y29	SO ( <b>F-19*</b> ), SPM ( <b>F-23*</b> ), C/P ( <b>F-24*</b> ), Mama ( <b>F-26, 26*</b> )	Linfoma (M-N/D),C/P ( <b>F- 63</b> ), Pâncreas ( <b>M-52</b> ), Mama (F-N/D)	SLF
Y30	Linfoma ( <b>F-25*</b> )	SPM (F-41), Mama ( <b>F-50</b> ), Próstata (M-80), Pele (F- N/D), Pâncreas (F-N/D)	LFL-E1
Y31	SNC ( <b>M-34, 34*</b> )	SPM (M-15), Linfoma ( <b>F-8</b> )	LFL-B
Y32	SPM ( <b>F-56*</b> )	CCR (F-28), Tireóide (F-58), Pele (F-51, M-N/D), SNC ( <b>M-70, M-78</b> ), SPM (F-56)	LFL-E2
Y36	Mama ( <b>F-44*</b> )	CCR (M-29, M-48, M-72, F-84), Linfoma (F-23), Mama ( <b>F-44</b> ), TGF (F-63)	LFL-E1
Y38	SPM ( <b>M-39*</b> )	Pâncreas ( <b>F-42*</b> ), Melanoma (F-35)*, Estômago (M-N/D), Fígado (M-N/D M-N/D), Bexiga (F-N/D)	SLF
Y41	SO ( <b>F-8*</b> ), Mama ( <b>F-28*</b> )	Mama ( <b>F-40</b> ), Esôfago (F-N/D)	SLF
Y42	Melanoma ( <b>M-51*</b> ), Pulmão ( <b>M-52*</b> ), SPM ( <b>M-52*</b> )	CCR (F-77, F-N/D), SPM ( <b>M-81</b> ), Melanoma (M-72), Fígado (M-64), Mama (F-N/D)	LFL-E2
Y43	SPM ( <b>M-22*</b> )	Leucemia ( <b>F-1</b> ), CCR (F-48), Estômago (F-60, M-N/D)	LFL-E1
Y44	Pâncreas ( <b>M-33*</b> )	SO (M-16), Leucemia ( <b>F-32</b> ), Estômago (M-56, M-67), Mama (F-38, F-53,F-98), Tireóide (F-54), Esôfago (M-57)	LFL-E1
Y46	SPM ( <b>M-25*</b> ), Pele ( <b>M-35*</b> )	Estômago (F-70), CCR ( <b>F-54</b> ), Mama ( <b>F-40, F-40</b> ), Próstata (M-72)	LFL-B

**Cont/ Tabela 6**

Y47	Linfoma ( <b>M-11*</b> ), SPM ( <b>M-18*</b> ), Estômago ( <b>M-36*</b> ), Pele ( <b>M-33,</b> <b>34*</b> )	Mama ( <b>F-62</b> )	LFS
Y51	Mama ( <b>F-53*</b> )	SNC ( <b>M-3</b> ), TGF (F-52, F-N/D), Mama (F-68), CCR (F-N/D), Próstata (M-N/D), Estômago (M- N/D), Esôfago (M- N/D, M-N/D) N/D (F-N/D)	LFL-E1
Y52	Mama ( <b>F-48*</b> )	Mama (F-36), Leucemia ( <b>F-6</b> ), Próstata (F-62)	LFL-E1
Y54	Mama ( <b>F-41*</b> ), TGF ( <b>F-44*</b> )	SNC ( <b>M-8</b> ), Estômago (F-38, M- 50), C/P (M-53, M-59)	LFL-E1
Y55	Mama ( <b>F-47*</b> )	Mama ( <b>F-27</b> ), Mama (F-29), SO (F- N/D), SNC (M-N/D)	LFL-E1
Y56	Linfoma ( <b>M-24*</b> ), SO ( <b>M-24*</b> )	CCR ( <b>M-31</b> )	LFL-B

**Legenda:** (a): ADR: carcinoma adrenocortical; C/P: cabeça e pescoço; CCR: câncer colorretal; SNC: sistema nervoso central; SO: sarcoma ósseo; SPM: sarcoma de partes moles; TGF: Trato genital feminino. M: masculino; F: feminino. Mais de um tumor pode ocorrer em um paciente; (b): Critério diagnóstico clássico, de Birch e de Eeles da Síndrome de Li-Fraumeni; (\*): tumores em indivíduos testados positivos para a mutação em *TP53*; (negrito): tumores confirmados por laudos histopatológicos ou relatório médico; N/D: dado não disponível

A família Y3 foi encaminhada ao departamento de Oncogenética com o diagnóstico de Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário. Nesta família haviam ocorrido três casos de adenocarcinomas ductais invasivos de mama em idade jovem. A probanda apresentou câncer de mama aos 44 anos, sua irmã aos 35 anos e uma tia paterna aos 43 anos. Além disso, foram relatados outros tumores, sendo um irmão com câncer de bexiga aos 48 anos e um tio paterno com tumor de sistema nervoso central aos 34 anos. Mediante o perfil tumoral apresentado, mesmo sem a confirmação molecular, a família recebeu a hipótese diagnóstica de LFL de acordo com os critérios de Eeles 1.

A família Y58, na qual a mutação no gene *TP53* foi detectada, apresentou um espectro muito amplo de tumores típicos da SLF e LFL, sendo 13 indivíduos acometidos na mesma família em três gerações consecutivas. A presença de duas irmãs com câncer de mama aos 35 e 45 anos, além da mãe com câncer de mama aos 55 anos, da tia materna aos 49 anos e da prima materna aos 33 anos, sugere o diagnóstico da Síndrome de Mama e Ovário Hereditário. Desta forma, o diagnóstico diferencial deve ser realizado em todos pacientes com as SLF e LFL nas quais não foram encontradas mutações no gene *TP53*, visando a busca de alterações em outros genes que possam estar envolvidos na etiologia dos tumores apresentados. No entanto, apesar da mutação não ter sido detectada, o diagnóstico clínico da síndrome permanece.

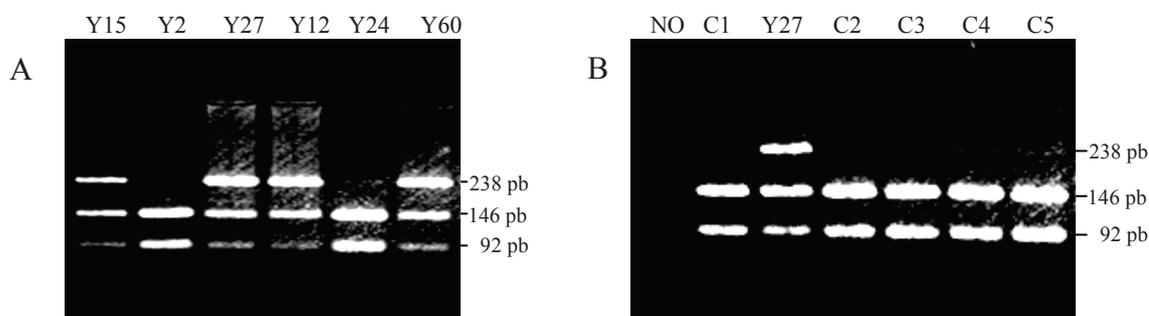
#### **4.5 AVALIAÇÃO DOS POLIMORFISMOS ENCONTRADOS NO GENE *TP53***

A frequência da alteração no códon 10 (R337H) no DNA genômico de 53 voluntários saudáveis provenientes do Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas - Porto Alegre foi avaliada através de experimentos de PCR-RFLP.

A presença da troca de G para A no segundo par de bases do códon 337 impede o reconhecimento da sequência GCGC pela enzima de restrição HhaI e, conseqüentemente, não ocorre a digestão do DNA. Após a amplificação do DNA com primers específicos para o éxon 10 e digestão com esta enzima de restrição, a presença de dois fragmentos de DNA (92 e 146 pb), resultantes da ação da enzima de restrição, indica que nenhum dos alelos possui a alteração. Por outro lado, a presença

de um terceiro fragmento (238 pb) demonstra que um dos alelos possui a alteração, o que impediu que a digestão enzimática ocorresse.

Dentre as 53 amostras controle, referentes aos voluntários saudáveis testados, nenhuma apresentou a alteração R337H (Figura 4). Esta alteração foi encontrada em seis das 45 famílias que apresentavam o fenótipo da SLF e LFL neste estudo e já havia sido descrita como mutação germinativa no banco de dados do IARC, podendo ser classificada como uma mutação patogênica.



**Legenda:** A: Y15, Y12, Y27, Y60: DNA genômico de probandos portadores da mutação R337H no gene *TP53*; Y2, Y24: probandos sem a mutação germinativa no gene *TP53*; B: NO: controle sem DNA; C1, C2, C3, C4, C5: DNA genômico de voluntários saudáveis da provenientes do Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas - Porto Alegre; Pb: pares de base.

**Figura 4** - Digestão enzimática do códon 337 do éxon 10 do gene *TP53* pela técnica de RFLP.

Foram identificados polimorfismos no gene *TP53* nas famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SLF e LFL incluídas neste estudo (Tabela 7). O polimorfismo 11827, no íntron 2, foi verificado em 20 famílias dentre as 45 estudadas. Esta alteração já havia sido descrita previamente como um polimorfismo e faz parte do banco de dados de polimorfismos encontrados no gene *TP53*. No íntron 3, na posição 11951, foi verificada a presença de uma inserção de 16 pares de base, presente em 13 das 45 famílias estudadas. Esta alteração também já havia sido descrita previamente.

**Tabela 7** - Frequência de polimorfismos no gene *TP53* na população brasileira.

Éxon/ Íntron	Códon	Nucleotídeo	Tipo	Descrição	Neste estudo (%)	Controles saudáveis	Referências
Íntron 2	-	11827	Ponto/ Silenciosa	C>G	20/45 (44,4)	-	PLEASANTS e HANSEN 1994
Íntron 3	-	11951	Inserção 16 pares de base	+16 pb	13/45 (28,9)	-	LAZAR et al. 1993; SJALANDER et al. 1996
Éxon 4	72	12139	Ponto/ Silenciosa	C>G	23/45 (51,1)	-	HARRIS et al. 1986; BECKMAN et al. 1994; THOMAS et al. 1999
Íntron 5	-	13311	Ponto/ Silenciosa	T>G	1/45 (2,2)	3	Nunca descrito
Íntron 6	-	13964	Ponto/ Silenciosa	G >C	4/45 (8,9)	6	HILLEBRANDT et al. 1997; FISZER- MALISZEWSKA et al. 2003

**Legenda:** +16pb: inserção de 16 pares de bases.

O polimorfismo mais prevalente nesta amostra foi o localizado no éxon 4, no códon 72, encontrado em 51,1% das famílias brasileiras avaliadas, sendo este o polimorfismo no gene *TP53* mais frequentemente descrito na literatura. A alteração 13964, localizada no íntron 6, foi verificada em 4 das 45 famílias avaliadas, e já havia sido descrita previamente na literatura. A presença da alteração no nucleotídeo 13311 do íntron 5 nunca havia sido descrita em famílias SLF e LFL. Por isso a sua frequência foi avaliada nos 53 controles da população de Porto Alegre através de seqüenciamento direto desta região. Esta avaliação demonstrou a presença da alteração em três amostras (5,6%), podendo esta alteração ser considerada como um polimorfismo.

#### 4.6 ACONSELHAMENTO GENÉTICO E ACOMPANHAMENTO

Todos os pacientes selecionados foram submetidos ao aconselhamento genético e assinaram o consentimento informado após receberem informações sobre a SLF (Anexo 5). O quadro clínico, história familiar e o heredograma de todos os pacientes foram registrados na ficha de avaliação clínica (Anexo 4).

Os resultados dos testes genéticos foram comunicados aos pacientes a partir de laudos redigidos de forma a incluir os resultados provenientes da análise das mutações, além de informações referentes ao teste genético (Anexo 8). Informações publicadas na literatura científica sobre relatos anteriores das alterações encontradas em cada probando também foram incluídas nos laudos. Todas as informações foram apresentadas ao paciente de forma concisa e clara para que um médico clínico geral pudesse compreender seu significado e buscar as informações se necessário. Foi verificado o desconhecimento das características clínicas da síndrome por parte de alguns médicos que já acompanhavam os probandos deste estudo demonstrando a falta de informação sobre o assunto e por isso, possivelmente o subdiagnóstico da síndrome.

Os resultados foram divulgados de forma confidencial durante uma consulta clínica, sendo cada paciente atendido de forma individualizada e sem a presença de acompanhante. As famílias provenientes de colaborações com os serviços de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e da Divisão de Genética Médica do INCA receberam resultados do teste molecular nos institutos de origem. No momento da entrega, as características clínicas da doença, assim como os conceitos de risco, penetrância e rastreamento foram lembrados visando uma

melhor compreensão do significado do resultado do teste molecular e das suas implicações no seguimento clínico do indivíduo. O impacto psicológico da comunicação da síndrome genética foi intenso, sendo experimentadas diversas formas de reação por parte do paciente. Muitos referiram alívio, por terem encontrado a razão pela qual a família vinha sendo acometida pela alta frequência de tumores malignos.

Após receberem o resultado, os pacientes foram avaliados por uma psicóloga com treinamento em acompanhamento de pacientes oncológicos, que oferecia apoio especializado ao paciente. Os pacientes foram questionados quanto à compreensão do diagnóstico, o impacto causado pelo resultado do diagnóstico molecular e perspectivas futuras. A intenção desta consulta foi a de fornecer o apoio psicológico necessário visando proporcionar amparo e redução da sobrecarga (*burden*), para que os familiares pudessem tomar decisões mediante a situação de *stress* que representa a comunicação do diagnóstico de uma doença genética a na família. A maior parte das pacientes optou pela comunicação do resultado do teste genético aos familiares em risco. Ao longo da realização deste estudo, foi oferecido acompanhamento clínico semestral a todos os pacientes e seus familiares. Este acompanhamento era composto por uma consulta com o geneticista responsável além da avaliação pelos especialistas que pudessem estar envolvidos no seguimento das lesões encontradas no rastreamento. Através das consultas foi possível atualizar o quadro clínico das famílias, sendo incluídos nesta análise tumores que surgiram ao longo do período deste estudo.

#### 4.7 DETECÇÃO DE MUTAÇÃO EM FAMILIARES SINTOMÁTICOS E ASSINTOMÁTICOS

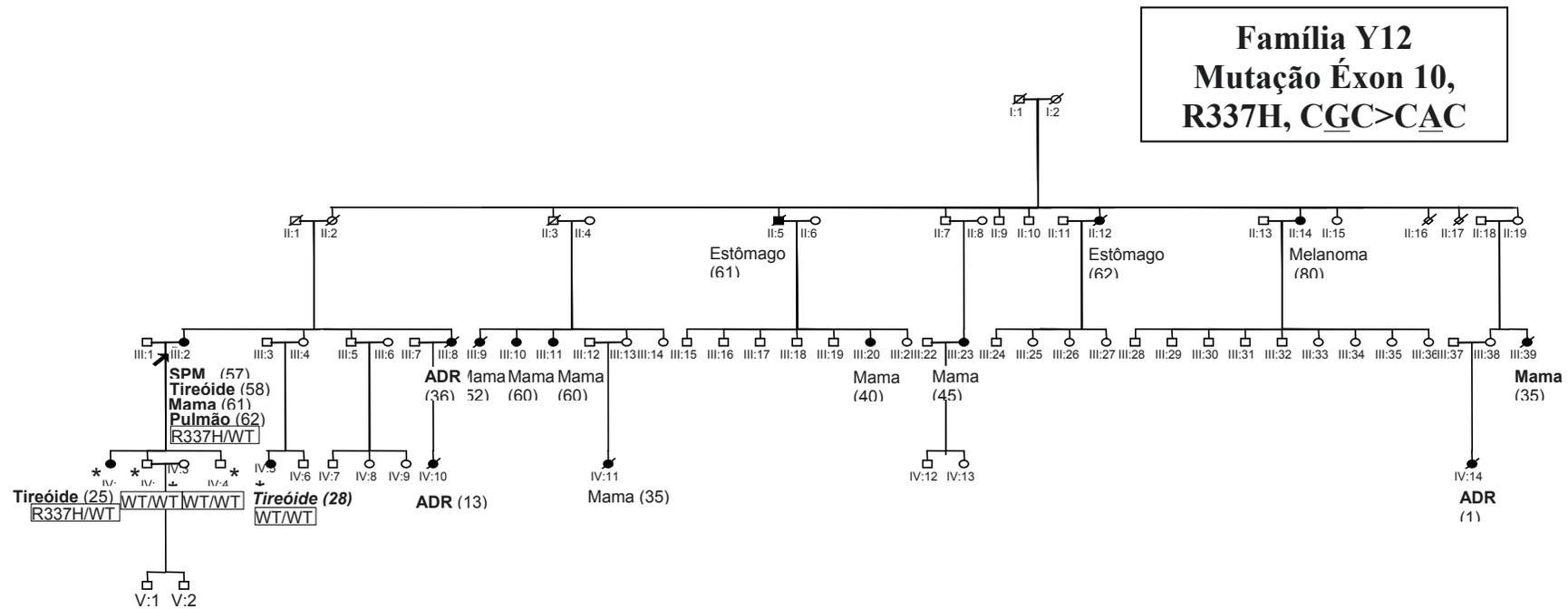
O teste molecular para a detecção de mutações no gene *TP53* foi oferecido a todos os familiares pertencentes às 13 famílias nas quais mutações foram encontradas. Em uma primeira consulta com os membros da família, foram fornecidas informações sobre a síndrome, risco de desenvolvimento de tumores e conceitos como herança e penetrância. Todos foram informados sobre a importância do acompanhamento clínico de possíveis portadores, mesmo se assintomáticos. As consultas familiares foram seguidas de uma avaliação realizada pela psicóloga com treinamento em acompanhamento de pacientes oncológicos. Todos os interessados em fazer o teste molecular foram orientados a agendar uma consulta individual para realização da avaliação clínica e aconselhamento pré-teste. O teste foi realizado após a assinatura do consentimento informado. As informações fornecidas no aconselhamento e o apoio psicológico permitiram a compreensão do risco aumentado e da necessidade de acompanhamento, mesmo em indivíduos assintomáticos, possibilitando a avaliação do perfil molecular de outros membros pertencentes às famílias mutadas. Os resultados foram comunicados aos familiares através de laudos contendo os resultados provenientes da análise das mutações, além de informações referentes ao teste genético.

Até o momento, 15 familiares provenientes de 3 famílias foram testados. Na família Y 12, na qual a mutação R337H foi detectada, os três filhos (Figura 5 - IV:1, IV:2 e IV:3) da paciente índice foram testados. A mutação foi detectada apenas na filha mais velha (Figura 5 - IV:1) que havia apresentado aos 25 anos um tumor

papilífero de tireóide. Dois sobrinhos (IV:5 e IV:6) também foram testados, ambos negativos para a mutação R337H. É interessante notar que em uma das sobrinhas testadas (IV:5), que havia apresentado um tumor papilífero de tireóide aos 28 anos, não foi detectada a mutação R337H.

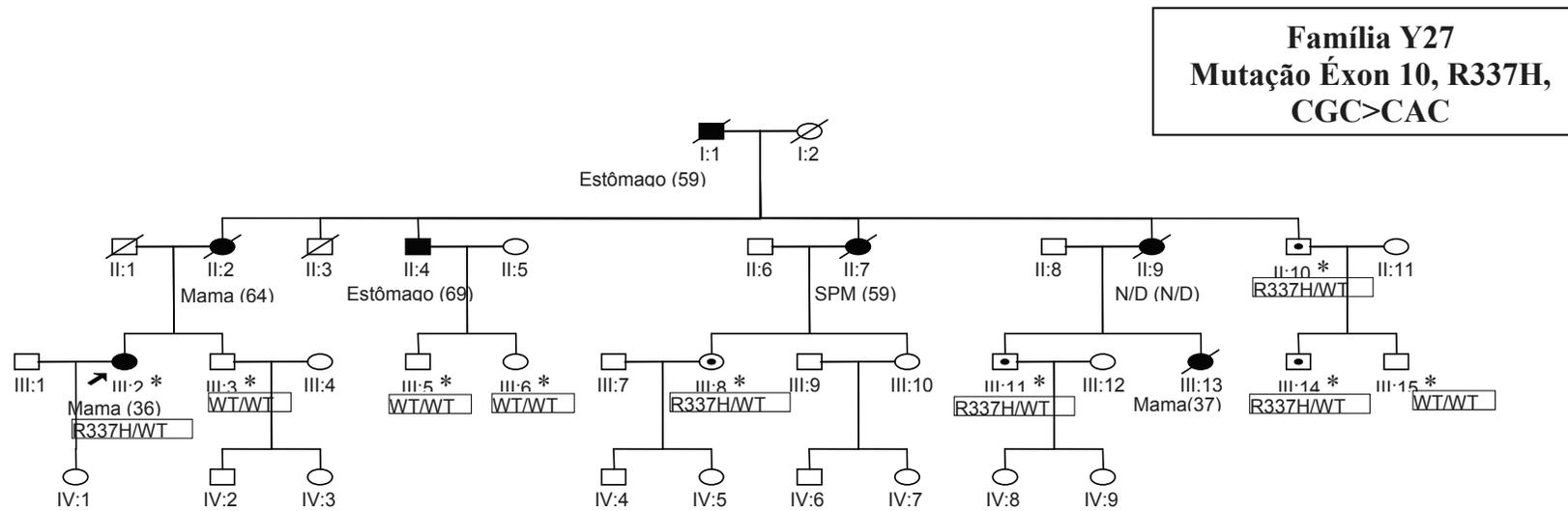
Oito indivíduos pertencentes à família Y27 (Figura 6 - II:10, III:3, III:5, III:6, III:8, III:11, III:14 e III:15) foram avaliados para a presença da mutação R337H, sendo que a mutação estava presente em quatro deles. O tio materno avaliado (II:10) e um de seus dois filhos (III:14) apresentaram a mutação R337H, ambos assintomáticos; o outro filho também avaliado (III:15) não apresentou a mutação. Dois outros primos também assintomáticos apresentaram a mutação (III:8 e III:11). O irmão da paciente (III:3) e dois outros primos maternos (III:5 e III:6) não apresentaram a mutação R337H.

Na família Y49, proveniente de Porto Alegre, apenas a filha do probando (Figura 7 - III:24), que apresentou câncer de mama aos 44 anos, foi testada e teve a mutação R337H detectada. Esta paciente é também portadora da Síndrome de Down (trissomia do cromossomo 21) (Figura 7), sendo este o único caso confirmado de outra síndrome genética associada ao SLF e LFL dentre os indivíduos incluídos nesta amostra. Esta paciente teve o consentimento informado assinado pelo pai, seu responsável legal.



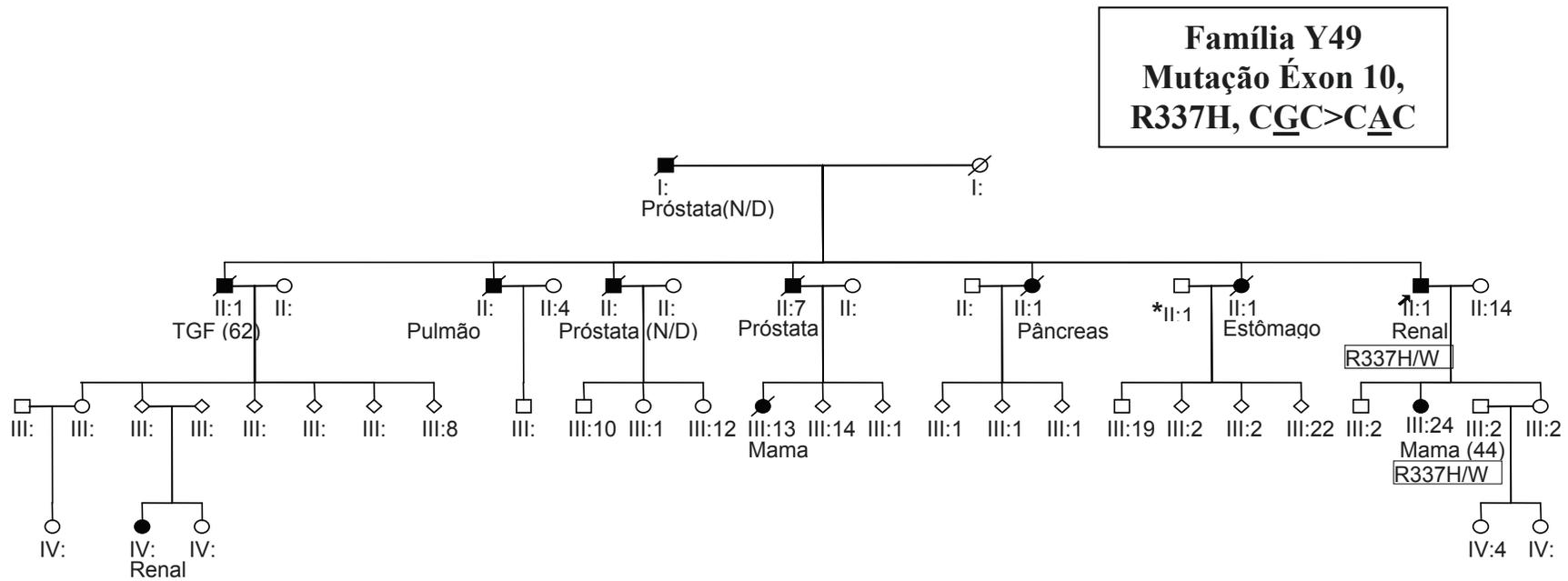
Legenda: \*Testado para mutação no gene *TP53* - R337H no exon 10. ● =acometido por neoplasia maligna; ∅ = óbito; □: indivíduos testados para a mutação no gene *TP53*. □:portador assintomático da mutação R337H. R337H/WT: portador da mutação em heterozigose R337H/ WT: *Wildtype* ou alelo selvagem. III:2: geração:número do indivíduo; Tumor (idade ao diagnóstico); Abreviações: TGF: trato genital feminino. ADR: tumor adrenocortical; SPM: sarcoma de partes moles; N/D: não disponível.

**Figura 5** – Heredograma da família Y 12.



Legenda: \*Testado para mutação no gene *TP53* - R337H no exon 10. ● =acometido por neoplasia maligna; ∅ = óbito; □: indivíduos testados para a mutação no gene *TP53*. □: portador assintomático da mutação R337H. R337H/WT: portador da mutação em heterozigose R337H/ WT: *Wildtype* ou alelo selvagem. III: 2: geração: número do indivíduo; Tumor (idade ao diagnóstico); Abreviações: TGF: trato genital feminino. ADR: tumor adrenocortical; SPM: sarcoma de partes moles; N/D: não disponível.

**Figura 6** – Heredograma da família Y 27.



Legenda: \*Testado para mutação no gene *TP53* - R337H no exon 10. ● =acometido por neoplasia maligna; ∅ = óbito;  
 □: indivíduos testados para a mutação no gene *TP53*. □:portador assintomático da mutação R337H. R337H/WT: portador da mutação em heterozigose R337H/ WT: *Wildtype* ou alelo selvagem. III:2: geração:número do indivíduo;Tumor (idade ao diagnóstico); Abreviações: TGF: trato genital feminino. ADR: tumor adrenocortical; SPM: sarcoma de partes moles; N/D: não disponível.

**Figura 7** – Heredograma da família Y 49.

Todos os familiares que apresentaram a mutação foram considerados como portadores da síndrome e orientados a prosseguir o acompanhamento multidisciplinar para rastreamento de possíveis lesões relacionadas. Os familiares que não apresentaram a alteração relacionada ao probando receberam o resultado negativo para a mutação avaliada e foram orientados quanto ao risco de desenvolvimento de tumores semelhante ao da população em geral, logo sem necessidade de rastreamento específico. Os resultados dos testes moleculares realizados nos familiares foram informados após aconselhamento pós-teste.

#### **4.8 ADAPTAÇÃO DO PROTOCOLO DE RASTREAMENTO CLÍNICO MULTIDISCIPLINAR**

Mediante a presença aumentada de tumores pouco descritos na síndrome nas famílias brasileiras incluídas neste estudo, alguns exames diagnósticos e laboratoriais foram incluídos no protocolo de rastreamento proposto pelo NCCN. Este protocolo adaptado propõe, além dos exames de rastreamento já previstos, a inclusão de exames focalizando a detecção precoce de lesões colorretais e no estômago, além da avaliação renal por métodos de imagem e citologia oncótica (Tabela 8). Todos os portadores da síndrome devem ser submetidos a uma endoscopia e a uma colonoscopia a partir dos 35 anos. Outro exame que deve ser proposto é a ultrassonografia de tireóide anual visando o rastreamento de tumores de tireóide. Os tumores de papila duodenal são de difícil diagnóstico precoce, porém devem ser considerados como diagnóstico diferencial.

**Tabela 8** - Protocolo de rastreamento para pacientes portadores da SLF e LFL adaptado a população brasileira.

<b>Rastreamento</b>	<b>Anual</b>	<b>Semestral</b>	<b>Mensal</b>
<b>Adultos em risco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico com foco na detecção de tumores raros e novos tumores primários</li> <li>• Mamografia anual a partir dos 20-25 anos (M)<sup>c</sup></li> <li>• Ultrassonografia de vias urinárias</li> <li>• Ultrassonografia de tireóide</li> <li>• Colonoscopia aos 35 anos<sup>a,c</sup></li> <li>• Exame para detecção de sangue oculto nas fezes</li> <li>• Endoscopia digestiva alta aos 35 anos<sup>b,c</sup></li> <li>• Acompanhamento direcionado aos tumores ocorridos nas famílias</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico das mamas a partir dos 20-25 anos ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama em parente jovem (M)</li> <li>• Citologia oncológica</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Auto-exame da mama a partir dos 18 anos</li> </ul>
<b>Crianças em risco</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Exame clínico com foco na detecção de tumores raros</li> <li>• Exame para detecção de sangue oculto nas fezes</li> <li>• Hemograma completo</li> </ul>		
<b>Outras possibilidades de manejo</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Esclarecer famílias sobre limitações no rastreamento de tumores relacionados à síndrome</li> <li>• Informar sobre mastectomia profilática bilateral (individualizar a cada família)</li> <li>• Informar pediatras sobre risco de tumores infantis</li> <li>• Rastreamento baseado na história famílias</li> <li>• Educação sobre possíveis sinais e sintomas de câncer</li> </ul>		

**Legenda:** (M) – exame realizado em mulheres; **Negrito:** novas propostas para rastreamento precoce de lesões relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni. <sup>c</sup> ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama em parente mais jovem. <sup>a</sup> se presença de pólipos adenomatosos, repetir em 1 ano; ausência de pólipos adenomatosos, repetir em 3 anos. <sup>b</sup> na presença de lesões suspeitas, como esôfago de Barret ou atipia, repetir anualmente.

A alta incidência de tumores adrenocorticais na infância deve ser comunicada ao pediatra responsável pelas crianças pertencentes a famílias portadoras da síndrome, devendo estes ficar atentos quanto a sinais característicos deste tumor como puberdade precoce, hirsutismo e acne infantil. A realização anual de um

hemograma completo deve ser sugerida como acompanhamento destas crianças, porém elas não devem ser informadas sobre o diagnóstico da síndrome devido à falta de discernimento e para ser evitada uma sobrecarga emocional desnecessária.

A aplicação destes métodos permitiu o diagnóstico precoce de um tumor papilífero de tireóide na mãe do probando Y23 aos 47 anos. O probando Y10 foi submetido à colonoscopia na qual foi verificado a presença de um pólipó adenomatoso com atipia de alto grau, lesão que pode ser considerada como pré-maligna. O retorno para a realização de avaliação clínica com o oncogeneticista deverá ocorrer semestralmente e possibilitará a integração entre as diversas especialidades envolvidas no acompanhamento do paciente portador da síndrome. Deste modo, as informações e testes realizados nas diversas especialidades poderão ser reagrupados para melhor acompanhamento não só do paciente, mas também de sua família.

## 5 DISCUSSÃO

O câncer é uma doença de origem genética. É causada por alterações ocorridas em genes relacionados aos processos de proliferação, diferenciação e morte celular. Estas alterações podem ocorrer em células somáticas e/ou em células germinativas. Indivíduos portadores de mutações germinativas em genes relacionados à tumorigênese apresentam alta predisposição para o desenvolvimento de neoplasias, podendo ser classificados com portadores de síndromes genéticas de predisposição ao câncer. A maior parte das síndromes hereditárias de predisposição ao câncer tem herança autossômica dominante, a partir da qual a presença de apenas um alelo mutado leva a caracterização da síndrome e confere à prole destes indivíduos um risco de 50% de serem portadores da síndrome (LYNCH et al. 2004).

A Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é uma síndrome rara de predisposição ao câncer relacionada a mutações no gene supressor de tumor *TP53*. O diagnóstico clínico da SLF e LFL, sua variante, pode ser feito a partir da ocorrência de tumores típicos da síndrome, geralmente em idade jovem, preenchendo pelo menos um dos critérios diagnósticos existentes na literatura (LI e FRAUMENI 1969, BIRCH et al. 1994, EELES 1995, CHOMPRET 2002). Diversos tumores estão relacionados a esta síndrome e, por isso, é difícil definir um padrão no acometimento dos tumores e na idade ao diagnóstico, o que dificulta a realização de estudos que visem correlacionar os diferentes aspectos da síndrome (VARLEY 2003a).

Mediante o diagnóstico clínico da SLF e LFL, a adoção de medidas visando o rastreamento precoce de tumores deve ser aplicada ao paciente e a seus familiares,

que passam a ser considerados como indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de neoplasias malignas. Através do processo de aconselhamento genético é possível proporcionar ao paciente uma melhor compreensão das características da doença, padrão de transmissão e prognóstico. Após iniciado o processo de informação e aconselhamento, o paciente é esclarecido sobre a possibilidade de confirmação do diagnóstico clínico da SLF e LFL através da análise molecular do gene *TP53*. A presença da mutação no gene *TP53* ocasionará a inativação ou produção anômala da proteína p53, levando à falha no mecanismo de supressão tumoral e facilitando a ocorrência dos tumores relacionados ao fenótipo da SLF e LFL. Com a detecção da mutação, será possível a busca da mesma alteração em familiares assintomáticos que apresentam risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias malignas e logo o rastreamento precoce de tumores (SUTHERS et al. 2005).

Apesar da SLF e sua variante LFL serem consideradas raras, verificou-se a alta incidência de famílias brasileiras que preenchiam os critérios da síndrome e que foram encaminhadas ao departamento de Oncogenética do Hospital do Câncer - A.C. Camargo, São Paulo. A partir da revisão ativa de prontuários de pacientes com história famílias de múltiplos tumores atendidos neste departamento, foi possível diagnosticar outras famílias que poderiam ser classificadas como SLF ou LFL. A colaboração estabelecida com o Serviço de Genética Médica - Hospital de Clínicas, Porto Alegre e com a Divisão de Genética Médica – INCA, Rio de Janeiro permitiu a inclusão de mais 13 famílias. Desta forma, 45 famílias brasileiras com o diagnóstico clínico de SLF e LFL foram avaliadas neste estudo a partir da análise molecular de toda região codificante do gene *TP53*.

Os critérios empregados para o diagnóstico da SLF e LFL foram três: o critério clássico, inicialmente proposto por LI e FRAUMENI em 1969, o critério de BIRCH et al. (1994), mais frequentemente utilizado na identificação da LFL, e o critério de EELES (E1 e E2) (1995), que caracteriza famílias LFL, mas que é pouco utilizado devido à baixa taxa de detecção de mutações (VARLEY et al. 1997b). Os critérios de CHOMPRET (2002) não foram utilizados por serem redundantes se empregados juntamente aos demais critérios da síndrome. Logo, os critérios empregados foram amplos, porém bem delimitados, visando à inclusão do maior número de famílias com o perfil SLF/LFL. Entre as famílias selecionadas para este estudo, a maior parte preencheu os critérios de LFL (75,6%), o que era esperado por serem estes os critérios mais abrangentes.

O estudo foi conduzido no estado de São Paulo, incluindo pacientes oriundos de três centros de referência no tratamento do câncer no país. Os três centros localizavam-se nas regiões sudeste e sul do Brasil e por este motivo a maior parte das famílias brasileiras com diagnóstico de SLF e LFL incluídas neste estudo era proveniente destas regiões. Desta forma, é possível que esta amostra reflita apenas o perfil parcial da população brasileira, com foco nas populações de origem européia que foram predominantes na colonização destas regiões. Este dado é corroborado pelo fato de não haver nenhuma família da raça negra, responsável por uma parcela importante da população brasileira. Todas as famílias optaram pela raça branca quando questionados quanto à etnia, sendo este dado subjetivo devido à composição racial variada que constitui o povo brasileiro. ROSSI et al. (2002) relataram a dificuldade de determinação da origem racial exata das famílias brasileiras devido a heterogeneidade e miscigenação étnica no estudo das síndromes genéticas ligadas ao

câncer. Por este motivo, a classificação étnica das famílias não foi considerada para análise. É interessante notar que não existem dados na literatura referindo a ocorrência da SLF e LFL nos diferentes grupos étnicos, sendo a maior parte dos registros de mutações germinativas do gene *TP53* referentes a famílias de origem caucasiana (IARC *TP53* Database R10). Estudos futuros incluindo famílias provenientes de outras regiões do país serão de grande importância para determinar a frequência destas mutações e avaliar o perfil tumoral da síndrome nas outras regiões do país.

Os heredogramas foram constituídos a partir de todas as informações referentes aos familiares do probando. Foram incluídos todos os familiares que apresentaram tumores malignos, assim como os familiares saudáveis, provenientes do maior número de gerações possível. Por se tratarem de famílias muito extensas, com muitos indivíduos pertencentes às diversas gerações, não foi possível especificar o número total de indivíduos que compunham cada geração. Por este motivo, não se avaliou a porcentagem de indivíduos afetados em cada família ou em cada geração.

A presença de 338 tumores em 292 indivíduos de 45 famílias avaliadas neste estudo reflete a alta incidência de neoplasias nos indivíduos com o diagnóstico clínico da SLF e LFL. Além disso, a presença de uma grande variedade de tumores que podem acometer os portadores pode ser verificada neste estudo a partir dos 25 grupos caracterizados para a classificação dos tumores. Como as SLF e LFL são caracterizadas exclusivamente a partir da ocorrência de tumores malignos, os tumores benignos não foram incluídos na análise, exceto pelo caso de mola hidatiforme na probanda Y1, que apresentou caráter invasor descrito em relatório médico fornecido pela paciente.

Dentre os tumores relatados, 46,1% puderam ser confirmados por meio de relatório médico ou por laudo histopatológico. Esta taxa pode ser considerada alta se for levada em conta à dificuldade de acesso aos registros médicos hospitalares no país. Quando solicitados a buscar algum tipo de comprovante, os pacientes eram orientados quanto ao seu direito por lei às informações sobre os tumores ocorridos em seus familiares.

As famílias com o diagnóstico clínico da síndrome incluídas neste estudo apresentaram de 1 a 18 membros, acometidos por 24 tipos diferentes de tumores, além de 10 tumores de origem indeterminada. O espectro tumoral apresentado foi bastante amplo, sendo mais prevalentes os tumores de mama, sarcomas, tumores de estômago e sistema nervoso central e leucemias (Tabela 2). Dados semelhantes foram verificados em estudo conduzido por NICHOLS et al. (2001), no qual 77% dos 738 tumores avaliados em famílias com o diagnóstico molecular da mutação do gene *TP53* eram típicos da SLF (mama, tumores adrenocorticais, sarcomas, tumores de sistema nervoso central e leucemias) enquanto que o restante era composto por diversos tipos histológicos. Nas famílias brasileiras foram verificados tumores descritos como freqüentes na SLF e LFL em porcentagens próximas às descritas no banco de dados de mutações germinativas do *TP53* do IARC (IARC *TP53* Database R10). No entanto, alguns tumores descritos ocasionalmente na síndrome foram verificados em maior incidência nas famílias deste estudo, como os tumores malignos de estômago e tumores colorretais. Os tumores gástricos constituíram o terceiro grupo de tumores mais freqüentes (n=30, 8,9%) e os tumores colorretais, o quinto grupo de tumores mais freqüentes. A alta incidência de tumores gástricos pode ser devido a prevalência deste câncer na população brasileira, sendo o terceiro

tumor mais freqüente nos homens e quinto mais freqüente nas mulheres nas regiões sul e sudeste do país (Ministério da Saúde 2006). A maior incidência de tumores colorretais pode ser devido a sua alta incidência em países em desenvolvimento, representando o segundo tumor mais freqüente nestas populações (STEWART e KLEIHUES 2003). Desta forma a interação entre fatores ambientais e a presença da alteração genética podem contribuir para o aumento destes tumores.

A idade de aparecimento dos tumores foi precoce conforme esperado para as famílias SLF/LFL (Tabela 2). Em 61,1% dos pacientes observaram-se tumores de mama em idade pré-menopausal. Esta idade é atípica para o desenvolvimento de tumores desta natureza e deve levantar a suspeita de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer. Dez casos de tumores colorretais ocorreram em idade jovem, antes dos 45 anos, enquanto que apenas oito casos foram diagnosticados após esta idade. Estes dados divergem das informações sobre a idade de acometimento de tumores colorretais esporádicos na população brasileira, que possui maior incidência na faixa entre 50 e 70 anos de idade (MALHEIROS et al. 2005).

A presença de mais de um tumor primário foi verificada em 15 dos 292 (5,1%) indivíduos com o diagnóstico clínico da síndrome incluídos neste estudo. A associação mais freqüente foi a de sarcomas de partes moles e câncer de mama, verificada em quatro indivíduos, seguida da associação de câncer de mama e sarcomas ósseos, que ocorreu em três indivíduos. Estes dados diferem do estudo de HISADA et al. (1998), que verificaram a multiplicidade de tumores em 21% de 200 indivíduos com diagnóstico da síndrome. A menor freqüência de indivíduos com múltiplos tumores observada neste estudo pode ser devido à dificuldade do paciente oncológico obter assistência médica especializada no país, levando ao diagnóstico

mais tardio da doença e a uma maior mortalidade relacionada a primeira neoplasia. A associação de tumores de mama e sarcomas não é característica de famílias SLF e LFL e a ocorrência desta associação enfatiza a necessidade de um rastreamento mais intensivo em tumores de mama em pacientes portadores de sarcomas. No caso da ocorrência de tumores de mama, o inverso é mais difícil de ser realizado, devido a dificuldade de rastreamento de sarcomas.

Alguns relatos na literatura descrevem a incidência de múltiplos sarcomas em famílias portadoras da mutação germinativa no gene *TP53*. KING et al. (1993) relataram o caso de um paciente do sexo masculino que apresentou três sarcomas primários, além de ter história familiar de diversos tumores e mutação detectada no gene *TP53*. Em 2004, KHAYAT e JOHNSTON relataram a ocorrência de dois sarcomas em uma criança portadora de mutação germinativa no gene *TP53*, sendo o primeiro deles um rhabdomyosarcoma do músculo escapular e o segundo um osteosarcoma de mandíbula. Sem história familiar de câncer, este mesmo paciente apresentou posteriormente um tumor adrenocortical. Neste estudo, a presença de duas famílias com indivíduos portadores de múltiplos sarcomas (Y 20 e Y21) e sem diagnóstico molecular foi de grande interesse. Nas duas famílias ocorreram tumores típicos da SLF nas linhagens materna e paterna, não havendo o predomínio da ocorrência de tumores em apenas uma linhagem. Devido a este fato, os tumores referentes a ambas linhagens destas famílias foram considerados para as análises deste estudo, por não ter sido possível definir pelos métodos utilizados qual lado segrega a alteração. Nos estudos de KING e KHAYAT e JOHNSTON, foi possível a detecção molecular da mutação enquanto que nas famílias brasileiras que apresentaram o mesmo perfil clínico, a mutação não foi verificada. A associação

entre a incidência de múltiplos sarcomas em famílias portadoras da SLF ou LFL e a ausência da detecção de mutação germinativa no gene *TP53* reforça a hipótese de que a população brasileira pode apresentar alterações, sendo estas prováveis mutações cromossômicas, que levem a inativação do gene *TP53* distintas das demais populações.

O uso de pesticidas vem sendo relacionado ao aumento da incidência de câncer em algumas populações. O programa *Agricultural Health Studies*, lançado em 1993 pelo Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos (NIH) ([www.aghealth.org](http://www.aghealth.org)), visa avaliar a exposição frequente de fazendeiros a pesticidas e a sua relação ao aumento de neoplasias malignas e outras doenças. Dados preliminares demonstram que na população de fazendeiros expostos da região de Durham, no estado da Carolina do Norte, foi verificada a alta incidência de tumores tais como sarcomas de partes moles, tumores de sistema nervoso central, leucemia, linfoma, estômago, próstata e pele, assim como a maior incidência de doenças não relacionadas ao câncer, tais como Parkinson e doenças pulmonares. É de grande interesse notar que estes tumores compõem o espectro SLF/LFL, sendo alguns dos tumores mais frequentemente descritos na síndrome. SANDRINI et al. (1997) levantaram a hipótese de que a alta incidência de tumores adrenocorticais na região da periferia de Curitiba poderia estar relacionada à forte exposição a poluentes ambientais, tais como pesticidas, que são utilizados sem a vigência de normas de segurança. Pesquisadores ingleses relacionaram o aumento de duas vezes na incidência de tumores adrenocorticais na região noroeste da Inglaterra com a maior exposição a pesticidas nesta área (BIRCH e BLAIR 1988). A exposição parental a pesticidas já

foi relacionada ao aumento da incidência de tumores em crianças de 0 a 4 anos na Noruega (KRISTENSEN et al. 1996).

O uso indiscriminado de pesticidas foi descrito em 11,1% das famílias brasileiras deste estudo (5/45 - 11,1%). Em três destas famílias (Y1, Y12, Y15) a mutação no gene *TP53* foi detectada, enquanto que nas duas restantes (Y6, Y31) a mutação não foi encontrada. Chama a atenção o número relativamente alto de famílias com exposição a pesticidas entre as 13 famílias que tiveram sua mutação detectada (3/13 – 23,1%). Os relatos sobre a intensidade da exposição foram inespecíficos, sendo observados desde o contato esporádico com venenos utilizados em plantações próximas a suas moradias até o contato intenso, diário, por mais de doze anos, com diversos tipos de venenos, sem utilização de proteção. Todos os pacientes que referiram exposição a pesticidas relataram também a exposição parental a pesticidas. Apenas informações referentes à coloração (“veneno azul”) ou nomes vulgares foram fornecidas pelas famílias. Devido às imprecisões das informações, não foi possível estabelecer qualquer correlação entre tipo, intensidade ou período de exposição e a incidência de tumores na síndrome. Estes dados sugerem a possível interação entre a exposição a pesticidas e a ocorrência de um fenótipo SLF/LFL, ocorrendo tumores típicos da síndrome em membros expostos na família, ou na sua descendência. Estudos para a avaliação da exposição a pesticidas e a incidência de tumores característicos da SLF e LFL serão necessários para esclarecer esta correlação.

Este estudo é a primeira descrição na América Latina da prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* e dos perfis clínicos de famílias que preenchem os critérios diagnósticos da SLF/LFL. Até o momento, estudos de mutações nas SLF

e LFL eram originários principalmente da Europa Ocidental e da América do Norte. Mutações germinativas foram detectadas em 28,9% (13/45) das famílias brasileiras avaliadas neste estudo. Estas famílias são provenientes de centros de referência no tratamento de câncer no país e na avaliação de famílias portadoras de síndromes genéticas ligadas ao câncer.

A maior parte das mutações encontradas foi verificada nos indivíduos com diagnóstico de LFL (12/34 - 35,3%) (Tabela 3). As mutações germinativas no gene *TP53* encontradas nas famílias com diagnóstico clínico de LFL deste estudo aumentam em 10,2% o número de todas as famílias LFL com a mutação detectada descritas no banco de dados do IARC, somando 12 famílias as 118 já descritas na LFL. Entre as famílias portadoras da mutação com diagnóstico de LFL, 41,8% preenchem os critérios de Birch e 31,8% que apresentavam somente os critérios de Eeles. É importante lembrar que critérios de Birch são mais restritos e, por isso, todas as famílias que os preenchem, também preenchem os critérios de Eeles. A taxa de detecção de mutações em famílias LFL foi superior à relatada por VARLEY et al. (1997b), que haviam verificado mutações em 22% das famílias com o diagnóstico de LFL pelos critérios de Birch e em 8% das famílias com os critérios de Eeles. Devido à maior taxa de detecção de mutações no gene *TP53* nas famílias brasileiras com perfil LFL, torna-se de grande importância à caracterização do diagnóstico da LFL em famílias brasileiras a partir não somente dos critérios de Birch, mas também dos critérios de Eeles, que devem ser aplicados na prática clínica.

Relatos da literatura demonstraram uma alta taxa de detecção de mutações em *TP53* nas famílias com os critérios clássicos da SLF. Dados publicados por VARLEY et al. (1997b) e por VARLEY (2003a) demonstraram a presença de

mutações no gene *TP53* em mais de 71% e 77% respectivamente das famílias com o perfil clássico da SLF. As famílias brasileiras que preencheram os critérios clássicos da síndrome tiveram uma taxa de 9% detecção de mutação no gene *TP53*, muito abaixo da relatada pela literatura (Tabela 3). Uma possível explicação para a baixa taxa de detecção de mutações poderia ser o fato de que outras alterações, não detectadas pelos métodos utilizados neste estudo, que também podem causar a inativação do gene *TP53*, tais como translocações, grandes deleções ou inserções, ou mesmo alterações na região promotora do gene *TP53*, podem ser mais frequentes na população brasileira. BOUGEARD et al. (2003) avaliaram 98 famílias com critérios para a SLF e LFL e 92 famílias que não preenchiam completamente os critérios, a partir da técnica de PCR multiplex quantitativo de pequenos fragmentos (QMPSF) e foi detectada a presença de uma deleção no gene *TP53* em apenas uma família. Com isso, os autores concluíram que rearranjos no gene *TP53* que estejam envolvidos na etiologia da SLF são raros. Como a população brasileira mostrou algumas diferenças tanto no espectro tumoral como na predominância na localização das mutações, deve-se considerar a possibilidade da busca da mutação no gene *TP53* a partir de outros métodos, visando à busca da detecção de grandes deleções, de alterações na região promotora e no exón 1, que é considerado um exon não codificante. A avaliação de outros genes diretamente envolvidos na via da p53, como o gene *Mdm-2*, um dos principais reguladores desta proteína, poderia determinar alterações que levariam ao funcionamento anômalo da p53. Uma outra possibilidade para a não detecção de mutações no gene *TP53* naquelas famílias brasileiras estudadas é que outros genes estão envolvidos na SLF.

Dentre as 13 famílias que tiveram as mutações detectadas, 12 eram do tipo *missense* e uma mutação foi encontrada no sítio doador de *splicing* do íntron 6 (Tabela 3). A presença de uma mutação germinativa no códon 245 (G245S) foi detectada em 2 famílias distintas, descrita previamente em outros estudos (BORRESEN et al. 1992; MACGEOCH et al. 1995; CORNELIS et al. 1997; VARLEY et al. 1997b). A mutação R213Q, que foi descrita em uma família no banco de dados do IARC, foi detectada em uma família brasileira. Três alterações nunca descritas na literatura (V173M, V197M e G244D) foram verificadas, detectadas em três famílias não relacionadas entre si e, por não causarem danos a função da proteína p53 foram consideradas mutações novas relacionadas à SLF ou LFL.

A maior parte dos polimorfismos encontrados neste estudo já haviam sido descritos na literatura. O polimorfismo no íntron 5, nunca descrito anteriormente, foi encontrado em uma família na qual também foi detectada a mutação germinativa no códon 173. Esta alteração foi considerada um polimorfismo e não uma mutação patogênica por estar localizada em uma região intrônica que geralmente não é codificante. Além disso, este polimorfismo foi verificado em 5% dos controles saudáveis da população.

As outras seis mutações germinativas do tipo *missense* ocorridas em seis famílias distintas e não relacionadas, foram idênticas, ocorrendo todas no éxon 10, no códon 337, ocasionando a troca de uma arginina por uma histidina (R337H) no domínio de oligomerização do gene (Tabela 6). Mutações germinativas e somáticas do gene *TP53* são raras neste domínio (IARC *TP53* Database R10). Devido a isto, estudos moleculares iniciais no gene *TP53* nas famílias SLF e LFL buscavam a

detecção de mutações apenas no domínio de ligação ao DNA, compreendido entre os éxons 4 e 9 (domínio de ligação ao DNA), sendo que 95% das mutações descritas neste gene ocorrem neste domínio. No entanto, VARLEY (2003a) levantou a possibilidade de serem encontradas mutações em outros domínios do gene *TP53* e passou a considerar como padrão ouro o sequenciamento de todos os 10 éxons codificantes do gene.

A mutação germinativa no códon 337 do éxon 10 (R337H), encontrada em maior frequência nas famílias avaliadas neste estudo, já havia sido descrita em um paciente que apresentou tumor adrenocortical e que apresentava história familiar de tumor de sistema nervoso central (IARC *TP53* Database R10). A mesma mutação foi detectada por RIBEIRO et al. (2001) em 35 dentre 36 crianças que apresentaram carcinoma adrenocortical, todas provenientes da periferia de Curitiba no Paraná. Estas crianças pertenciam a 28 famílias que não apresentaram história familiar documentada de outros tumores. Os pesquisadores levantaram a hipótese de que a mutação R337H teria como efeito aumentar a predisposição exclusivamente a tumores adrenocorticais, em contraste com as outras mutações no *TP53* descritas previamente. Desta forma, a mutação R337H exerceria uma ação tumor específica, ocasionando exclusivamente o desenvolvimento de tumores adrenocorticais na infância, excluindo desta forma o diagnóstico da SFL e LFL destas famílias. No estudo descrito, marcadores polimórficos intragênicos foram avaliados nos portadores de mutações, demonstrando diferenças que indicavam que os alelos mutantes eram independentes, eliminando a possibilidade dos portadores desta mutação apresentarem efeito fundador. No entanto, em estudo recente realizado pelo mesmo grupo (FIGUEIREDO et al. 2005), verificou-se que o espectro tumoral

relacionado às famílias das crianças portadoras de mutações germinativas no gene *TP53* (R337H) era amplo tanto nas crianças como nos adultos, sendo semelhante às famílias com outras mutações germinativas no *TP53* compiladas no banco de dados do IARC. A revisão do espectro tumoral pelo grupo curitibano, assim como o amplo espectro tumoral apresentado pelas famílias portadoras da mutação R377H deste estudo permite concluir que a R337H não é uma mutação tumor específica, sendo responsável por um fenótipo típico da SLF e LFL. Desta forma, pode-se considerar que a mutação R337H não é uma mutação tumor específica, podendo ser esta responsável por um fenótipo típico da SLF e LFL.

Em um estudo realizado no estado de São Paulo, LATRONICO et al. (2001) verificaram a presença da mutação R337H em 77,8% das crianças (14/18) e em 13,5% (5/37) dos adultos que apresentavam tumores adrenocorticais esporádicos, na ausência de história familiar significativa de câncer. O mesmo grupo (PINTO et al. 2004) verificou a provável presença de um ancestral comum a estas famílias a partir da análise de dois marcadores polimórficos intragênicos em 16 crianças e 6 adultos que apresentaram carcinoma adrenocortical e que eram portadores da mutação germinativa R337H no gene *TP53*. Os pesquisadores verificaram fortes evidências de que havia co-segregação entre os marcadores polimórficos e a mutação germinativa R337H, indicando que esta mutação de originou de um único ancestral e sugerindo a existência de efeito fundador no grupo estudado ao contrário do citado no estudo realizado em Curitiba por RIBEIRO et al. (2001).

As diferenças verificadas no espectro tumoral relacionado à mutação germinativa R337H entre este estudo e os de RIBEIRO et al. (2001) e LATRONICO et al. (2001) podem ser explicadas pelos diferentes desenhos experimentais.

Enquanto que neste estudo realizamos a detecção da mutação em famílias com um perfil tumoral característico da SLF, RIBEIRO et al. (2001) e LATRONICO et al. (2001) selecionaram casos esporádicos de tumores adrenocorticais sem história familiar, sendo o grupo de RIBEIRO et al. (2001) constituído exclusivamente de crianças. A partir destes dados e dos diversos tumores do espectro da SLF e LFL verificados neste estudo, pode-se supor que o aparecimento de outros tumores entre os familiares dos pacientes incluídos nos estudos de RIBEIRO et al. (2001) e LATRONICO et al. (2001) talvez seja apenas uma questão de tempo, indicando a necessidade de um rastreamento mais intensivo nos possíveis portadores. A identificação de um efeito fundador entre as famílias avaliadas por LATRONICO et al. (2001) levanta a possibilidade de que o mesmo possa ocorrer nas famílias R337H incluídas nesse estudo, apesar de não terem relatado parentesco conhecido entre si. Estudos avaliando marcadores polimórficos para identificação de um possível efeito fundador poderiam contribuir para a elucidação deste fato.

O perfil tumoral das famílias R337H neste estudo foi amplo, sendo verificadas proporções semelhantes nos principais tumores relacionados à síndrome (Figura 3). O tumor mais frequente foi o câncer de mama (29,8% - 17/57), ocorrido em 5 das 6 famílias com mutação no R337H. As incidências de tumores do sistema nervoso central e sarcomas de partes moles foram de 10,6%, dados semelhantes aos das outras famílias SLF/LFL. A incidência de tumores adrenocorticais em portadores do R337H foi verificada numa proporção 2,3 vezes maior do previamente relatado na SLF/LFL, demonstrando o maior risco de desenvolvimento de tumores adrenocorticais nos portadores desta mutação. A incidência de tumores de estômago também foi maior nos portadores do R337H do que em outras famílias SLF e LFL,

ocorrendo numa frequência 2,8 vezes maior do que nos portadores de outras mutações (IARC *TP53* Database R10).

A presença de tumores pouco relacionados à SLF e LFL foi observada nas famílias estudadas portadoras da mutação R337H. Foi verificada a ocorrência de carcinomas de células claras renais em duas famílias nas quais a mutação R337H foi identificada e a ausência destes tumores nas demais famílias desta amostra. Este tumor é pouco relacionado à síndrome e apenas outros três casos foram relatados na literatura em famílias portadoras da SLF/LFL, correspondendo a 0,44% dos tumores já descritos na síndrome. (IARC *TP53* Database R10) Desta forma, portadores da mutação germinativa R337H podem apresentar um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinomas de células claras renais e este tipo tumoral deve ser investigado nos portadores desta mutação.

Alguns tumores apresentaram um padrão distinto nas famílias brasileiras com diagnóstico da SLF e LFL se comparados às famílias pertencentes ao banco de dados do IARC. Todas as famílias brasileiras com diagnóstico clínico da síndrome nas quais ocorreu pelo menos um caso de carcinoma adrenocortical tiveram a detecção da mutação no gene *TP53* (Tabela 4). Este fato pode-se sugerir que a presença de tumores adrenocorticais em famílias brasileiras com diagnóstico clínico de SLF e LFL em famílias brasileiras representa um forte indicativo da presença da mutação no gene *TP53*.

A presença de tumores de papila duodenal, nunca descritos na LFS e LFL, foi verificada em indivíduos provenientes de duas famílias deste estudo nas quais foram detectadas mutações no gene *TP53* (Tabela 4). Em ambas as famílias foi relatada a ocorrência de tumores de sistema nervoso central e tumores colorretais em outros

membros da família em idade jovem. Desta forma, o diagnóstico da SLF e LFL deve ser considerado em famílias nas quais ocorram tumores de papila duodenal em idade jovem associados a história familiar de câncer em idade jovem. No entanto, como cada família apresentou mutações diferentes, em domínios diferentes do gene, não foi possível estabelecer uma correlação genótipo-fenótipo.

Tumores de tireóide, somente descritos no artigo original de LI e FRAUMENI (1969), foram verificados tanto em portadores da mutação quanto nas famílias brasileiras sem detecção da mutação (Tabela 4 e Tabela 6). Os tumores de tireóide que acometeram os indivíduos deste estudo eram todos carcinomas do subtipo papilífero, que são geralmente tumores pouco agressivos e com invasão predominantemente local. Frente ao número expressivo de tumores de tireóide encontrado nesta amostra, indica-se o rastreamento precoce que pode ser feito a partir de uma ultrassonografia local e, caso haja suspeita, o diagnóstico pode ser feito a partir de uma punção por agulha fina guiada, evitando diagnósticos tardios que levariam a necessidade de cirurgias mutilantes. O amplo espectro tumoral presente nas famílias deste estudo pode estar relacionado a uma possível maior exposição a fatores mutagenicos, tais como pesticidas, relatados em famílias deste estudo, que ocasionaria além do fenótipo característico da síndrome a ocorrência de outros tumores nunca descritos.

Entre as famílias nas quais foram detectadas as mutações no gene *TP53* foi verificada a ocorrência de alguns tumores em idade mais precoce (Tabela 5). No entanto, a média da idade de acometimento dos três tumores mais prevalentes nas famílias deste estudo (tumores de mama, sarcomas de partes moles e tumores de

estômago) foi semelhante em ambos grupos. Este dado demonstra que possivelmente estas variações foram encontradas devido ao pequeno número de tumores em alguns grupos.

Dismorfias foram detectadas ao exame físico em uma das famílias com a mutação R337H. A paciente Y15, que apresentou um tumor adrenocortical e um tumor renal na infância, foi submetida a uma avaliação endocrinológica, na qual algumas alterações, tais como a baixa estatura, o fascies Cushingóide e o hirsutismo, foram relacionados ao quadro ocasionado pelas alterações endocrinológicas geradas pelos tumores adrenocorticais. No entanto, as alterações esqueléticas, como ponte nasal deprimida e braquidactilia com a presença de hipoplasia de quarto e quinto metacarpos (mão esquerda) e de quinto metacarpo (mão direita), além de macrocefalia, não eram correlacionadas a estas manifestações. A existência de dismorfias relacionadas à SLF e LFL nunca havia sido descrita na literatura. Não foi possível realizar a avaliação clínica dos familiares, para excluir dismorfias semelhantes devido a distância geográfica. No entanto, este relato é importante para motivar outros médicos assistentes de famílias SLF/LFL a buscarem em seus pacientes dismorfias semelhantes. É interessante ressaltar que a probanda Y15 é proveniente de uma das famílias na qual foi relatado exposição a pesticidas. Como dismorfias foram descritas em apenas uma paciente portadora da síndrome, não é possível estabelecer correlações, no entanto demonstra a importância da realização de um exame físico em todas famílias SLF/LFL buscando dismorfias.

Também é um fato inédito a detecção de mutação no gene TP53 em uma paciente com síndrome de Down que apresentou um tumor de mama em idade precoce, pertencente à família Y49 (Figura 7). Esta é uma associação casual

envolvendo a síndrome de Down, que é a mais freqüente causa de retardo mental sindrômico, e a SLF (NUSSBAUM et al. 2002). Vale ressaltar que a paciente apresentava somente dismorfias características da síndrome de Down. O aumento da incidência de neoplasias malignas na síndrome de Down já foi descrito em diversos estudos, sendo relatado maior acometimento de leucemias e tumores de testículo (FERNANDEZ-PLAZA et al. 2004, GOLDACRE et al. 2004). No entanto, tumores malignos de mama são menos freqüentes em mulheres portadoras da Síndrome de Down do que na população feminina geral (SATGE et al. 2002). Estudos avaliando interação da mutação germinativa no gene *TP53* e a ocorrência da trissomia no cromossomo 21 seriam de grande interesse na deteminação desta associação.

O fato de familiares de apenas três famílias com a detecção da mutação buscarem a realização do teste molecular foi inesperado. A família Y49 demonstrou o desejo de realização do teste em familiares desde o início do estudo. As famílias Y12 e Y27 mostraram interesse imediatamente após a comunicação do resultado, enquanto que as outras famílias solicitaram um tempo para reflexão. Isto demonstra a dificuldade de aceitação por parte dos possíveis portadores frente ao comunicado do diagnóstico molecular da síndrome genética. O fato de existirem portadores da mutação assintomáticos demonstra a necessidade do rastreamento precoce. A ausência de mutação na paciente IV:1 da família Y12 que já apresentou um tumor de tireóide demonstra que nem todos os pacientes portadores de tumores em famílias com a SLF/LFL são necessariamente portadores da mutação germinativa.

A realização de rastreamento precoce de tumores na SLF e LFL constitui um desafio. Para que as famílias possam ser corretamente diagnosticadas e acompanhadas, os médicos devem ter conhecimento dos tumores relacionados à

síndrome, sobre os possíveis métodos de rastreamento e sobre a ocorrência na população brasileira de tumores pouco descritos como relacionados à SLF e LFL. No entanto, perante o amplo espectro tumoral que compõe a síndrome torna-se difícil realização de exames específicos no rastreamento precoce de tumores. Em 2001, FREBOURG et al. propuseram um protocolo de rastreamento pré-sintomático que incluía o tumor de mama como principal sítio de acompanhamento, sugerindo que outros tumores são de difícil rastreamento. VARLEY (2003a) propôs que o rastreamento das famílias portadoras da SLF e LFL era complicado devido à variação não apenas do tipo de tumor que pode ocorrer, mas da diversidade de idade em que os tumores ocorrem. Logo, frente ao alto risco para tumores malignos e à alta penetrância, devem-se utilizar todos os métodos disponíveis.

O acompanhamento de um oncogeneticista vai orientar os pacientes quanto aos riscos da síndrome, vai possibilitar o rastreamento precoce de lesões malignas relacionadas à síndrome e proporcionar alguma segurança de que o paciente está sendo acompanhado com todos os recursos disponíveis para o seu caso. As famílias incluídas neste estudo foram inicialmente submetidas ao rastreamento proposto pelo NCCN (Quadro 3) após o diagnóstico. Todos os pacientes foram estimulados a trazer seus familiares que pudessem ser portadores para que fossem também rastreados.

A única medida reconhecida como eficaz era o rastreamento de tumores de mama, a partir da mamografia anual associada à ressonância magnética da mama caso houvesse suspeita (LEACH et al 2005). A possibilidade de realização da mastectomia profilática bilateral em mulheres portadoras da mutação germinativa no gene *TP53* foi proposta por THULL e VOGEL (2004), porém outros estudos não foram feitos para avaliar o seu impacto. Neste estudo, as mulheres foram informadas

sobre a existência desta cirurgia como medida preventiva, porém a opção de realizar a mastectomia profilática bilateral não foi aceita por nenhuma paciente. Devido à variedade de tumores que podem acometer mulheres portadoras da síndrome, essa estratégia foi considerada pelas pacientes como “mutilante” e “desnecessária”.

Os tumores pouco relacionados à síndrome, mas que ocorreram nas famílias brasileiras também foram rastreados neste estudo. Foram realizados exames de imagem e laboratoriais incluindo ultrassonografia de tireóide, exame considerado de alta sensibilidade na detecção de nódulos suspeitos de tireóide, além de citologia oncótica e ultrassonografia de vias urinárias, na busca de possíveis lesões renais. As técnicas de endoscopia digestiva alta foram empregadas na busca de tumores gástricos e colonoscopias foram realizadas visando à detecção precoce de pólipos adenomatosos ou lesões malignas. A utilização destes métodos levou a detecção precoce de um tumor de tireóide na mãe de um dos probandos deste estudo (Y23) e a detecção de uma lesão pré-maligna colorretal (um pólipo com atipia de alto grau) no probando Y10.

O rastreamento das crianças relacionadas às famílias deste estudo foi feito pelos pediatras que acompanhavam previamente as crianças. O pediatra deve estar ciente sobre o diagnóstico da família e da alta incidência de tumores na infância, devendo adotar todas as medidas possíveis para o rastreamento de possíveis lesões malignas que têm maior incidência na SLF e LFL na infância e adolescência, sem que a criança seja submetida a estresse desnecessário. Apesar de ocorrerem tumores malignos na infância, os testes genéticos para detecção da mutação no gene *TP53* não são indicados para crianças ou adolescentes assintomáticos por não existirem métodos para o diagnóstico precoce de tumores característicos desta síndrome nesta

faixa etária, sendo restritos para maiores de 18 anos (maioridade legal) (ENSENAUER 2005).

Não foram verificadas intercorrências durante a realização dos exames de rastreamento nos pacientes deste estudo e não foram realizadas cirurgias desnecessárias devido a dúvidas diagnósticas. Com a utilização destes métodos diagnósticos de forma adequada e a sua realização em laboratórios de alta confiabilidade os riscos aos quais os pacientes estão submetidos tornam-se mínimos perante as possibilidades do rastreamento precoce de tumores malignos.

Os dados expostos mostram a importância da realização da história familiar detalhada em todos os indivíduos que apresentem neoplasias malignas e principalmente uma investigação detalhada em famílias que apresentem múltiplos tumores em idade precoce. A SLF e a sua variante LFL são consideradas raras e sua incidência não é estimada na população, mas deve-se considerar a possibilidade de um sub-diagnóstico. O estudo detalhado das famílias ao longo do tempo pode aumentar seu diagnóstico, esclarecer o espectro tumoral e fornecer informações importantes sobre a evolução e história natural dos tumores apresentados. O aconselhamento genético e o rastreamento preventivo irão fornecer as famílias o suporte necessário para lidar com a doença e poderão diminuir significativamente o impacto e a morbimortalidade relacionada com tal entidade.

## 6 CONCLUSÕES

- Este estudo é a primeira descrição na América Latina da prevalência de mutações germinativa no gene *TP53* e dos perfis tumorais de famílias que preenchem os critérios diagnósticos da SLF/LFL.
- Foram detectadas mutações germinativas no gene *TP53* em 13 famílias brasileiras (28,9%) com o diagnóstico clínico da SLF/LFL dentre as 45 estudadas, representando 4,6% de todas as mutações já descritas na literatura.
- A taxa de detecção de mutações nas famílias que preenchiam os critérios clássicos da SLF foi de apenas 11% (1/9), valor menor do que o relatado na literatura (50 a 70%).
- As mutações germinativas no gene *TP53* encontradas nas famílias com diagnóstico clínico de LFL deste estudo aumentam em 10,2% o número de todas as famílias LFL com a mutação detectada descritas no banco de dados do IARC. Verificou-se a alta incidência de mutações nas famílias que preencheram os critérios de Birch (41,8%) e os critérios de de Eeles (31,8%).
- Todas as 13 mutações germinativas encontradas eram transições de G para A, sendo que 12 (91,7%) eram do tipo *missense* e uma em sítio doador de *splicing* do íntron 6.
- A mutação no códon 245 (G245S) foi detectada em duas famílias distintas e não relacionadas. Quatro outras famílias avaliadas apresentaram mutações distintas nos códons 173 (V173M), 197 (V197M), 213 (R213Q) e 244 (G244D).

- Uma mutação específica, R337H, foi detectada em taxas elevadas nas famílias brasileiras com LFL, representando 46% (6/13) de todas as mutações detectadas e 5,1% de todas as mutações já descritas em famílias LFL. As famílias acometidas pela mutação R337H apresentaram amplo espectro tumoral em diversas idades, demonstrando que esta mutação não está relacionada somente ao desenvolvimento de tumores adrenocorticais na infância, mas também com o desenvolvimento dos múltiplos tumores envolvidos na síndrome.
- As famílias brasileiras portadoras da SLF e LFL apresentaram tumores incomuns ao espectro tumoral desta síndrome. A ocorrência de carcinomas papilíferos de tireóide e carcinomas de células renais, tumores pouco frequentes na SLF e LFL, e de tumores de papila duodenal e mola hidatiforme, nunca antes relacionados como parte do espectro, foram descritos nas famílias brasileiras, indicando a necessidade de inclusão destes tumores como foco no rastreamento dessas lesões.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ateenyi-Agaba C, Dai M, Le Calvez F, et al. TP53 mutations in squamous-cell carcinomas of the conjunctiva: evidence for UV-induced mutagenesis. **Mutagenesis** 2004; 19:399-401.

Attwooll CL, McGown G, Thorncroft M, et al. Identification of a rare polymorphism in the human TP53 promoter. **Cancer Genet Cytogenet** 2002; 135:165-72.

Beckman G, Birgander R, Sjalander A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? **Hum Hered** 1994; 44:266-70.

Bell DW, Varley JM, Szydlo TE, et al. Heterozygous germ line hCHK2 mutations in Li-Fraumeni syndrome. **Science** 1999; 286:2528-31.

Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. **Cancer Cell** 2003; 3:387-402.

Birch JM, Blair V. Increase in childhood carcinomas in Northwest England [Letter]. **Lancet** 1988; 1:833.

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

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

Black D, Bogomolny F, Robson ME, et al. Evaluation of germline PTEN mutations in endometrial cancer patients. **Gynecol Oncol**. 2005 Jan;96(1):21-4.

Borresen AL, Andersen TI, Garber J, et al. Screening for germ line TP53 mutations in breast cancer patients. **Cancer Res** 1992; 52:3234-6.

Bougeard G, Brugieres L, Chompret A, et al. Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene. **Oncogene** 2003; 22:840-6.

Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risks in BRCA2 mutation carriers. **J Natl Cancer Inst** 1999 91:1310-6.

Brownstein MH, Wolf M, Bikowski JB. Cowden's disease: a cutaneous marker of breast cancer. **Cancer** 1978; 41:2393-8.

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

Chompret A. The Li-Fraumeni syndrome. **Biochimie** 2002; 84:75-82.

Cornelis RS, van Vliet M, van de Vijver MJ, et al. Three germline mutations in the TP53 gene. **Hum Mutat** 1997; 9:157-63.

Coura R dos S, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. **Arq Gastroenterol**. 2005 Apr-Jun;42(2):99-106. Epub 2005 Aug 24.

Crawford LV, Pim DC, Gurney EG, Goodfellow P, Taylor-Papadimitriou J. Detection of a common feature in several human tumor cell lines-a 53,000-dalton protein. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1981; 78:41-5.

Diller L, Sexsmith E, Gottlieb A, Li FP, Malkin D. Germline p53 mutations are frequently detected in young children with rhabdomyosarcoma. **J Clin Invest** 1995; 95:1606-11.

Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. **Nature** 1992; 356:215-21.

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

Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene in breast and other cancers. Londres; 2000. [PhD Thesis-University of London].

English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells: granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. **J Immunol Methods** 1974; 5:249-52.

Ensenauer RE, Michels VV, Reinke SS. Genetic testing: practical, ethical, and conseling considerations. **Mayo Clin Proc.** 2005 Jan;80(1):63-73.

Felix CA, Slave I, Dunn M, et al. p53 gene mutations in pediatric brain tumors. **Med Pediatr Oncol** 1995; 25:431-6.

Fernandez-Plaza S, Sevilla J, Contra T, Martin N, Madero L. Acute leukemia in patients with Down syndrome. **An Pediatr (Barc).** 2004 Dec;61(6):515-9.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of Adrenocortical Tumors Associated with the Germline TP53 R337H Mutation. **J Med Genet** 2005; 43:91-6. Epub 2005 Jul 20.

Finlay CA, Hinds PW, Levine AJ. The p53 proto-oncogene can act as a suppressor of transformation. **Cell.** 1989 Jun 30;57(7):1083-93.

Fischer-Maliszewska L, Kazanowska B, Kusnierczyk P, et al. Is p53 intronic variant G13964C associated with predisposition to cancer? **J Appl Genet** 2003; 44:547-52.

Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C, et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. **Bull Cancer** 2001; 88:581-7.

Goldacre MJ, Wotton CJ, Seagroatt V, Yeates D. Cancers and immune related diseases associated with Down's syndrome: a record linkage study. **Arch Dis Child**. 2004 Nov;89(11):1014-7.

Hainaut P. The tumor suppressor protein p53: a receptor to genotoxic stress that controls cell growth and survival. **Curr Opin Oncol** 1995; 7:76-82.

Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. **Adv Cancer Res** 2000; 77:82-137.

Harris N, Brill E, Shohat O, et al. Molecular basis for heterogeneity of the human p53 protein. **Mol Cell Biol** 1986; 6:4650-6.

Hartley AL, Birch JM, Kelsey AM, Marsden HB, Harris M, Teare MD. Are germ cell tumors part of the Li-Fraumeni cancer family syndrome? **Cancer Genet Cytogenet** 1989; 42:221-6.

Hemminky K, Eng C. Clinical genetic counselling for familial cancers requires reliable data on familial cancer risks and general action plans. **J Med Genet** 2004 Nov;41(11):801-7.

Hillebrandt S, Streffer C, Demidchik EP, Biko J, Reiners C. Polymorphisms in the p53 gene in thyroid tumours and blood samples of children from areas in Belarus. **Mutat Res** 1997; 381:201-7.

Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst** 1998; 90:606-11.

Horio Y, Suzuki H, Ueda R, et al. Predominantly tumor-limited expression of a mutant allele in a Japanese family carrying a germline p53 mutation. **Oncogene** 1994; 9:1231-5.

Ingvarsson S, Sigbjornsdottir BI, Huiping C, et al. Mutation analysis of the CHK2 gene in breast carcinoma and other cancers. **Breast Cancer Res** 2002; 4:R4.

Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:8424-9.

Khayat CM, Johnston DL. Rhabdomyosarcoma, osteosarcoma, and adrenocortical carcinoma in a child with a germline p53 mutation. **Pediatr Blood Cancer** 2004; 43:683-6.

Kim IJ, Kang HC, Shin Y, et al. A TP53-truncating germline mutation (E287X) in a family with characteristics of both hereditary diffuse gastric cancer and Li-Fraumeni syndrome. **J Hum Genet** 2004; 49:591-5.

King P, Craft AW, Malcolm AJ. p53 expression in three separate tumours from a patient with Li-Fraumeni's syndrome. **J Clin Pathol** 1993; 46:676-7.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 1971; 68:820-3.

Kristensen P, Andersen A, Irgens LM, Bye AS, Sundheim L. Cancer in offspring of parents engaged in agricultural activities in Norway: incidence and risk factors in the farm environment. **Int J Cancer** 1996; 65:39-50.

Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. **Nature** 1979 Mar 15;278(5701):261-3.

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

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.

Lazar V, Hazard F, Bertin F, Janin N, Bellet D, Bressac B. Simple sequence repeat polymorphism within the p53 gene. **Oncogene** 1993; 8:1703-5.

Le Bihan C, Moutou C, Brugieres L, Feunteun J, Bonaiti-Pellie C. ARCAD: a method for estimating age-dependent disease risk associated with mutation carrier status from family data. **Genet Epidemiol** 1995; 12:13-25.

Leach MO, Boggis CR, Dixon AK, et al. MARIBS study group. Screening with magnetic resonance imaging and mammography of a UK population at high familial risk of breast cancer: a prospective multicentre cohort study (MARIBS). **Lancet** 2005; 365:1769-78.

Lee SB, Kim SH, Bell DW, et al. Destabilization of CHK2 by a missense mutation associated with Li-Fraumeni Syndrome. **Cancer Res** 2001; 61:8062-7.

Lehman TA, Haffty BG, Carbone CJ, et al. Elevated frequency and functional activity of a specific germ-line p53 intron mutation in familial breast cancer. **Cancer Res** 2000; 60:1062-9.

Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell** 1997; 88:323-31.

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

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

Li YJ, Sanson M, Hoang-Xuan K, et al. Incidence of germ-line p53 mutations in patients with gliomas. **Int J Cancer** 1995; 64:383-7.

Lynch PM. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC): clinical application of molecular diagnostic testing. **Ann Med** 1994 Jun;26(3):221-8.

Lynch HT, Tinley ST, Lynch JF, Attard TM. Challenging pedigrees seen in a hereditary cancer consultation center. **Cancer Genet Cytogenet.** 2004 Sep;153(2):91-101.

Limacher JM, Frebourg T, Natarajan-Ame S, Bergerat JP. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. **Int J Cancer** 2001; 96:238-42.

MacGeoch C, Turner G, Bobrow LG, Barnes DM, Bishop DT, Spurr NK. Heterogeneity in Li-Fraumeni families: p53 mutation analysis and immunohistochemical staining. **J Med Genet** 1995; 32:186-90.

Malheiros APR, Teixeira MG, Habr-Gama A, Alcantara PSM. Resultados do tratamento cirúrgico do câncer colo-retal em doentes de idade até 64 anos e de 65 anos ou mais. **Rev bras Coloproct**, 2005;25(2):128-136.

McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, et al. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. **J Clin Oncol** 1994; 12:925-30.

May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene** 1999; 18:7621-36.

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

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

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

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2005: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2005.

Moll UM, Petrenko O. The MDM2-p53 interaction. **Mol Cancer Res** 2003;1:1001-8.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. Practice guidelines: genetics/familial high risk cancer. **Oncology** 1999; 13:161-86.

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.

Nutting C, Camplejohn RS, Gilchrist R, et al. A patient with 17 primary tumours and a germ line mutation in TP53: tumour induction by adjuvant therapy? **Clin Oncol (R Coll Radiol)** 2000; 12:300-4.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. **Thompson e Thompson genética médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Oliveira C, Ferreira P, Nabais S, et al. E-Cadherin (CDH1) and p53 rather than SMAD4 and Caspase-10 germline mutations contribute to genetic predisposition in Portuguese gastric cancer patients. **Eur J Cancer** 2004; 40:1897-903.

Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. **Hum Mutat** 2002; 19:607-14.

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

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, et al. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. 2004 Oct;48(5):647-50. Epub 2005 Mar 7.

Pleasant LM, Hansen MF. Identification of a polymorphism in intron 2 of the p53 gene. **Hum Genet** 1994; 93:607-8.

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

Reich NC, Levine AJ. Specific interaction of the SV40 T antigen-cellular p53 protein complex with SV40 DNA. **Virology** 1982 Feb;117(1):286-90.

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.

Rocha JCC, Vargas FR, Aschton-Prolla P. **Câncer familiar**. Elaboração Final: 13 de Agosto de 2001. Disponível em: <URL:

[http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto\\_diretrizes/027.pdf](http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/027.pdf)> [2005 nov 12].

Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:555-61.

Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997; 82:2027-3

Satge D, Sasco AJ. Breast screening guidelines should be adapted in Down's syndrome. **BMJ** 2002; 324:1155.

Schneider KA, Li F. Li-Fraumeni Syndrome. In: GeneReviews at GeneTests: Medical Genetics Information Resource. (Updated 12 October 2004). (database online). Copyright, University of Washington, Seattle. 1997-2005. Available from:<URL:<http://www.genetests.org>. Accessed [2005 Oct 27].

Siddiqui R, Onel K, Facio F, et al. The TP53 mutational spectrum and frequency of CHEK2\*1100delC in Li-Fraumeni-like kindreds. **Fam Cancer** 2005; 4:177-81.

Sjalander A, Birgander R, Saha N, Beckman L, Beckman G. p53 polymorphisms and haplotypes show distinct differences between major ethnic groups. **Hum Hered** 1996; 46:41-8.

Sodha N, Houlston RS, Bullock S, et al. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat** 2002; 20:460-2.

Suthers G, Armstrong J, McCormack J, Trott D. Letting the family know: balancing ethics and effectiveness when notifying relatives about genetic testing for a familial disorder. **J Med Genet** 2005 Dec 21; Epub ahead of print.

Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. **Nature** 1990; 348:747-9.

Starink TM, van der Veen JP, Arwert F, et al. The Cowden syndrome: a clinical and genetic study in 21 patients. **Clin Genet** 1986; 29:222-33.

Stewart BW, Kleihues P. World Cancer Report.2003 **IARC Press**. Lyon. p.198-2002.

Sul J, Yu GP, Lu QY, et al. P53 Codon 72 polymorphisms: A case-control study of gastric cancer and potential interactions. **Cancer Lett** 2005 Aug 17; [Epub ahead of print]

Thomas M, Kalita A, Labrecque S, Pim D, Banks L, Matlashewski G. Two polymorphic variants of wild-type p53 differ biochemically and biologically. **Mol Cell Biol** 1999; 19:1092-100.

Thull DL, Vogel VG. Recognition and management of hereditary breast cancer syndromes. **Oncologist** 2004; 9:13-24.

Vahteristo P, Tamminen A, Karvinen P, et al. p53, CHK2, and CHK1 genes in Finnish families with Li-Fraumeni syndrome: further evidence of CHK2 in inherited cancer predisposition. **Cancer Res** 2001; 61:5718-22.

Vahteristo P, Bartkova J, Eerola H, et al. A CHEK2 genetic variant contributing to a substantial fraction of familial breast cancer. **Am J Hum Genet** 2002; 71:432-8.

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

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

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

Varley J. TP53, hChk2, and the Li-Fraumeni syndrome. **Methods Mol Biol** 2003b; 222:117-29.

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

Xu Y, Yao L, Ouyang T, et al. p53 Codon 72 polymorphism predicts the pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7328-33.

***ANEXOS***

---

**Anexo 1** Artigo original em periódico: “Achatz MIW, Olivier, Vettore A, Hainaut P. Cancer letters, *in press*; MS. Ref. No: CAN-D-05-00532R1. (aceito em 22 dezembro de 2005).

**THE *TP53* MUTATION, R337H, IS ASSOCIATED WITH LI-FRAUMENI AND LI-FRAUMENI-LIKE SYNDROMES IN BRAZILIAN FAMILIES**

Maria Isabel Waddington Achatz<sup>1,2</sup>, Magali Olivier<sup>3</sup>, Florence Le Calvez<sup>3</sup>, Ghyslaine Martel-Planche<sup>3</sup>, Ademar Lopes<sup>4</sup>, Benedito Mauro Rossi<sup>4</sup>, Patricia Ashton-Prolla<sup>5-6</sup>, Roberto Giugliani<sup>5-6</sup>, Edenir Inez Palmero<sup>6</sup>, Fernando Regla Vargas<sup>7</sup>, José Claudio Casali Da Rocha<sup>2</sup>, Andre Luiz Vettore<sup>1</sup> and Pierre Hainaut<sup>3\*</sup>.

<sup>1</sup>Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil; <sup>2</sup>Department of Oncogenetics, Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Molecular Carcinogenesis Group, International Agency for Research on Cancer, Lyon, France; <sup>4</sup>Department of Pelvic Surgery, Hospital A.C. Camargo, São Paulo, Brazil; <sup>5</sup>Hospital das Clínicas, Porto Alegre, Brazil; <sup>6</sup>Department of Genetics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil; <sup>7</sup>Genetics Division, INCA, Rio de Janeiro, Brazil.

\*To whom requests for reprints should be addressed: P. Hainaut, Molecular Carcinogenesis Group, International Agency for Research on Cancer, 150 cours Albert Thomas, 69372 Lyon Cedex 08, France. Phone (33)-4-72 73 84 62; FAX (33)-4-72 73 83 22; E-mail : [hainaut@iarc.fr](mailto:hainaut@iarc.fr)

**Anexo 2** Artigo de revisão em periódico: “*TP53* gene and Li-Fraumeni syndrome”.  
Achatz MIW and Hainaut P. Applied Cancer Research 2005; 25(2):51-57.

# REVIEW ARTICLE

## TP53 Gene and Li-Fraumeni Syndrome

Maria Isabel Waddington Achatz,<sup>1</sup> MD; Pierre Hainaut,<sup>2</sup> PhD

<sup>1</sup> Department of Oncogenetics, A.C. Camargo Cancer Hospital – São Paulo, Brazil

<sup>2</sup> Chief of Molecular Carcinogenesis Cluster, International Agency for Research on Cancer - Lyon, France

### ABSTRACT

Cancer is a disease that strikes most families and its devastating effects bring suffering and instability to both patient and family. Clustering of cancers in certain families is even more devastating, leading medicine to study its origin and ways to prevent it. Many cancer syndromes have been identified due to the repeated occurrence of specific tumors over a certain age-range. The rare cancer predisposition Li-Fraumeni syndrome (OMIM #151623; LFS) is transmitted in an autosomal dominant pattern, which predisposes affected individuals to an increased risk of developing a variety of cancers at an early age, including childhood. The most characteristic forms of cancers in LFS include soft-tissue sarcoma, breast cancers, brain tumors, and adrenocortical carcinomas. LFS is a dominantly inherited syndrome, frequently associated with germline mutations in the *TP53* gene (OMIM #191170), which encodes protein p53. This protein regulates cell cycle, apoptosis, DNA repair, differentiation, senescence and development. Activation of p53 prevents DNA replication and cell proliferation when cells are subjected to stress that may disturb genetic or genomic integrity. Thus, *TP53* acts as a major tumor suppressor gene by exerting simultaneous control on many components of the molecular mechanisms of carcinogenesis. Loss of p53 function may favor cancer development and explains predisposition in germline *TP53* mutation carriers. This review will discuss the main characteristics of *TP53*, its regulation, the consequences of its inactivation in cancer, the germline *TP53* mutation related to Li-Fraumeni syndrome and strategies for surveillance.

**Key words:** Li-Fraumeni syndrome. Genes, *TP53*. Genes, p53.

### INTRODUCTION

Almost every form of cancer in humans has been reported to aggregate in families. The occurrence of cancer clustering in certain families is devastating, leading medicine to study its

origin and ways to prevent it. These familial clusters could be inheritable mutated cancer-susceptible gene, though other explanations include odds association and exposure to environmental carcinogens.<sup>1</sup> Cancer predisposition syndromes have been identified by the repeated occurrence of specific tumors over a certain age-range.

In recent years, advances on novel techniques of molecular genetics have located and mapped some cancer-predisposing genes, including the hereditary retinoblastoma (*Rb*) gene, *WT1* gene for Wilms' tumor, the *APC* gene of familial polyposis coli, *BRCA 1* and *2* for Familial Breast and Ovarian Cancer Syndrome and the *TP53* tumor suppressor gene in Li-Fraumeni syndrome.<sup>2</sup> Li-Fraumeni syndrome is an autosomal dominant disorder of multiple cancers that are difficult to treat and often lethal. This review discusses the main characteristics of *TP53*, its regulation, the consequences of its inactivation in cancer, the germline *TP53* mutation related to Li-Fraumeni syndrome and to the main perspectives in the cancer management.

### LI-FRAUMENI SYNDROME

In 1969, Li and Fraumeni reviewed medical files and death certificates from children with a histopathological diagnosis of

---

#### Correspondence

Maria Isabel Waddington Achatz

Department of Oncogenetics

A. C. Camargo Cancer Hospital

Rua Professor Antonio Prudente 211

01509-900 São Paulo, Brazil

Tel: 55 11 32725181 Fax: 55 11 32077001

E-mail: misabel@ludwig.org.br

rhabdomyosarcoma and found a high early onset cancer incidence among their relatives.<sup>3</sup> They presented different tumor types occurring over a wide age range, including childhood cancer. The first definition of the syndrome derived from Li and Fraumeni's work in 1988.<sup>4</sup> The Li-Fraumeni syndrome (LFS; OMIM# 151623) was then proposed as a cancer predisposition syndrome and it was subsequently confirmed by a series of epidemiological studies that detected a similar tumor pattern among family members.<sup>5,6</sup>

It was characterized by the incidence of a sarcoma, diagnosed before the age of 45 years, associated with the presence of other early onset tumors in first and second degree family members, which included breast cancers, brain tumors, and adrenocortical carcinomas (ADR) (Table 1). Other cancers, such as leukemia, lung cancer, skin melanoma, gastric, pancreatic, and prostate cancer were also described to be overexpressed in some families. In some cases, germcell tumors, choroid plexus papilloma, and Wilms' tumor have been reported as part of the spectrum. However, population-based data on tumor incidence in Li-Fraumeni families are still scarce and the exact spectrum of cancer diseases is still a matter of debate. A number of families present a tumor pattern that is reminiscent of LFS without matching the classical criteria and are termed Li-Fraumeni like (LFL)<sup>7</sup> (Table 2). Several definitions of LFL have been proposed (LFL-E1 and LFL-E2) (Table 3).<sup>8,9</sup>

**Table 1 - Clinical criteria for Li-Fraumeni syndrome**

Proband with a sarcoma diagnosed before 45 years of age AND
First degree relative with any cancer under 45 years of age AND
First- or second-degree relative with any cancer under 45 years or sarcoma at any age

**Table 2 - Clinical criteria for Li-Fraumeni Like syndrome (Birch)**

Proband with any childhood cancer or sarcoma, brain tumor, or adrenocortical tumor diagnosed before 45 years of age AND
First- or second-degree relative with a LFS cancer (sarcoma, breast cancer, brain tumor, adrenocortical tumor, or leukemia) at any age AND
First- or second-degree relative with any cancer under the age of 60

LFS is a highly penetrant cancer syndrome. A segregation analysis conducted on families with LFS revealed 50% increased chance to develop a tumor before 40-year old, compared to 1% of the general population. It has also demonstrated that 90% of the carriers might present a tumor at the age of 60.<sup>10</sup> Cancer patients in these families who survive the first neoplasm are prone to develop second cancers, particularly within the field of radiation therapy. The most common childhood cancers have been soft-tissue sarcomas in the first 5 years of life and osteosarcomas in adolescence. Acute leukemia and brain tumors also occur throughout childhood and young adulthood, whereas adrenocortical carcinomas occur primarily in infancy. In young adults, premenopausal breast cancer is, by far, the most common neoplasm.<sup>5</sup> Clinically, the entire range of cancers in the syndrome remains to be defined.

**Table 3 - Clinical criteria for Li-Fraumeni Like syndrome (Eeles)**

Eeles 1
Two different tumors that are part of extended LFS in first or second degree relatives at any age (sarcoma, breast cancer, brain tumor, leukemia, adrenocortical tumor, melanoma, prostate cancer, pancreatic cancer);
Eeles 2
Sarcoma at any age in the proband AND two of the following: (may be in the same individual)
Breast cancer at <50 years and/or brain tumor, leukemia, adrenocortical tumor, melanoma, prostate cancer, pancreatic cancer at <60 years or sarcoma at any age

The molecular basis of this familial alteration remained unknown until its connection to the *TP53* tumor suppressor gene. In 1990, five families who received a clinical diagnosis of the Li-Fraumeni syndrome were reported to show germline mutations in the *TP53* tumor suppressor gene.<sup>11</sup> Subsequent studies have found germline *TP53* mutations in many, but not all, Li-Fraumeni families.<sup>12</sup> The mutations typically cluster in sequences that code for the DNA binding domain of the p53 protein (see below). These sequences are also the most frequent sites for somatic *TP53* mutations in sporadic cancers. Failure to detect *TP53* mutations in some families with LFS could be due in part to the fact that mutations may occur outside the coding, "hotspot" regions, thus

escaping detection by standard methods. Another explanation is that the syndrome is genetically heterogeneous, with *TP53* mutations accounting for only a fraction of Li-Fraumeni families. Recent data show that 70% of LFS families are attributable to germline mutations in *TP53*, whereas 20% of LFL had a mutation detected.<sup>13</sup> So far 280 families have been identified as carriers of germline p53 mutations.<sup>14,15</sup> Despite intensive search, no other gene has been hitherto associated with LFS/LFL. Earlier reports that the *CHK2* gene may carry germline mutations have not been substantiated. These mutations are now considered as common polymorphisms that may be associated with predisposition to breast cancer.

### THE *TP53* GENE

The *TP53* tumor suppressor gene (chromosome 17p13; OMIM#191170) encodes a ubiquitous phosphoprotein involved in many overlapping cellular pathways that control cell proliferation and homeostasis, such as cell cycle, apoptosis, and DNA repair. The coding sequence contains five regions showing a high degree of conservation in vertebrates, and comprises 10 coding exons.<sup>16</sup> The gene contains a very long 5' region containing a non-coding exon 1 and intron 1 over about 10 kilobase pairs. *TP53* mutations appear to be an important alteration in the complex process of carcinogenesis being the most common site of somatic mutations in human cancers. Somatic *TP53* genetic alterations are frequent in a variety of human sporadic cancers, with frequencies varying from 10% to 60%, depending on the tumor type or population group. They are particularly frequent in cancers associated with exposure to environmental or occupational carcinogens (e.g. lung cancers in smokers, bladder cancers in exposed industry workers, among other events). Overall, the types and distribution of germline and somatic *TP53* mutations are very similar, with a majority of missense mutations in the DNA-binding domain encoded by exons 4 to 9 of the *TP53* gene.<sup>17</sup> Splice-site mutations, large deletions and complex insertion-deletion may also be found.<sup>18,19</sup> When present in the germline, *TP53* mutation is considered a first-hit in Knudson's two-mutation model of hereditary cancer

development. However, the fate of the remaining, wild-type allele during tumor development is poorly understood. In some instances, this wild-type allele is lost or mutated in cancers, fulfilling Knudson's paradigm. In other cases, this allele persists, but its biological activity seems to be extinguished, perhaps as the result of overexpression and stabilization of the product of the mutant allele. This hypothesis is supported by biological evidence showing that accumulation of mutant p53 protein can inactivate wild-type p53 in a dominant-negative manner. There is emerging evidence that the nature and position of the germline mutation in *TP53* may, to some degree, determine cancer phenotypes in affected carriers. For example, mutations in a specific region of the DNA binding domain encoding protein loops in direct contact with DNA seems to carry a significantly higher predisposition to brain cancers. In contrast, mutations that predispose to adrenal cortical tumors are frequently located outside of the major "hotspots" area. Moreover, it is most likely that other, still unknown genes may act as modifiers, explaining the variations in tumor patterns.

Recently, a specific germline mutation falling into exon 10, encoding the oligomerization domain of p53, R337H (CGC to CAC at codon 337), has been reported in Brazilian children with ADR but no documented familial history of other cancers.<sup>20,21</sup> Structural and functional studies have identified that R337H mutant proteins had a pH-dependent defect in the oligomerization domain, making them inactive only in conditions of increased intracellular pH. It was postulated that arginine 337 is located in the dimerization motif of the p53 protein. Its replacement by histidine alters hydrogen bonding between two p53 monomers and hampers dimerization in a pH-dependent manner. At pH 7, the histidine is protonated and participates in hydrogen bonding. At pH 8, however, the histidine is deprotonated, preventing formation of the hydrogen bond.<sup>22</sup> This would result in disruption of p53 oligomers and inactivation of its binding ability capacity to bind with high affinity to p53-response elements in the regulatory regions of p53-target genes. The unusual prevalence of this mutation in Brazilian families appears to be due to a founder effect.

This observation has led to the speculation that R337H may predispose to cancer development only in tissues in which a rise in intracellular pH is a major growth or survival regulatory signal. Such a rise in pH occurs in apoptotic cells and may play a role in the extensive tissue remodeling that occurs through selective apoptosis in adrenal cortical glands during pre- and post-natal development. It was postulated that this conditional mutant might only predispose to a narrow spectrum of cancers within the LFS spectrum. However, so far no studies have reported whether this mutant is also present in families that match LFS or LFL definitions. Interestingly, the same mutant has been described in a British family matching LFS/LF criteria.

Over 15 polymorphisms are identified in human population, with allele frequencies that vary with ethnic origin.<sup>23</sup> One of them affects the coding sequence at codon 72, specifying either an arginine or a proline. The Arg allele is the most common in the western population (allele frequencies ranging from 0.6 to 0.8) but the prevalence of the Pro allele seems to increase according to a North-South gradient, so that the Pro allele is the most frequent one near the equator and in indigenous populations of the Southern hemisphere.<sup>24</sup> Increasing evidence states that this polymorphism may have a functional impact on cancer susceptibility and response to therapy.<sup>25</sup> Two genes related to *TP53* have been identified on chromosome 1p36 (*TP73*, OMIM 601990) and on chromosome 3p28

(*TP63*, OMIM 603273). Both genes encode proteins with high homology to p53 in terms of overall structure.<sup>26</sup> To date, no association has been found between these genes and familial cancer.

### P53 PROTEIN

After 25 years since first described, the p53 protein has been shown to play a key role in both tumor suppression and aging and it has been one of the main targets on molecular cancer research. The p53 protein is a transcription factor constitutively expressed in most cell types and tissues and activated in response to various stress signals, in particular genotoxic stress. Due to its rapid turnover (5-20 minutes) the protein does not accumulate unless it is stabilized in response to a variety of intracellular and extracellular stimuli.

Signals that activate p53 include diverse types of DNA damage (strand breaks, bulky adducts, oxidation of bases), blockade of RNA elongation, hypoxia, depletion of microtubules, ribonucleotides or growth factors, modulation of cell adhesion and alteration of polyamine metabolism.<sup>27</sup> Oncogenic, genotoxic, and non-genotoxic stress interact with main p53 co-factors. The main regulator of p53 protein activity is Mdm-2, a transcriptional target of p53. The p53/Mdm-2 complex is regulated by p14<sup>Arf</sup> (Alternative Reading Frame), a 14 kD protein encoded by an alternative reading frame of *CDKN2A*, the gene that encodes the

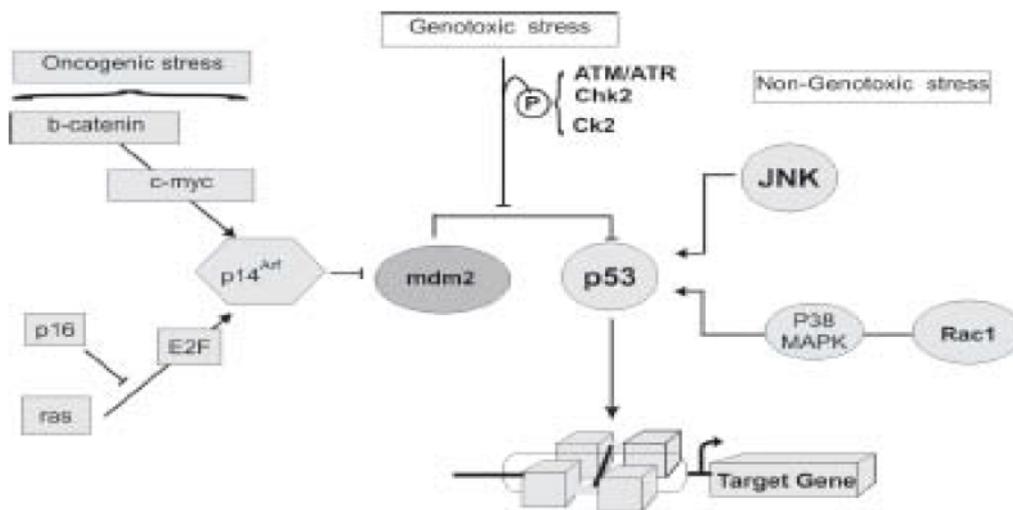


Figure 1 - Pathways of p53 activation

tumor suppressor *p16* (Figure 1).

Once activated, p53 exerts its effects through two major mechanisms: transcriptional control (activation or repression of specific genes) and interference with the function of other protein through complex formation. Over 4800 genes have been identified as containing a p53-response element in regulatory regions.<sup>28</sup> At the cellular level, activation of p53 generally induces either cell-cycle arrest (mostly in G1 and/or G2/M) or apoptosis. However, it must be realized that apoptosis is the preferential response in primary cells and that when cell-cycle arrest is induced, it is generally a permanent one, followed by cell senescence.<sup>29</sup> In other words, activation of p53 in a normal cell generally results in its permanent deletion from the pool of cells with proliferative capacity, providing a drastic way for suppressing any cell that carries a risk of oncogenic transformation.

These functional and biological features provide a rationale to understand the consequences of inheritance of a germline *TP53* mutation. Subjects with only one functional *TP53* allele are at high risk of developing multiple cancers when the remaining allele becomes inactivated by various mechanisms. Loss of p53 function would then create a form of "mutator phenotype", allowing cells to replicate damaged DNA and accelerating their progression towards cancer.

## SURVEILLANCE

Both patients with clinical diagnosis of LFS/LFL and *TP53* carriers should be advised to seek early medical attention for signs and symptoms of cancer. There are no established surveillance measures or widely agreed guidelines for mutation screening and management of LFS/LFL patients but surveillance strategies have been suggested for individuals at risk.<sup>30</sup> Patients should be aware of the limitations of screening for many cancers associated with the syndrome. Breast cancer is the most common tumor found in women with LFL/LFS and breast monitoring has been shown to be effective in reducing morbidity or mortality among individuals at risk. Training and education in breast self-exam should be addressed at age 18. Regular semiannual clinical breast exams should be performed starting at

age 20 to 25, or 10 years before the earliest known breast cancer in the family; or yearly since younger age. Routine annual mammograms and mammary ultrasounds should begin in women over age 25 years, but have not been proven to be beneficial for younger women with LFS/LFL.<sup>31</sup> Controversy exists regarding the use of routine mammograms because of possible radiation sensitivity associated with *TP53* mutations.<sup>32</sup> A specialist on a case-by-case basis should address other investigational breast imaging possibilities such as MRI, as well as shorter intervals.

Furthermore, LFS/LFL patients and their possible carriers must receive targeted surveillance based on individual family histories. Due to the multitude of tumors that are included in the syndrome, patients should be educated regarding signs and symptoms of cancer and complaints should be thoroughly investigated. Annual comprehensive physical exam starting in younger adults with suspicion for rare tumors and second malignancies in cancer survivors should be addressed. Additional organ-targeted surveillance based on family history is of great value, such as colonoscopies at regular intervals if a relative has had colorectal cancer. Full-body MRI examination or PET scan has been suggested. However, no evidence supporting the benefit of such testing exists and it is possible that it may lead to unnecessary biopsies or other follow-up tests. Perhaps most importantly, at-risk individuals and their physicians are urged to pay greater attention to lingering symptoms and illnesses, particularly headaches, bone pain, or abdominal discomfort, and to schedule diagnostic tests promptly.

Patients should receive genetic counseling and advice about risk to relatives and possibility of genetic testing. In 1992, an International Consortium of clinicians and researchers convened and developed recommendations regarding genetic testing for germline *TP53* mutations.<sup>6</sup> These recommendations state that testing should be done voluntarily with appropriate pre- and post-test.

For at-risk children, pediatricians should be warned about the syndrome and apprised of the risk of childhood cancer in affected families. They must be evaluated on annual complete physical examination and an additional

organ-targeted surveillance based on family history should be considered.<sup>30</sup>

Individuals with *TP53* mutations should avoid or minimize exposure to radiation whenever possible.<sup>33</sup> The *TP53* gene is recognized as playing a crucial role in genomic repair.<sup>34</sup> *TP53*-deficient mice are prone to early formation of multiple, spontaneous cancers and p53-deficient mouse cells have been shown to be radiation sensitive and prone to cancer.<sup>35</sup> Radiation-induced second malignancies have been reported among individuals with *TP53* mutations.<sup>36-38</sup> A high incidence of exposure to genotoxic agents, such as pesticides, has been reported in some families but to date, no correlation has been established.<sup>17</sup>

## CONCLUSION

After 25 years of research and over 30 000 publications, studies on *TP53* have had a major impact on our understanding on cancer molecular biology. The challenge for the years to come is to turn this knowledge into advances in cancer prevention, detection, prognosis and therapy. New discoveries about the function and control of p53 continue to emerge every month and attempts to exploit the system to develop better therapeutics and diagnostics are beginning to be successful in clinics. Current understanding of LiFraumeni syndrome and its association with germline *p53* mutations is incomplete. Additional studies are needed for cancer spectrum in the syndrome, the role of environmental carcinogens in cancer development among family members, possible genetic heterogeneity and other methods, age-specific penetrance of the mutant gene, and rare p53 polymorphisms that might be mistaken for functional mutations.

## REFERENCES

1. Knudson AG, Jr. Hereditary cancers disclose a class of cancer genes. *Cancer* 1989; 63:1888-91.
2. Weinberg RA. Tumor suppressor genes. *Science* 1991; 254:1138-46.
3. Li FP, Fraumeni JF, Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43:1365-73.
4. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 1988; 48:5358-62.
5. Strong LC. Hereditary Cancer: Lessons from Li-

- Fraumeni Syndrome *Gynecologic Oncology* 2003; 88:S4-7.
6. Li FP, Garber JE, Friend SH, Strong LC, Patenaude AF, Fraumeni JF, Jr, et al. Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84:1156-60.
7. Birch JM. Germ-line mutations in the p53 tumour suppressor gene: scientific, clinical and ethical challenges. *Br J Cancer* 1992; 66:424-6.
8. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res* 1994; 54:1298-304.
9. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv* 1995; 25:101-24.
10. Lustbader ED, Williams WR, Bondy ML, Strom S, Strong LC. Segregation analysis of cancer in families of childhood soft-tissue- sarcoma patients. *Am J Hum Genet* 1992; 51:344-56.
11. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF, Jr, Nelson CE, Kim DH, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250:1233-8.
12. Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K. Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 1990; 348:747-9.
13. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 Mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49-53.
14. Hainaut P, Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. *Adv Cancer Res* 2000; 77:82-137.
15. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: new online mutation analysis and recommendations to users. *Hum Mutat* 2002; 19:607-14.
16. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene* 1999; 18:7621-36.
17. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, Ohgaki H, Kleihues P, Hainaut P, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63:6643-50.
18. Varley JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 2003; 21:313-20.
19. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, et al. Germline mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. *Cancer Res* 1997; 57:3245-52.
20. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, 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 Metabol* 2001; 86:4970-3.
21. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, 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.
22. DiGiannarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 2002; 9:12-6.
23. [IARC] International Agency for Research on Cancer. Functional properties of p53 mutant proteins. Available at: <http://www-p53.iarc.fr/p53MUTfunction.html>. Accessed June 30, 2005.

24. Beckman G, Birgander R, Sjalander A, Saha N, Holmberg PA, Kivela A, et al. Is p53 polymorphism maintained by natural selection? *Hum Hered* 1994; 44:266-70.
25. Bergamaschi D, Gasco M, Hiller L, Sullivan A, Syed N, Trigianti G, et al. p53 polymorphism influences response in cancer chemotherapy via modulation of p73-dependent apoptosis. *Cancer Cell* 2003; 3:387-402.
26. Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res* 2004; 2:371-86.
27. Pluquet O, Hainaut P. Genotoxic and non-genotoxic pathways of p53 induction. *Cancer Lett* 2001; 174:1-15.
28. Wang L, Wu Q, Qiu P, Mirza A, McGuirk M, Kirschmeier P, et al. Analyses of p53 target genes in the human genome by bioinformatic and microarray approaches. *J Biol Chem* 2001; 276:43604-10.
29. Linke SP, Clarkin KC, Wahl G. Mp53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 1997; 57:1171-9.
30. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome-a molecular and clinical review. *Br J Cancer* 1997; 76:1-14.
31. [NCCN] National Comprehensive Cancer Network. Practice guidelines: genetics/familial high risk cancer. *Oncology* 1999;13:161-86.
32. Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. *Annu Rev Med* 2001; 52:371-400.
33. Varley J. TP53, hChk2, and the Li-Fraumeni syndrome. *Methods Mol Biol* 2003; 22:117-29.
34. Wilson JW, Pritchard DM, Hickman JA, Potten CS. Radiation-induced p53 and 21WAF-1/CIP1 expression in the murine intestinal epithelium: apoptosis and cell cycle arrest. *Am J Pathol* 1998; 153:899-909.
35. Dumble ML, Donehower LA, Lu X. Generation and characterization of p53 mutant mice. *Methods Mol Biol* 2003; 234:29-49.
36. Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF, Jr, Li FP. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90:606-11.
37. Linke SP, Clarkin KC, Wahl GM. p53 mediates permanent arrest over multiple cell cycles in response to gamma-irradiation. *Cancer Res* 1997; 57:1171-9.
38. Limacher JM, Frebourg T, Natarajan-Ame S, Bergerat JP. Two metachronous tumors in the radiotherapy fields of a patient with Li-Fraumeni syndrome. *Int J Cancer* 2001; 96:238-42.

**Anexo 3** Capítulo de livro: “Síndrome de Li-Fraumeni”. Organizadores: Carlos Gil Ferreira e José Cláudio Rocha. In: Oncologia Molecular (ISBN: 85-7379-692-8). Editora Atheneu, 2004. 2005).

# Síndromes de Câncer Hereditário

## 29.1 Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários

Simone Noronha da Silva

### INTRODUÇÃO

Dentre todos os casos de câncer de mama, cerca de 10 a 20% dos tumores são hereditários. O *BRCA1* e o *BRCA2* são genes supressores de tumor descritos como causadores da síndrome do câncer de mama e ovário hereditários (SMOH). Além deles, acredita-se que existam outros genes envolvidos na etiologia da SMOH, pois uma percentagem das famílias com diagnóstico clínico presuntivo da síndrome não apresenta mutações no *BRCA1* ou *BRCA2*.

O reconhecimento de grupos de alto risco é fundamental para que estratégias de rastreamento, diagnóstico precoce e prevenção possam ser desenvolvidas e oferecidas a estas famílias. Mulheres portadoras de mutações no *BRCA1* e *BRCA2* têm um altíssimo risco de desenvolverem câncer de mama e de ovário. Homens portadores de mutações no *BRCA2* possuem um risco aumentado de desenvolverem câncer de mama e de próstata em idade jovem<sup>2,8</sup>. Descreve-se também um aumento da incidência de outros tumores nas famílias com mutações no *BRCA2* como melanoma e câncer de pâncreas<sup>3</sup>. Assim, as famílias de alto risco necessitam de programas de rastreamento e prevenção específicos, conforme descrito na Tabela 29.1.1.

### DEFINIÇÃO DA SÍNDROME DE CÂNCER DE MAMA E OVÁRIO HEREDITÁRIOS (SMOH)

A definição de SMOH varia de instituição para instituição. De acordo com a NCCN (*National Comprehensive Cancer Network*), disponível na Internet no site [http://www.nccn.org/physician\\_gls/f\\_guidelines.html](http://www.nccn.org/physician_gls/f_guidelines.html), os critérios para diagnóstico presuntivo da síndrome são os seguintes:

- Membro de uma família com diagnóstico de certeza de SMOH.
- História pessoal de câncer de mama e mais uma das características abaixo:
  - Diagnóstico com menos de 40 anos, com ou sem história familiar.
  - Diagnóstico com menos de 50 anos, com um parente próximo com câncer de mama ou câncer de ovário.
  - Diagnóstico em qualquer idade, com pelo menos dois parentes próximos com câncer de ovário em qualquer idade ou câncer de mama especialmente se um dos casos for diagnosticado antes dos 50 anos ou se o tumor for bilateral.
  - Diagnóstico de câncer de mama masculino em um parente próximo.
  - História pessoal de câncer de ovário.

Tabela 29.1.1

Recomendações para Famílias Portadoras da Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários<sup>13</sup>.

Orientação quanto ao teste genético e risco familiar.  
 Auto-exame das mamas a partir dos 18 anos.  
 Exame médico semestral a partir dos 20 anos (exame das mamas).  
 Mamografia a partir dos 25 anos (anual ou semestral).  
 Rastreamento anual para câncer de ovário a partir dos 30 anos.  
 Orientação quanto medidas preventivas (mastectomia profilática, ooforectomia profilática, tamoxifeno).  
 Orientação quanto ao exame das mamas em homens.  
 Rastreamento precoce para câncer de próstata.

- Se for descendente de Judeus Ashkenazi com diagnóstico antes dos 50 anos, mesmo sem história familiar; ou em qualquer idade se houver história de câncer de mama e ovário em parentes próximos.
- História pessoal de câncer de ovário e mais uma das características abaixo:
  - Um ou mais parentes próximos com câncer de ovário.
  - Um ou mais parentes próximos com câncer de mama com menos de 50 anos ou com tumor bilateral.
  - Dois ou mais parentes próximos com câncer de mama.
  - Um ou mais casos de câncer de mama em homens.
- Caso seja descendente de Judeus Ashkenazi, não é necessária história familiar.
- História pessoal de câncer de mama em homem e mais uma das características abaixo:
  - Um ou mais parente próximo com câncer de mama (homem ou mulher).
  - Um ou mais parente próximo com câncer de ovário.
- Caso seja descendente de Judeus Ashkenazi, não é necessária história familiar.
- Apenas história familiar:
  - Um ou mais parentes próximos que preenchem os critérios acima.

Nesta classificação, considera-se como parentes próximos os parentes de primeiro, segundo e terceiro grau e deve-se levar em conta sempre o mesmo lado da família (materna ou paterna). Como os critérios são muito abrangentes, uma análise cuidadosa da história familiar deve ser feita para se reduzir o número de casos com diagnóstico falso-positivo.

### CARACTERÍSTICAS E FUNÇÃO DOS GENES *BRCA1* E *BRCA2*

O gene *BRCA1* está localizado no cromossomo 17, sendo um gene grande que contém uma região codificadora com 5.592 pares de bases. O gene *BRCA2* está localizado no cromossomo 13, e é maior ainda que o *BRCA1*, tendo uma região codificadora com 10.254 pares de bases.

A função dos genes *BRCA1* e *BRCA2* ainda não é completamente conhecida. Sabe-se que o *BRCA1* participa do processo de proliferação das células epiteliais de mamíferos em resposta à estimulação hormonal, no processo de apoptose, controle da recombinação e manutenção da integridade do genoma após ligar-se com proteínas relacionadas a es-

tas atividades. Há evidências da interação da proteína *BRCA1* com o Rad51, que estaria relacionado com a função de manter a integridade do genoma celular<sup>17</sup>.

O gene *BRCA2* atua como um supressor de tumores com atividades relacionadas à ativação da transcrição assim como envolvimento no sistema de reparo do DNA<sup>17</sup>. A proteína *BRCA2* também interage com o Rad51 e a proteína Dss1. O complexo *BRCA2* e Dss1 se liga à hélice simples de DNA e isto pode ser a maneira de transportar o Rad51 até os pontos onde haja defeitos no DNA<sup>16</sup>.

### MUTAÇÕES FUNDADORAS

Algumas mutações são altamente prevalentes em populações específicas, e são conhecidas como mutações fundadoras. Estas mutações ocorreram há muito tempo (talvez séculos) e se mantêm restritas até hoje a um determinado grupo étnico por motivos geográficos ou religiosos. Os judeus Ashkenazi são o melhor exemplo disto, e possuem três mutações fundadoras bem conhecidas que são 185 delAG e 538insC no *BRCA1* e 6174delT no *BRCA2*<sup>10</sup>, porém cerca de 20% destes indivíduos são portadores de outras mutações deletérias que não estas<sup>6</sup>. Na população holandesa, foram descritas três mutações fundadoras que são grandes deleções no *BRCA1*<sup>15</sup>. É interessante notar que grandes deleções ou translocações não são diagnosticadas pelo método de seqüenciamento, o que pode ser responsável pelo grande número de famílias com diagnóstico clínico de SMOH, porém sem a detecção de mutações no *BRCA1* ou *BRCA2*.

Quando se pesquisa a presença de mutações em um grupo étnico onde as mutações fundadoras são muito prevalentes, pode-se iniciar a pesquisa por elas para, em um segundo momento, caso não estejam presentes, fazer-se o estudo do restante do gene.

### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* apresentam características clínicas diversas, e estas características podem orientar por qual gene deve-se iniciar a pesquisa de mutações.

Mulheres portadoras de mutações no *BRCA1* têm o risco de 85% de desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos e 63% de risco de desenvolvimento de câncer de ová-

rio<sup>11,14</sup>. Os tumores causados por mutações no *BRCA1* apresentam uma maior incidência de receptores de estrógeno e progesterona negativos e p53 positivos<sup>12</sup>. Mulheres portadoras de mutações no gene *BRCA2* têm um risco de 85% de desenvolvimento de câncer de mama até os 70 anos e 27% de risco de desenvolvimento de câncer de ovário<sup>11,14</sup>. Homens portadores de mutações no gene *BRCA2* têm aumento de incidência de câncer de mama e estudos sugerem que também exista um aumento na incidência de câncer de próstata<sup>6,8</sup>. As mutações no *BRCA2* estão presentes em cerca de 10% das famílias com câncer de pâncreas hereditário, ou seja, famílias com pelo menos dois parentes de primeiro grau com câncer de pâncreas e que não preenchem os critérios para diagnóstico de outras síndromes hereditárias<sup>9</sup>.

Está descrito que há um efeito antecipatório no surgimento dos tumores relacionados à SMOH, ou seja, a cada geração os tumores tendem a surgir em idade mais jovem. Em alguns casos de famílias de alto risco, recomenda-se que os exames de rastreamento sejam iniciados dez anos antes do caso mais jovem de câncer que ocorreu na família, devido a este efeito antecipatório.

## ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético e a avaliação de risco são feitos baseados na história pessoal e familiar do indivíduo, e devem levar em conta não só dados referentes a tumores malignos porque algumas síndromes são caracterizadas por alterações benignas associadas às neoplasias.

Durante o processo de avaliação, alguns dados são sugestivos de que haja um componente hereditário na etiologia dos tumores em determinada família: casos de câncer de indivíduos jovens, vários casos de câncer na família, agrupa-

mento de tumores raros. Além disto, existem outras síndromes com alta incidência de câncer de mama que devem ser lembradas no momento da análise do caso. A Tabela 29.1.2 resume alguns destes diagnósticos diferenciais.

Durante o processo de aconselhamento genético e avaliação de risco, podemos estimar a probabilidade de um indivíduo ser portador de uma mutação deletéria ou de vir a desenvolver câncer através de modelos matemáticos. Alguns modelos como o modelo de Gail<sup>7</sup> e o modelo de Claus<sup>4</sup> foram desenhados para a estimativa do risco de desenvolvimento de câncer de mama. Já o BRCAPRO<sup>1</sup>, por exemplo, foi desenvolvido para estimar a probabilidade de que o indivíduo seja portador de uma mutação. Cada um destes modelos matemáticos tem suas limitações e vantagens, e por isto a avaliação do risco de cada indivíduo deve ser feita por um profissional que esteja familiarizado com eles e que possa decidir qual o melhor método a ser usado em cada caso. Além de modelos matemáticos, existem também tabelas com a prevalência de mutações em determinadas populações, que podem ajudar na estimativa da probabilidade de o indivíduo ser portador de uma mutação.

Indivíduos com alta possibilidade de serem portadores de mutações devem ser orientados quanto à possibilidade de realização do teste genético, seus riscos, benefícios e limitações. Indivíduos considerados de alto risco, mas que por qualquer motivo não façam o teste genético ou que recebem resultados inconclusivos ou indeterminados do teste, devem ser acompanhados como portadores de mutações.

Mulheres com alto risco para desenvolverem câncer de mama, mesmo que consideradas como tendo baixa probabilidade de portarem uma mutação, devem receber recomendações quanto às medidas de diagnóstico precoce e prevenção.

**Tabela 29.1.2**  
**Diagnóstico Diferencial entre SMOH e outras Síndromes de Predisposição Genética ao Câncer de Mama e Ovário de Acordo com Tumores Apresentados na Família<sup>13</sup>**

Associação de tumores tipicamente relacionados ao *BRCA1* e *BRCA2*

- Câncer epitelial de ovário em qualquer idade.
- Câncer de mama e de ovário em uma mesma pessoa.
- Câncer de mama em homens.
- Carcinomatose peritoneal como sítio primário e câncer de tuba uterina.

Outros tumores e diagnóstico diferencial com outras síndromes

- *BRCA1*: colo-retal, melanoma, leucemia, linfoma.
- *BRCA2*: pâncreas, próstata, estômago, colo-retal, cabeça e pescoço, linfoma, melanoma.
- *Li-Fraumeni (gene TP53)*: qualquer caso de câncer de mama em idade jovem ( $\leq 25$  anos) em uma família com sarcoma, tumor cerebral, leucemia, linfoma, carcinoma de laringe, carcinoma de cortical da adrenal.
- *Síndrome de Cowden (gene PTEN)*: qualquer caso de câncer de mama em idade jovem ( $\leq 25$  anos) em família com história de patologia benigna ou maligna de tireóide, meningioma, leiomioma, câncer de endométrio; lesões características de pele como pápulas faciais múltiplas, queratose acral e palmoplantar, triquelimomas faciais, lipomas subcutâneos. Hamartomas do cólon e doença mamária benigna são achados comuns desta síndrome.
- *Síndrome de Peutz-Jeghers (gene LKB1/STK11)*: máculas pigmentadas nos lábios, mucosa oral, conjuntiva, área periorbital e dedos. Os pacientes também apresentam múltiplos pólipos intestinais hamartomatosos, alguns dos quais com achados adenomatosos, mas não há evidência suficiente para uma associação com câncer colo-retal. Existe um aumento do risco para câncer de intestino delgado, principalmente duodeno, e também tumores do cordão sexual, melanoma, câncer de pâncreas, câncer gástrico e câncer de mama. Alterações germinativas no gene *STK11/LB1* têm sido identificadas em algumas famílias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Berry DA, Iversen ES, Gudbjartsson DF, Hiller EH, Garber JE, Peshkin BN et al. BRCAPRO validation, sensitivity of genetic testing of BRCA1/BRCA2, and prevalence of other breast cancer susceptibility genes. *J Clin Oncol*, 20:2701-12, 2002.
2. Breast Cancer Linkage Consortium. Cancer risk in BRCA2 mutation carriers. *J Nat Cancer Inst*, 91:1310-6, 1999.
3. Cancer risks in BRCA2 mutations carriers. *J Natl Cancer Inst*, 91:1310-6, 1999.
4. Claus EB, Schildkraut JM, Thompson WD, Risch NJ. The genetic attributable risk of breast and ovarian cancer. *Cancer*, 77:2318-24, 1996.
5. Foulkes WD. A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *Q J Med*, 88:853-63, 1995.
6. Frank TS, Deffenbaugh AM, Reid JE, Hulick M, Ward BE, Lingenfelter B et al. Clinical characteristics of individuals with germline mutations in BRCA1 and BRCA2: analysis of 10.000 individuals. *J Clin Oncol*, 20(6):1480-90, 2002.
7. Gail MH, Brinton LA, Byar DP et al. Projecting individualized probabilities of developing breast cancer for white females who are being examined annually. *J Nat Cancer Inst*, 81:1879-86, 1989.
8. Gayther AS, Foy KAF, Harrington P, Pharoah P, Dunsmuir WD, Edwards SM et al. The frequency of germ-line mutations in the breast cancer predisposition genes BRCA1 and BRCA2 in familial prostate cancer. *Canc Research*, 60:4513-18, 2000.
9. Hanh AS, Greenhalf B, Ellis I, Sina-Frey M, Rieder H, Korte B et al. BRCA2 germline mutations in familial pancreatic carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(3):214-21, 2003.
10. Hartge P, Struewing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA. The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet*, 64:963-70, 1999.
11. Hodgson SV, Maher ER. A practical guide to human cancer genetics, 2<sup>nd</sup> ed. Cambridge University Press, Cambridge, 81-100, Reproductive system, 1999.
12. Lakhani SR, Vujver MJV, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L et al. The pathology of familial breast cancer: Predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2 and p53 in patients with mutation in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*, 20(9):2310-8, 2002.
13. Lynch HT, Snyder L, Lynch JF, Riley BD, Rubinstein WS. Hereditary breast-ovarian cancer at the bedside: role of the medical oncologist. *J Clin Oncol*, 21(4):740-53, 2003.
14. Offit K, editors. Other predisposition syndromes. In: *Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management*. Wiley-Liss, New York, 157-211, 1998.
15. Peelen T, Van Vliet M, Bosch A, Bignell G, Vasen HF, Klijn JG, Meijers-Heijboer H et al. BRCA1 genomic deletions are major founder mutations in Dutch breast cancer patients. *Br J Cancer*, 82(1):151-6, 2000.
16. Venkitaramen AR. A growing network of cancer-susceptibility genes. *N Engl J Med*, 348(19):1917-18, 2003.
17. Welsh PL, Owens KN, King MC. Insights into the functions of BRCA1 and BRCA2. *Trends Genet*, 16:69-74, 2000.

## 29.2 Câncer Colo-retal Hereditário sem Polipose — HNPCC

*Benedito Mauro Rossi*

### INTRODUÇÃO

O câncer colo-retal (CCR) é o sexto em incidência no Brasil. Se considerarmos apenas a região Sudeste é o segundo mais freqüente no homem e o terceiro na mulher<sup>1</sup>.

Não existem dados sobre a incidência da síndrome de câncer colo-retal hereditário sem polipose (do inglês, *hereditary non-polyposis colon cancer* ou HNPCC, também conhecida como síndrome de Lynch) no Brasil. Porém, se considerarmos a literatura internacional, esse número está entre 3 e 12% de todos os casos de CCR<sup>7,10</sup>.

### GENES ENVOLVIDOS

O HNPCC é causado pela ocorrência de mutação germinativa transmitida de forma autossômica dominante em um dos genes de reparo do DNA: *hMSH2* (2p16); *hMLH1* (3p21); *hPMS1* (2q31-33); *hPMS2* (7p22); *hMSH6/GTBP* (2p16). Mais recentemente, relatos de outros genes de reparo envolvidos têm sido descritos, como o *hMSH3*<sup>4,6</sup>.

Os genes de reparo agem como controladores de qualidade, mantendo a fidelidade do DNA na divisão celular, por meio de mecanismos que identificam, retiram e corrigem os

erros nas seqüências de bases. Esses erros podem ocorrer por pareamento errado entre as bases ou por falha da enzima DNA polimerase, causando alças de inserção/deleção de bases (IDLs). As IDLs ocorrem por deslizamento errôneo da enzima na fita molde de DNA, geralmente em seqüências de bases repetitivas, como, por exemplo, os microssatélites. Por isso, mais de 90% dos pacientes com CCR em famílias de HNPCC apresentam instabilidade de microssatélites (do inglês, *microsatellite instability* ou MSI) nos tumores.

Dois grupos principais de proteínas estão envolvidos no processo de reparo em humanos: mutSh e mutLh. O modelo postulado para a correção dos erros consiste de três passos básicos: reconhecimento do erro e formação do “reparosomo”, degradação da fita de DNA contendo o erro, e, finalmente, realização do reparo. Um primeiro heterodímero chamado de hMutSa, formado por proteínas do grupo de homólogos de mutS (MSH), hMSH2 e hMSH6, tem sua ação principalmente nos erros de pareamento entre as bases. Um segundo heterodímero chamado de hMutSb, formado por hMSH2 e hMSH3, também pode iniciar o processo; porém, com ação principalmente nas IDLs. Por isso, os mecanismos de ação desses dois heterodímeros são complementares<sup>5</sup>. O passo seguinte nesse processo é desempenhado pela atividade da enzima *ATPase*, codificada na metade carboxi-terminal dos homólogos *mutS*. O ganho de um fosfato (ADP > ATP) no heterodímero hMutSa causa uma mudança conformacional no mesmo, transformando-o em uma espécie de braçadeira que corre sobre a dupla fita de DNA a ser reparada (*sliding clamp*) desempenhando assim sua função<sup>3</sup>. A proteína hMSH6 parece ter papel fundamental nessa fase, que ainda não é bem conhecida. Outras proteínas parecem também ser parte do processo nessa fase, como as provenientes dos homólogos mutL (MLH) e dos PMS (*postmeiotic segregation*), além dos antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA) RPA e RFC, e das exo/endonucleases EXO1 e FEN1<sup>5</sup>. Outro heterodímero chamado hMutL $\alpha$ , formado pelas proteínas hMLH1 e hPMS2, também parece estar envolvido com o mecanismo de reparo, assim como o hMutL $\beta$  (proteínas hMLH1 e hPMS1); porém, ainda com mecanismos de ação pouco esclarecidos em humanos<sup>6</sup>. Caso os mecanismos de reparo não sejam suficientes para corrigir os erros de replicação do DNA, a maquinaria de apoptose é ativada, levando a célula à morte<sup>2</sup>.

## DIAGNÓSTICO CLÍNICO

O diagnóstico do HNPCC é clínico. Por isso, médicos que lidam com pacientes portadores de CCR e tumores relacionados ao HNPCC devem conhecer as características clínicas da doença.

As principais características do HNPCC são<sup>7</sup>:

- Diagnóstico de câncer em idade precoce, em torno dos 47 anos de idade;
- CCR com predominância pelo lado direito do cólon, em torno de 70% dos casos;
- Associação com CCR metacrônico, em torno de 45% em dez anos, se houver cólon remanescente após a primeira cirurgia;

**Tabela 29.2.1**  
**Critérios de Amsterdam I**

Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR.  
Um dos membros parente em primeiro grau dos outros dois.  
Pelo menos duas gerações acometidas.  
Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos.  
Exclusão de polipose adenomatosa familiar.

- Associação com tumores extracolônicos, incluindo adenocarcinoma de endométrio, intestino delgado, estômago e ovário, e carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais.

Além das características clínicas descritas, alguns achados anátomo-patológicos do CCR em HNPCC são comuns, tais como: células em anel de sinete, componente mucinoso e predomínio de lesões indiferenciadas.

Em 1991, com a intenção de padronização internacional do diagnóstico clínico de HNPCC, o Grupo Colaborativo Internacional (ICG/HNPCC) publicou os chamados Critérios de Amsterdam I<sup>11</sup> (Tabela 29.2.1).

Os Critérios de Amsterdam I tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico de HNPCC. Porém, também foram criticados pela exclusão dos tumores extracolônicos. Por isso, em 1999, o mesmo ICG/HNPCC acrescentou alguns tumores extracolônicos nos Critérios iniciais<sup>12</sup>, chamados agora de Critérios de Amsterdam II (Tabela 29.2.2).

Tumores de estômago e ovário não foram incluídos, segundo os autores, por sua baixa incidência dentro da síndrome. É interessante notar que não há menção sobre a necessidade do diagnóstico de CCR dentro de uma família para o diagnóstico do HNPCC, bastando o preenchimento dos Critérios de Amsterdam com tumores extracolônicos.

Claro que o espectro de diagnóstico do HNPCC foi ampliado com os novos Critérios de Amsterdam; porém, ainda existem algumas críticas, e a principal delas é relativa à dificuldade de diagnóstico clínico principalmente em famílias pequenas, com poucos descendentes, fato comum na Europa, por exemplo. Nesses casos, para o diagnóstico clínico ser realizado, teríamos que esperar muito tempo, retardando, portanto, a orientação e o acompanhamento familiar.

Dentro desse enfoque, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) já havia publicado, em 1997, os Critérios de Bethesda<sup>9</sup>, não com o intuito de caracterizar o diagnóstico clínico de HNPCC, mas sim de indicar a pesqui-

**Tabela 29.2.2**  
**Critérios de Amsterdam II**

Mesmos Critérios de Amsterdam I.  
Adenocarcinoma de endométrio.  
Adenocarcinoma de intestino delgado.  
Carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais.

sa molecular da síndrome, por meio de MSI, em pacientes com suspeita HNPCC, com ou sem antecedentes familiares. A pesquisa de MSI serve como um teste de rastreamento, para posterior seqüenciamento dos principais genes de reparo (MMR) nas famílias onde estiver presente, pois a instabilidade, como já vimos, ocorre na grande maioria dos casos de HNPCC (Tabela 29.2.3).

## INDICAÇÃO DE TESTES DE PREDISPOSIÇÃO

Pacientes com preenchimento dos Critérios de Amsterdam para diagnóstico clínico de HNPCC, ou Critérios de Bethesda e MSI, devem ter indicação de seqüenciamento dos genes *hMLH1* e *hMSH2*. Se estes forem normais, também devem ter a indicação do seqüenciamento de *hMSH6*.

O primeiro teste de predisposição dentro de uma família com diagnóstico clínico de HNPCC deve ser realizado em um indivíduo com tumor (probando), de preferência o mais jovem da família. Esse procedimento deve ser realizado porque, se a família tem o diagnóstico clínico de HNPCC e aquele membro é portador de câncer, é nele que temos a maior probabilidade de detecção da mutação, ou seja, se a mutação for detectável, será nesse indivíduo<sup>7</sup>. Seguindo ainda nesse exemplo, se a mutação for detectada nesse indivíduo, teremos um resultado positivo do teste genético, com uma família clínica e molecularmente caracterizada como HNPCC. Nessa situação, poderemos pesquisar a mesma mutação, característica dessa família, nos demais membros, e diagnosticar quais os indivíduos assintomáticos, mas portadores da predisposição ao câncer. Com isso, a indicação da realização dos exames de seguimento fica restrita aos portadores de mutação nestes genes de predisposição. A penetrância descrita em HNPCC é em torno de 80%, e essa é a probabilidade de o genótipo transformar-se em fenótipo tumoral para os indivíduos portadores da mutação<sup>13</sup>. Membros com teste negativo, ou seja, sem a predisposição detectada na família, ficam liberados do seguimento; porém, recomendamos uma colonoscopia a cada cinco anos para esses indivíduos, principalmente após os 50 anos.

Se imaginarmos essa mesma família citada como exemplo, mas sem a detecção da mutação nos genes de reparo no probando (primeiro membro com câncer testado na família), o teste de predisposição, nesse caso, é chamado de inconclusivo, pois não terá utilidade para rastrear os membros portadores da predisposição e assintomáticos. Nessa situação,

a família continua sendo caracterizada clinicamente como HNPCC, mas com teste de predisposição inconclusivo.

## ACOMPANHAMENTO DE PACIENTES E SUAS FAMÍLIAS

O seguimento de famílias com diagnóstico clínico de HNPCC e com teste de predisposição inconclusivo, ou sem o teste, deve ser realizado em todos os membros, pois todos os descendentes são suspeitos de portarem a mutação predisponente. Em famílias com mutação já identificada, somente os membros portadores da mutação devem ser seguidos com o programa especial de rastreamento. O seguimento deve ser realizado com base nas seguintes orientações<sup>7</sup>:

- Colonoscopia com um a dois anos de intervalo, com início entre os 20-25 anos;
- Ultra-sonografia transvaginal anual, com início entre os 25-35 anos;
- Ultra-sonografia abdominal e pélvica anual, com início entre os 25-35 anos;
- Exame de urina tipo I e citologia urinária anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com carcinoma de células transitórias de vias excretoras renais;
- Endoscopia digestiva alta com um a três anos de intervalo, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com tumores gástricos;
- Dosagem de CA-125 anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com câncer de ovário.

## CIRURGIA

O ponto mais importante na indicação de cirurgias em pacientes com CCR e HNPCC é a conduta diferenciada com relação a pacientes com CCR esporádico. Pacientes com câncer de cólon e HNPCC devem ser submetidos à colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Essa conduta é indicada devido à alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. Esses indivíduos devem fazer retoscopias regularmente, com um a três anos de intervalo. Pacientes com câncer de reto e HNPCC devem ser submetidos à proctocolectomia total, se possível com preservação esfinteriana, utilizando-se bolsa ileal e anastomose anal na reconstrução. No caso de comprometimento esfinteriano pelo tumor, deve-se realizar a amputação abdômino-perineal do reto e ânus juntamente com a colectomia total, e uma ileostomia definitiva, que pode ser continente. Em casos de tumores extracolônicos, a cirurgia deve obedecer aos padrões clássicos da cirurgia oncológica para o órgão acometido.

Existe controvérsia sobre a cirurgia profilática, ou seja, remover cirurgicamente um órgão morfológicamente normal de um indivíduo sabidamente portador da predisposição genética ao câncer (com teste positivo). Nosso ponto de vista é que essa não deve ser uma cirurgia com indicação rotineira, mas deve ser oferecida como uma opção de prevenção aos indivíduos assintomáticos com teste genético positivo<sup>8</sup>. As

**Tabela 29.2.3**  
**Critérios de Bethesda**

Paciente dentro de família de HNPCC pelos Critérios de Amsterdam.

Paciente com CCR e menos de 45 anos.

Paciente com tumor extracolônico relacionado ao HNPCC e menos de 45 anos.

Paciente com adenoma colo-retal e menos de 40 anos.

Atenção para CCR em jovens, indiferenciados ou com células em anel de sinete.

duas cirurgias profiláticas que podem ser indicadas atualmente são<sup>7</sup>: colectomia total com anastomose ileorretal; histerec-tomia total com salpingo-ooforectomia bilateral em mulheres pós-menopausadas ou após a idade reprodutiva.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil, INCA, Rio de Janeiro, 1999.
2. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. *Nature Med*, 5:1239-41, 1999.
3. Iaccharino I, Marra G, Dufner P, Jiricny J. Mutation of the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutSa sliding clamp from translocating along DNA. *J Biol Chem*, 275:2080-6, 2000.
4. Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 10:157-61, 2000.
5. Jiricny J. Replication errors: cha(lle)nging the genome. *EMBO J*, 17:6427-36, 1998.
6. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Base S, Baxevanis A, Lynch HT et al. MLH3: a novel DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet*, 24:27-35, 2000.
7. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch syndrome). An update review. *Câncer*, 78:1149-67, 1996.
8. Rodrigues-Bigas MA. Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Câncer*, 78:199-201, 1996.
9. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*, 89:1758-62, 1987.
10. Rossi BM, Pinho M. Tumores colo-retais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M (eds). *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. Lemar, São Paulo, 173-200, 1999.
11. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum*, 34:424-5, 1991.
12. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology*, 116:1453-6, 1999.
13. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuer JH, Taal BG, Griffioen G et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology*, 110:1020-7, 1996.

## 29.3 Polipose Adenomatosa Familiar

*Bernardo Garicochea*

### INTRODUÇÃO

A Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) é uma síndrome hereditária rara que afeta uma em cada 30 mil pessoas e está associada a menos de 1% dos casos de câncer colo-retal. A FAP caracteriza-se pela predisposição hereditária ao desenvolvimento de centenas a milhares de adenomas que se localizam especialmente no cólon e no reto, mas que podem desenvolver-se também no intestino delgado e no estômago. Praticamente todos os portadores apresentam adenomas aos 35 anos e cerca de 90% dos casos não tratados desenvolvem câncer aos 45 anos. Os pólipos podem ser detectados tão precocemente quanto na primeira década de vida, mas frequentemente aparecem na faixa dos 16 anos.

A idade média para o diagnóstico de câncer colo-retal é de 39 anos e os tumores são distribuídos preferencialmente no

terço distal do cólon. Suspeita-se que de 20 a 30% dos casos de FAP sejam representados por mutações novas. A detecção cada vez maior de variantes atenuadas de FAP (i.e. dez a 100 pólipos em contraste com os milhares vistos na FAP clássica) e de famílias em que os fenótipos da doença são distintos em portadores reforça a impressão de que FAP é subdiagnosticada quando se baseia exclusivamente em critérios clínicos<sup>1</sup>.

Pacientes com FAP têm risco sete vezes maior de desenvolverem câncer no sistema nervoso central e mais da metade dos pacientes apresenta adenomas na ampola duodenal, e 10 a 12% destes desenvolverão carcinoma periampular. Não associado a câncer — mas relevante na avaliação clínica destes pacientes — são a hipertrofia congênita de epitélio pigmentado retiniano (CHRPE), as lesões benignas, como osteomas e odontomas, e outras não tão benignas como os tumores desmóides.

O caráter mendeliano da FAP é conhecido há pelo menos um século. No entanto, os primeiros avanços significativos feitos para se compreender as bases moleculares desta síndrome foram feitos somente na década de 1980. Em 1986, Herrera e col. detectaram uma deleção no braço longo do cromossomo 5 em um paciente com Síndrome de Gardner, que hoje é considerada como uma forma de FAP. Este achado não foi uma simples coincidência: o final da década de 1980 foi uma época de grandes avanços nas técnicas de cariotipagem de tumores sólidos. Nos anos seguintes à descrição do caso de Herrera, surgiram diversos relatos de anomalias cariotípicas em FAP, localizando o provável gene da síndrome na região 5q22, marginalmente à junção da banda 5q21.

O próximo passo era definir-se com maior precisão o locus do gene da FAP. Dois estudos publicados quase simultaneamente foram fundamentais para que esta região fosse encontrada. Em 1987, Bodmer e Leppert, utilizando-se de diversas sondas de DNA para regiões com alta taxa de polimorfismo do cromossomo 5, obtiveram o mesmo resultado. Entre vários marcadores de DNA testados, um em especial, denominado C11p11, apresentava uma alta taxa de ligação com a herança do fenótipo FAP. Rapidamente, outros marcadores com altas taxas de ligação foram também identificados permitindo o mapeamento físico da região onde estaria localizado o gene da FAP.

Durante alguns anos, estes marcadores polimórficos que flanqueavam o gene *APC* foram utilizados para teste genético visando a detectar-se aqueles indivíduos de uma família com FAP que haviam herdado a cópia alterada do gene. Como já se dispunha de diversos marcadores com alta taxa de polimorfismo, esta forma de teste era altamente informativa, permitindo o diagnóstico correto de portador de FAP em virtualmente todos os casos onde não havia recombinação entre os marcadores testados.

Estas sondas de DNA, todavia, tinham limitações. A mais importante dizia respeito à baixa sensibilidade do método para diagnóstico pré-sintomático. As razões para este problema eram muitas — altas taxas de recombinação entre os marcadores, um número substancial de pacientes com mutações novas, heterogeneidade genética, e em alguns grupos estudados, uma taxa elevada de mosaïcismo e de paternidade adulterada —, o que confundia a análise de herança dos marcadores.

A prática de se utilizar marcadores de DNA para diagnóstico pré-sintomático de FAP só seria abandonada quando o gene que estes marcadores flanqueavam fosse identificado. E isto ocorreu em 1991, quando (mais uma vez) dois grupos, simultânea e independentemente, reportaram a caracterização do gene responsável pela FAP e de mutações responsáveis por aberrações na proteína codificada pelo mesmo. Este gene foi denominado *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*) para evitar confusão com a sigla FAP (*Familial Amyloid Polyneuropathy*) que já era utilizada no léxico genético.

## O GENE APC

O gene *APC* é extenso. A sua porção codificante é composta por 15 éxons com uma fase aberta de leitura de 8.535 nucleotídeos. Duas formas de transcritos podem ser geradas

a partir do éxon 9 (*splicing* alternativo), uma composta por 100 aminoácidos a mais que a outra. O éxon 15 deste gene é um dos maiores éxons descritos até o momento no genoma humano. Composto por mais de 6.500 nucleotídeos, é neste éxon que grande parte dos sítios funcionais da proteína APC são codificados<sup>2</sup>.

## A PROTEÍNA APC

O produto predito para a proteína APC tem cerca de três mil aminoácidos e a sua estrutura sugere tendências à homo e dimerização, localização citoplasmática e expressão ubíqua. A função da proteína APC ainda não foi totalmente elucidada, mas o estudo de proteínas que interagem com ela pode fornecer pistas importantes sobre o seu papel biológico.

A proteína APC liga-se com grande afinidade à beta-catenina e gama-catenina. Estas proteínas participam de mecanismos de adesão celular, atuando nos complexos desmosômicos e de junção aderente. Estes complexos ligam-se ao domínio citoplasmático da E-caderina, uma proteína da família das moléculas de adesão cálcio-dependentes responsável pela adesão célula-célula. As cateninas formam uma ponte entre as caderinas e o citoesqueleto. A proteína APC não é encontrada no complexo caderina, mas a sua associação com componentes desta estrutura sugere que um possível mecanismo oncogênico de mutações no gene *APC* seria via interação intercelular aberrante.

Além de interagir com o complexo caderina, a proteína APC parece ser capaz de modular os níveis de beta-catenina. Em outras palavras, a proteína APC teria um papel regulatório na expressão de elementos responsáveis pela adesão celular. Regulando a expressão da beta-catenina que também atua como ativador transcricional, a proteína APC, mesmo não tendo função direta nas vias de sinalização celular, teria um papel importante indireto.

Estudos de transfecção celular também sugerem que a proteína APC desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular. Nestes estudos, APC foi capaz de inibir a progressão das células da fase G1 para S. O mecanismo mais provável envolveria a regulação negativa da função de CDK2, uma ciclina-quinase fundamental na progressão de G1 para S durante a divisão celular<sup>3</sup>.

Portanto, a perda da função da proteína APC implicaria a perda do controle de algumas funções importantes para a célula e poderia explicar o fenótipo da doença. A produção de vegetações do tipo polipóide poderia refletir a perda da regulação intercelular por alteração na expressão de beta-catenina; a proliferação descontrolada, etapa fundamental no processo de malignização, poderia refletir a menor repressão funcional de CDK2 com o conseqüente incremento na taxa de progressão das células acometidas de G1 para S. Desta forma, o gene *APC* funcionaria aos moldes de um gene supressor de tumor, já que a perda da sua função reflete em vantagem proliferativa e predisposição à célula acometida de aquisição de novos eventos genéticos que conduzirão ao fenótipo maligno pleno (adenocarcinoma).

Se mutações no gene *APC* provocam funcionalmente um efeito do tipo gene supressor, a forma como o gene *APC* pro-

move este efeito não ocorre nos moldes clássicos dos genes supressores. Uma única cópia mutada é capaz de iniciar os eventos proliferativos, ao contrário dos genes supressores em que a perda da função do alelo restante é necessária para comprometer a função da proteína. O mecanismo pelo qual o alelo intacto restante não é capaz de contrabalançar o efeito produzido pelo alelo mutado é conhecido como “dominante negativo”. A explicação para este fenômeno ainda não é certa, mas presume-se que, pela forte tendência a funcionar sob forma de dímeros e tetrâmeros, a proteína APC encurtada pela truncagem provocada pela mutação, ao se polimerizar com a proteína APC normal, afetaria a função do polímero como um todo, desestabilizando-o.

## MUTACÕES NO GENE APC

Cerca de 300 mutações diferentes já foram identificadas até o momento no gene *APC* em famílias portadoras de FAP. Entre as mutações já descritas, uma em cada três são deleções; a minoria dos casos consiste em inserções ou mutações de ponto. No caso das deleções e das inserções, ocorre deslocamento na fase aberta de leitura (*frameshift*), gerando um códon de parada precoce que promove a truncagem da proteína.

As mutações de ponto respondem por um quarto a um quinto das mutações já identificadas no gene *APC*. Em 95% dos casos, a substituição de uma base por outra gera diretamente um códon de parada (mutação *non-sense*) promovendo a truncagem da proteína de maneira similar à observada com mutações por deleção e inserção. Apenas em 5% dos casos as mutações de ponto são do tipo *missense*, ou seja, a substituição de uma base por outra não produz códons de parada que interrompem prematuramente a proteína, mas sim proteínas com estruturas distintas da conformação original — apesar do mesmo número final de bases. A proteína traduzida pelo gene mutante será disfuncional se envolver regiões que codificam domínios funcionais importantes ou se for capaz de gerar aberrações substanciais na sua estrutura terciária<sup>4</sup>.

Menos de 3% das mutações descritas encontram-se em sítios de *splicing*. Este tipo de mutação também produz códons de parada com conseqüente truncagem da proteína APC.

Cerca de 4% dos casos constituem-se em grandes deleções no gene *APC*. Estas aberrações podem ser observadas por estudos citogenéticos e por hibridização *in situ* fluorescente, já que ocorre perda de grande quantidade de material genético envolvendo a região 5q22.

## DISTRIBUIÇÕES DAS MUTACÕES NO GENE APC

Um quarto das mutações foi descrita entre os éxons 1 e 14, geralmente envolvendo códons para o aminoácido arginina (CGA). A vasta maioria das mutações no gene *APC* é encontrada no éxon 15, e freqüentemente em dois sítios correspondendo aos códons 1061 (ACAAA del) e 1309 (AAAGA del). Estas duas aberrações respondem por pelo menos 30% de todas as mutações já descritas no gene *APC*. As demais mutações descritas no éxon 15 (40 a 50% do total

de mutações no gene *APC*) encontram-se concentradas na metade 5' do mesmo. Menos de dez mutações foram descritas na metade 3' do gene. A maioria das mutações encontradas no éxon 15 é do tipo *frameshift* ou com deslocamento de fase de leitura.

O conhecimento da distribuição das mutações no gene *APC* é importante na medida em que se pode definir uma estratégia de detecção em casos novos. Ou seja, a busca da mutação deve iniciar-se na metade 5' do éxon 15, focalizando-se preferencialmente os dois códons mais comumente afetados. Todavia, é importante lembrar que uma grande parte das mutações fora destes *hot-spots* distribui-se em um fragmento de 4.500 pares de bases, tornando a sua busca uma tarefa complicada para fins de rotina diagnóstica.

Uma quantidade pequena de casos de FAP ocorre por mecanismos variados de inativação do gene *APC* que não implicam mutações ou deleções do gene *APC*. Por exemplo, foram descritas famílias com FAP onde se detectou ruptura da seqüência normal do gene *APC* por meio da inserção de um transposon (seqüência de DNA móvel que geralmente se posiciona em áreas silenciosas do genoma). Transcrição insuficiente do gene *APC* pode também ocorrer por metilação aberrante do promotor. Finalmente, é possível que casos de FAP ocorram por anomalias herdadas em proteínas que regulam a função da proteína APC, sem afetá-la estruturalmente.

## DETECÇÃO DE MUTACÕES NO GENE APC

A regra de ouro para detecção de mutações em *APC* é o seqüenciamento físico do gene. Como as mutações podem encontrar-se em regiões distintas do gene em cada família com polipose, o seqüenciamento integral do gene *APC* torna-se uma tarefa tecnicamente complicada. Portanto, foi necessário desenvolver tecnologias alternativas para a detecção de mutações em *APC*, tais como análise de heteroduplexes (HA), ensaio de proteção de RNase, polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP), método de clivagem química e eletroforese em gel com gradiente desnaturante (DGGE). O teste mais utilizado em diversos centros do mundo e que basicamente tornou-se o método padrão de rastreamento de mutações em FAP, pela sua simplicidade e alta sensibilidade, é o teste de truncagem de proteína (PTT).

A vasta maioria das mutações no gene *APC* descritas até o momento gera uma proteína encurtada (truncada), destituída de domínios funcionais importantes codificados na porção mais a 3' da mutação. O teste da PTT baseia-se na tradução *in vitro* de uma proteína a partir de um fragmento de DNA, visando à determinação da presença de mutações que produzam códons de parada, por meio de um artifício bastante engenhoso. O DNA é obtido de linfócitos do sangue periférico do paciente com polipose. Diversas regiões de cerca de mil pares de bases são então amplificadas por meio de PCR. No *primer* senso foi adaptada uma seqüência idêntica ao sítio de ligação da T7 RNA-polimerase seguida de um códon de iniciação. Neste caso, a seqüência amplificada é codificada para RNA e imediatamente traduzida para proteína com aminoácidos radiomarcados. Este material é submetido a uma corrida eletroforética e as proteínas truncadas podem ser

distinguidas, dado o seu padrão aberrante de migração, das proteínas normais.

A associação de PTT com análise de heteroduplexes foi capaz de detectar 70% das mutações em famílias portadoras de FAP em uma população finlandesa. Deve-se levar em conta que o laboratório que executou o estudo é especializado nestas técnicas e que as famílias estudadas eram altamente selecionadas, o que sugere que outros laboratórios talvez não atinjam estas taxas tão expressivas de positividade. Conseqüentemente, parece claro que tanto PTT como HA podem ser métodos interessantes para rastreamento, mas que efetivamente não substituem o seqüenciamento ou, no caso de grandes deleções ou duplicações, o método de Southern-blotting<sup>4</sup>.

## CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

A transição de pólipos até o aparecimento de adenocarcinoma na FAP envolve ganho de aberrações genéticas de forma seqüencial no epitélio cólico. Da mesma forma que nos adenocarcinomas esporádicos, a geração de fenótipo maligno na FAP obedece à hipótese de Knudson, em que a aquisição de danos em genes regulatórios importantes no epitélio cólico produz um fenótipo cada vez mais instável, predispondo esta(s) célula(s) ao acúmulo progressivamente mais rápido de aberrações genéticas e conseqüentemente perda da homeostase. Dentre as alterações genéticas consistentemente descritas nos casos de FAP estão mutações no proto-oncogene *K-RAS*, e anomalias nos cromossomos 17 (*TP53*) e 18 (*DCC*). Além da inativação do gene *APC*, que é o evento primário da FAP e um achado também precoce nos carcinomas esporádicos, o envolvimento dos genes acima sugere que as vias de malignização do epitélio cólico observadas na FAP e nos carcinomas esporádicos são similares. A conclusão de que estes tumores de história mórbida tão distinta apresentam interfaces biológicas comuns tem implicações terapêuticas, já que tratamentos futuros para câncer colo-retal direcionados para proteínas aberrantes ou não funcionantes destas células poderiam ser aplicados igualmente para casos esporádicos ou com FAP.

A heterogeneidade clínica e anátomo-patológica da FAP tem recebido grande atenção nos últimos cinco anos devido às descrições concordantes de casos cujo fenótipo corresponde a mutações em regiões específicas no gene *APC*. Mutações entre os códons 1215 e 1464, região que corresponde à porção mais 5' do éxon 15, associa-se aos quadros de polipose mais severos, com formação profusa de microadenomas. Na variante atenuada de FAP (síndrome do adenoma plano), as mutações têm sido descritas entre os éxons 1 e 4 ou na porção 3' do éxon 15 (códon 1597). Em ambas as situações, o teste de PTT é de difícil interpretação, já que os produtos destas mutações são proteínas de tamanho tão pequeno que não são identificáveis no teste, ou de tamanho similar ao produto normal, não podendo ser diferenciáveis deste no gel de SDS-PAGE. Um relato de caso recente implicou a presença de doença desmóide em pacientes com uma mutação que produziu alteração de fase de leitura no códon 1924.

Não se constitui surpresa o fato de que mutações distintas no gene *APC* causem fenótipos distintos. A abolição de domínios importantes da proteína APC por conta de terminação precoce da proteína determina uma maior ou menor capacidade funcional da proteína com efeitos biológicos correspondentes. O fato mais importante, no entanto, refere-se ao achado de que truncagens nas porções inicial ou terminal da fase de leitura do gene produzam fenótipos atenuados similares. Esta constatação confirma as evidências de que a proteína APC funciona via formação de polímeros. Mutações em regiões a 5' do gene produzem fragmentos incapazes de se dimerizar com a proteína APC produzida pelo alelo normal e, portanto, as proteínas produzidas pelo alelo intacto conseguem dimerizar-se praticamente sem competição. Esta situação é também vista em mutações nas porções terminais da fase de leitura, ou seja, a proteína truncada não perdeu seus domínios de dimerização e consegue produzir polímeros com algum grau de funcionalidade. Esta hipótese não foi completamente comprovada, mas existem fortes evidências que apontam para este mecanismo como o mais provável na geração de fenótipos atenuados<sup>5</sup>.

## TESTE GENÉTICO PARA FAP, QUANDO E EM QUEM FAZER?

Na prática, nem sempre é necessário estudar a mutação do gene *APC* para se confirmar o diagnóstico de FAP em um determinado paciente, uma vez que o quadro clínico associado à história familiar definem a situação na maioria dos casos. No entanto, em alguns casos, a análise mutacional pode ser crucial para a definição diagnóstica. Como, por exemplo, em casos de mutações novas com fenótipo atenuado. Nestes casos, a ausência de história familiar e o número limitado de pólipos dificultam o diagnóstico definitivo, tomando a identificação da mutação um elemento diagnóstico importante. A análise mutacional de FAP pode ser útil também em casos de diagnóstico diferencial de síndromes polipóides, como entre a síndrome de Gardner e Peutz-Jehgers, em que, naquela, a mutação encontra-se no gene *APC*, e, na última, a mutação pode ser detectada no gene *PJS*.

Se a aplicação dos testes de DNA é limitada a algumas situações no caso de diagnóstico de FAP, isto não é verdade no que diz respeito a diagnóstico pré-sintomático da doença. Em outras palavras, o teste permite definir que membros da família herdaram o gene mutado e que, portanto, vão desenvolver a síndrome (e, por isso, apresentam alto risco para câncer colo-retal). De uma forma geral, o teste inicial é feito em um portador conhecido de polipose na família. Uma vez encontrada a mutação, recomenda-se submeter cada familiar de risco (primeiro grau) deste portador à análise de DNA. Como a mesma mutação segrega na família, basta abordar-se diretamente a região mutada, não havendo necessidade de se analisar integralmente o gene *APC*, reduzindo-se tanto o tempo como o custo da análise.

A análise deve ser feita o mais precocemente possível. Como a mutação no gene *APC* tem 100% de penetrância e virtualmente todos os pacientes que a herdarem desenvolverão câncer colo-retal, a importância da detecção precoce da mu-

**Tabela 29.3.1**  
**Programa de Seguimento de Membros de Famílias com FAP**

<i>Exame</i>	<i>Início</i>	<i>Periodicidade</i>	<i>Objetivo</i>
Retossigmoidoscopia ou colonoscopia	12-14 anos	A cada 18 meses	Identificar polipose
Gastrosocopia	Ao diagnóstico	A cada três anos em casos com pólipos gástricos	Prevenção de câncer de estômago e duodeno
Avaliação oftalmológica	Ao diagnóstico	A cada três anos	Identificar CHRPE

tação é tão importante para os não portadores como para os portadores. Para os primeiros, porque o fato de estarem livres da síndrome terá um impacto psicológico enorme, especialmente durante a infância. O fato de se saber não portador não implica somente poder evitar controles periódicos com colonoscopias ou outros exames endoscópicos, mas acima de tudo remove um estigma de “ser doente” e de uma série de temores que envolvem idéias de mutilação e morte.

Para os indivíduos da família que apresentam mutação genética e são ainda assintomáticos, uma série de medidas podem ser tomadas no sentido de melhorar a qualidade de vida antes e após o surgimento dos sintomas. É recomendável que estes indivíduos sejam abordados por grupos multidisciplinares, e que sejam acompanhados pelo menos até o início da adolescência por grupos de suporte que os auxiliem a entender e conviver de forma adequada com a síndrome e suas conseqüências, especialmente a tediosa e incômoda vigilância endoscópica necessária<sup>6</sup>.

O acompanhamento endoscópico de indivíduos assintomáticos deve seguir-se indefinidamente, iniciando-se no início da adolescência nos portadores de mutação ou em indivíduos em risco que não se submeteram a testes de DNA. Na Tabela 29.3.1 é apresentado um programa de seguimento executado por vários serviços. As idades de início de investigação e de periodicidade de exames são arbitrarias e se baseiam em experiências de outros grupos, mas não se constituem

em paradigmas. Em casos de polipose atenuada, os controles poderiam ser mais espaçados, assim como, em caso de famílias com alta incidência de câncer duodenal ou gástrico, o rastreamento destes órgãos em portadores assintomáticos, ou com polipose cólica já instalada, deve ser mais agressivo<sup>6</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Kuwada SK, Burt RW. The clinical features of the hereditary and nonhereditary polyposis syndromes. *Surg Oncol Clin N Am*, 5(3):553-567, 1996.
2. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*, 137(7):603-612, 2002.
3. Heinen CD, Goss KH, Cornelius JR, Babcock GF, Knudsen ES et al. The APC tumor suppressor controls entry into S-phase through its ability to regulate the cyclin D/RB pathway. *Gastroenterology*, 123(3):751-763, 2002.
4. Moio A-L, Jarvinen H, Peltomaki P. Genetic and clinical characterization of familial adenomatous polyposis: a population based study. *Gut*, 50:845-850, 2002.
5. Hernegger GS, Moore HG, Guillém JG. Attenuated familial adenomatous polyposis: an evolving and poorly understood entity. *Dis Colon Rectum*, 45:127-134, 2002.
6. Friedl W, Caspari R, Sengteller M et al. Can APC mutation analysis contribute to therapeutic decisions in familial adenomatous polyposis? Experience from 680 PAF families. *Gut*, 48:515-521, 2001.

## 29.4 Síndrome de Li-Fraumeni

*Maria Isabel Waddington Achatz*

### INTRODUÇÃO

Em 1969, Li e Fraumeni revisaram 280 prontuários e 418 atestados de óbito de crianças que tiveram o diagnóstico de

rabdomiossarcoma, analisando a historia familiar destes pacientes. Verificaram que cinco famílias dentre as estudadas apresentavam irmãos ou primos de 1º grau com diagnóstico de sarcoma na infância, um aumento significativo de casos de

câncer de mama em idade jovem, alm N.R.: ??? de outras neoplasias, tais como leucemia aguda, tumores de sistema nervoso central e carcinoma de pulmão, pâncreas, adreno-cortical e pele nas famílias estudadas. A partir destas observações, os autores propuseram uma nova síndrome de câncer familiar relacionada a diversos tumores — a Síndrome de Li-Fraumeni(LFS)<sup>6</sup>.

A LFS é uma síndrome rara de predisposição ao câncer com caráter autossômico dominante com alta penetrância. Estima-se que pacientes com esta síndrome apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparados a 1% na população geral e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 70 anos de idade<sup>8</sup>. Portadores que desenvolveram tumor na infância são mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores secundários. Observa-se também maior incidência de tumores secundários em regiões tratadas por radioterapia. O risco aparenta ser maior em mulheres, em parte devido ao alto risco de desenvolvimento de câncer de mama<sup>12</sup>.

Diversos tipos de tumores malignos estão diretamente relacionados a LFS (Tabela 29.4.1), tais como sarcoma, leucemia, tumores do sistema nervoso central, tumores adreno-corticais, e câncer de mama de início em idade jovem. Deve-se relacionar ainda outros tipos de câncer que são freqüentes em famílias com LFS, dentre eles melanoma, tumores de células germinativas, tumores gástricos e tumor de Wilms, e outros em casos individuais de LFS, como pâncreas, pulmão, laringe, próstata e linfomas. Famílias que não apresentam a expressão completa do fenótipo clássico da síndrome são denominadas Li-Fraumeni-like (LFL) ou Li-Fraumeni variante<sup>2</sup> (Tabelas 29.4.2 e 29.4.3).

## QUADRO CLÍNICO E CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

A anamnese e história familiar de pacientes que desenvolveram câncer infantil devem ser sempre minuciosas, buscando outros casos de câncer na família. O diagnóstico clínico

da LFS é definido a partir de um probando que apresentou sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos), associado a um parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e a outro parente de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade<sup>7</sup> (Tabela 29.4.2).

A LFL é definida pelo diagnóstico no probando de qualquer câncer infantil ou sarcoma, tumor cerebral ou carcinoma adreno-cortical em idade jovem (antes dos 45 anos), associado a um parente de primeiro ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, câncer do sistema nervoso central, carcinoma adreno-cortical ou leucemia) em qualquer idade e um parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos (Tabela 29.4.3).

Outro critério diagnóstico mais abrangente foi proposto por Eeles, definindo a LFL a partir de dois parentes de primeiro ou de segundo grau com câncer relacionado a LFS em qualquer idade<sup>4</sup>. Cabe ainda ressaltar a existência de pacientes que por si próprios preenchem os critérios para LFS ou LFL, associado ou não a outros casos de câncer na família. Estes pacientes preenchem todos os critérios acima descritos a partir de uma história pessoal de múltiplos cânceres e são considerados pacientes Li-Fraumeni ou Li-Fraumeni-like.

## O GENE TP53

O gene envolvido na LFS e LFL é o gene supressor de tumor *TP53*, que codifica a proteína p53. Mutações germinativas no gene *TP53* foram encontradas em aproximadamente 77% da LFS clássica e entre 40 a 20% das famílias com LFL, podendo chegar a 8%<sup>14</sup>. O risco de câncer em portadores da mutação germinativa mostrou-se mais alto no sexo feminino, em parte devido à maior incidência de câncer de mama em idade jovem. A exposição à radiação ionizante, radiação gama, a raios UV, agentes oxidantes, drogas citotóxicas e agentes químicos causadores de câncer aumentam o risco de tumor

**Tabela 29.4.1**  
**Tumores mais Frequentemente Associados a LFS e LFL**

Tumores infantis	Sarcoma
	Leucemia
	Tumor do sistema nervoso central
	Câncer adreno-cortical
	Tumor de Wilms
Tumores em adultos	Câncer de Mama
	Melanoma
	Tumor de células germinativas
	Câncer gástrico
	Câncer de pâncreas
	Câncer de pulmão
	Câncer de laringe
	Câncer de próstata
	Linfoma

**Tabela 29.4.2**  
**Critérios Diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni**

Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos).  
Parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos).  
Parente de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.

res. Outros agentes mutagênicos e carcinogênicos são fontes atuais de estudos<sup>9</sup>. Suspeita-se de que haja ainda o envolvimento do gene *CHEK2*, que agiria como gene de susceptibilidade alternativa na LFS, porém recentemente levantaram-se dúvidas quanto à real participação deste gene<sup>11</sup>. Mutações germinativas no gene *CHEK2* foram encontradas em apenas algumas famílias com LFS e LFL, no entanto sua relação direta com a síndrome ainda não está confirmada.

A proteína p53 foi descoberta há 20 anos, e inicialmente era considerada como um produto de um oncogene. No final dos anos 80, verificou-se que esta propriedade devia-se a apenas algumas formas mutantes do gene, enquanto o gene selvagem, ou *wild type*, tinha a capacidade de suprimir a transformação de um tumor, seja ele *in vitro* ou *in vivo*. Em 1990, o gene *TP53* foi apontado como gene candidato, uma vez que mutações foram detectadas nos pacientes com LFS. Dois anos mais tarde, foram produzidos camundongos nocauteados (*tp53*) ou *knock-out*, que são animais modificados geneticamente portadores dessas mutações. Os camundongos apresentaram desenvolvimento normal, porém desenvolveram tumores múltiplos em idade precoce. Em estudos mais recentes, os camundongos homocigotos *tp53* tiveram morte precoce devido a linfomas enquanto heterocigotos tiveram alterações fenotípicas, apresentando exencefalia, gastroquise, polidactilia, edema cefálico e fenda palatina, sendo mais frequente em fêmeas. Além disso, os tumores mais verificados foram linfomas tímicos, sarcomas, carcinomas de mama e bexiga<sup>15</sup>.

O papel do gene *TP53* na regulação do ciclo celular e sua participação direta no controle da apoptose é determinante, recebendo por isso a denominação de “guardião do genoma”<sup>3</sup>. O *TP53* é um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), com 20kb e contém 11 éxons, e o primeiro não codificador. O gene *TP53* humano codifica uma proteína de 393 aminoácidos, a p53. A proteína p53 liga-se a seqüências específicas de DNA e age como fator de transcrição dos genes reguladores do crescimento celular. A proteína p53 é rapidamente convertida a sua forma ativa sob a ação de fatores que destroem o DNA. A proteína p53 está inativa na maior parte de cânceres humanos

devido à mutação do gene *TP53* ou por ação de proteínas virais. Assim como em tumores esporádicos, a perda de heterozigossidade levando à inativação do alelo selvagem ocorre nos tumores LFS.

Mais de 18 mil mutações pontuais foram detectadas, sendo 97% somáticas e 3% germinativas e são predominantemente do tipo *missense*, principalmente transições guanina para adenina, porém todos os tipos de mutações podem ocorrer: mutações *non-sense*, deleções *frameshift* ou inserções de seqüências repetidas. Há um caso de mosaico de LFS descrito na literatura<sup>5</sup>. Para seqüenciamento do gene, considera-se como *hot spot* a região entre os éxons 5 e 8, no entanto deve-se procurar a mutação em todos os éxons. O *gold standard* para detecção das mutações pontuais é o seqüenciamento direto de DNA genômico de todos os éxons, incluindo os sítios de *splicing*.

## CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Mutações germinativas no gene *TP53* não são específicas quanto a algum órgão-alvo ou célula-alvo. No entanto, verifica-se o agrupamento de certos tumores, tais como tumores gástricos no Japão e tumores adreno-corticais na região da periferia de Curitiba, no Brasil<sup>10</sup>. As famílias brasileiras apresentaram mutações no códon 337, nunca antes descrita na literatura, em 35 crianças dentre as 36 estudadas, não sendo identificado efeito fundador. Acredita-se que esta mutação germinativa específica ocorreu devido à alteração do pH em células adrenais apoptóticas no período pré- e pós-natal, o que levou à inativação do *TP53*. Famílias com mutações do tipo *missense* apresentaram tumores mais precocemente<sup>1</sup>. Estudos com famílias LFS, correlacionando os tipos de mutação germinativa e os tipos de tumores encontrados, seriam elucidativos.

## RASTREAMENTO

O acompanhamento de famílias com história sugestiva de LFS deve ser realizado como medida preventiva para o desen-

**Tabela 29.4.3**  
**Critérios Diagnósticos da Síndrome de Li-Fraumeni-like**

Câncer na infância ou sarcoma, tumor do sistema nervoso central ou câncer adreno-cortical antes dos 45 anos.  
Parente de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, tumor do sistema nervoso central, câncer adreno-cortical ou leucemia) em qualquer idade e parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.

volvimento de possíveis tumores. Inicialmente, deve-se realizar um heredograma detalhado da família, tomando-se o cuidado de comprovar o tipo de tumor do paciente e dos familiares por meio de laudo anátomo-patológico ou relatório médico. Uma vez preenchidos os critérios descritos anteriormente, deve-se desenvolver um programa personalizado de rastreamento em parentes de primeiro e de segundo grau, mesmo assintomáticos. Pacientes com história progressiva de outros tumores devem ser avaliados não só para o aparecimento de recidivas, mas também para novos tumores primários. Devido à diversidade de tumores passíveis de aparecimento na síndrome, cada família deve ser avaliada inicialmente nos sítios tumorais acometidos em outros membros da família. Deve-se também investigar, por meio de exames periódicos, o aparecimento dos tumores já descritos para LFS. O acompanhamento deve ser periódico, com realização de exames de imagem.

O teste genético, feito através do sequenciamento do gene *TP53*, é indicado para pacientes que preencham os critérios diagnósticos clínicos da LFS e LFL. Após detecção da mutação, o exame deve ser oferecido aos familiares previamente submetidos a aconselhamento oncogenético. No entanto, até o presente, o sequenciamento do gene *TP53* não é feito rotineiramente, e o seu estudo é oferecido apenas em alguns centros de pesquisa.

## PERSPECTIVAS

O diagnóstico da síndrome de Li-Fraumeni é de grande importância clínica para a prevenção de neoplasias em famílias que apresentam constitutivamente mais propensão ao seu desenvolvimento. Como constitui uma entidade clínica pouco conhecida, é muitas vezes confundida com um agrupamento casual de tumores ou mesmo com outras síndromes genéticas, como a síndrome de mama e ovário hereditário, quando mais se um familiar apresenta câncer de mama. O diagnóstico correto desta síndrome vai permitir a detecção de pacientes que apresentam alto risco para apresentar tumores e que necessitam de rastreamento sistemático. Ao mesmo tempo, através do aconselhamento genético, os familiares serão informados do risco de transmissão à prole e estimulados a sensibilizar o maior número de familiares possível. Com isso, será possível avaliarmos os indivíduos assintomáticos, poupando-os muitas vezes, devido à detecção precoce, de complicações futuras. A importância do atendimento multidisciplinar deve ser ressaltada, incluindo geneticista, oncologista clínico, cirurgião, assim como avaliação psicológica e acompanhamento feito por enfermeira geneticista.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Birch JM, Blair V, Kelsey AM, Evans DGR, Harris M et al. Cancer Phenotype correlates with constitutional TP53 genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. *Oncogene*, 17:1061-8, 1998.
2. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*, 54:1298-304, 1994.
3. Chompret A. The Li-Fraumeni syndrome. *Biochimie*, 84:75-82, 2002.
4. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv*, 25:101-24, 1995.
5. Hainaut P. Tumor specific mutations in p53: The acid test. *Nature Medicine*, 8(1):21-2, 2002.
6. Li FP, Fraumeni JF. Rhabdomyosarcoma in children: an epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Nat Can Inst*, 43:1364-73, 1969.
7. Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG et al. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*, 48:5358-62, 1988.
8. Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*, 250:1233-8, 1990.
9. Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC TP53 database: New online mutation analysis and recommendation to users. *Hum Mutat*, 19:607-14, 2002.
10. Ribeiro RC, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 98:9330-5, 2001.
11. Sodha N, Houlston RS, Bullock S, Yuille MA, Chu C et al. Increasing evidence that germline mutations in CHEK2 do not cause Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat*, 20(6):460-2, 2002.
12. Strong LC. Hereditary Cancer: Lessons from Li-Fraumeni Syndrome. *Gynecologic Oncology*, 88:S4-7, 2003.
13. Varley JM. Germline TP53 Mutations and Li-Fraumeni Syndrome. *Human Mutation*, 21:313-20, 2003.
14. Varley JM, Evans DG, Birch JM. Li-Fraumeni syndrome—a molecular and clinical review. *Br J Cancer*, 76:1-14, 1997.
15. Venkatachalam S, Shi Y, Jones SN, Vogel H, Bradley A et al. Retention of wild-type p53 in tumors from p53 heterozygous mice: reduction of p53 dosage can promote cancer formation. *EMBO Journal*, 17:4657-67, 1998.

## 29.5 Síndromes de Cowden e Bannayan-Riley-Ruvalcaba

Mariana Morais Cajaiba

### INTRODUÇÃO

A síndrome de Cowden é caracterizada pela predisposição a lesões hamartomatosas e neoplasias benignas e malignas; tem herança autossômica dominante com mutações germinativas encontradas no gene supressor de tumor *PTEN* (10q22-23). Portadores da síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba compartilham características fenotípicas da síndrome de Cowden e também apresentam mutações germinativas, algumas idênticas, no gene *PTEN*. As duas síndromes são consideradas por alguns autores como variação fenotípica de uma mesma entidade (*PTEN-Defined Syndromes* ou *PTEN-Hamartoma Tumor Syndrome*). Ambas são segregadas por herança autossômica dominante; a síndrome de Cowden tem incidência estimada de 1:200.000 (provavelmente subestimada)<sup>4,7,9</sup>.

### QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO

Clinicamente, a síndrome de Cowden apresenta lesões mucocutâneas características, consideradas marcadores clínicos da síndrome; tratam-se de triquilemomas faciais, pápulas de mucosa oral (fibromas) e lesões hiperqueratósicas de extremidades. Os portadores da síndrome apresentam um risco elevado em relação à população geral para o desenvolvimento de neoplasias malignas, principalmente de mama e de tireóide, e também é descrito câncer de endométrio, rim e colo-retal. O carcinoma mamário, principalmente do tipo ductal, é a neoplasia maligna mais relatada na síndrome, acometendo até 50% das mulheres portadoras, com tumores bilaterais em um terço dos casos. Também estão presentes lesões benignas de mama e tireóide, pólipos de trato gastrointestinal, alterações ósseas, genitourinárias e neurológicas<sup>2,3,6</sup>. Os achados clínicos descritos na síndrome estão sumarizados na Tabela 29.5.1. A síndrome de Cowden mostra penetrância completa aos quarenta anos de idade, com manifestações presentes geralmente no início da terceira década de vida, aparentemente acometendo mais mulheres do que homens<sup>3,4,8,9</sup>.

Já a síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba é descrita como a associação de macrocefalia, múltiplos lipomas (subcutâneos e viscerais), hemangiomas viscerais e de partes moles, polipose gastrointestinal geralmente florida, lentiginose de genitália externa (considerada uma das lesões mais marcantes da síndrome), retardo mental leve e atraso no desenvolvimento neuropsicomotor. As manifestações geralmente ocorrem na infância, mas podem estar presentes já ao nascimento, e são relatados casos de ma-

crossomia fetal. Inicialmente, a síndrome não foi considerada como de risco elevado para desenvolvimento de neoplasias, assim como não constitui parte do espectro clínico da síndrome a presença de alterações mucocutâneas floridas como na síndrome de Cowden, porém são relatados casos onde estas alterações estão presentes, além de casos de bócio e fibroadenomas de mama, câncer de mama e tireóide<sup>5,7,8</sup>.

### CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

O diagnóstico da síndrome de Cowden é clínico, baseado em critérios bem definidos (Tabela 29.5.2)<sup>7</sup> que devem ser pesquisados em todos os casos suspeitos.

Para se estabelecer o diagnóstico clínico da síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, é necessária a presença de ao menos três dos quatro achados clínicos a seguir, considerados os mais característicos da síndrome: macrocefalia, lentiginose de genitália externa, lipomatose e hemangiomas<sup>5,7</sup>.

### O GENE *PTEN*

O gene supressor de tumor *PTEN* está localizado em 10q22-23, contém nove éxons e codifica uma fosfatase citoplasmática com 403 aminoácidos. A principal ação desta fosfatase é a desfosforilação do segundo mensageiro PIP3 (fosfoinositol 3,4,5 trifosfato), inibindo a proteína AKT, uma proteína-quinase responsável pela tradução de sinais de sobrevivência e proliferação celulares e inibição de apoptose. Assim, mutações deletérias na proteína *PTEN* levam à elevação nas concentrações intracelulares de AKT, com indução de proliferação celular e inibição de apoptose<sup>9</sup>. Nas síndromes de Cowden e Bannayan-Riley-Ruvalcaba, são descritos em *PTEN* os seguintes tipos de mutações germinativas: de ponto *missense* e *non-sense*, inserções e deleções *frameshift*, e mutações em sítios de *splicing*; também já foram descritas deleções grosseiras envolvendo todo o gene. A maioria das mutações descritas nas duas síndromes leva à proteína truncada, com perda ou redução da função. O éxon 5 é apontado como região de *hot-spot* por conter a maior parte (30 a 40%) das mutações deletérias descritas, e é a região que codifica o cento ativo da enzima fosfatase; em seguida ao éxon 5, os éxons 7 e 8 apresentaram grande parte das mutações deletérias<sup>1,9</sup>.

No gene *PTEN*, também foram encontradas mutações somáticas em tumores esporádicos (carcinomas de endométrio, ovário, próstata, mama, rim e tireóide, astrocitomas e melanomas)<sup>9</sup>.

**Tabela 29.5.1**  
**Achados Clínicos mais Frequentemente Descritos na Síndrome De Cowden**

#### Pele

- Triquilemomas (principalmente face).
- Queratoses acrais (incluindo *pits* palmo-plantares).
- Fibromas (principalmente mucosa oral).
- Lipomas.
- Hemangiomas.

#### Tireóide

- Bócio multinodular.
- Adenomas.
- Carcinoma não medular (principalmente subtipo folicular).

#### Mama

- Doença fibrocística.
- Fibroadenomas.
- Hiperplasia ductal.
- Ginecomastia (homens).
- Hipertrofia virginal.
- Papilomas.
- Alterações de aréola e mamilos.
- Carcinoma ductal.

#### Trato digestivo

- Pólipos acometendo todo o tubo digestivo (hiperplásicos, hamartomatosos, inflamatórios, adenomatosos).
- Carcinoma colo-retal.

#### Sistema nervoso

- Doença de Lhermitte-Duclos (gangliocitoma cerebelar displásico).
- Retardo mental.
- Meningioma (geralmente associado à doença de Lhermitte-Duclos).

#### Trato genitourinário

- Irregularidades menstruais.
- Leiomiomas.
- Malformações uterinas/ureterais.
- Adenocarcinoma de endométrio.
- Adenocarcinoma de células renais.

#### Osteoarticular

- Macrocefalia.
- Pectus excavatum.
- Cistos ósseos.
- Palato arqueado.

## CORRELAÇÕES GENÓTIPO-FENÓTIPO

A expressão das duas síndromes é bastante variável, e, conforme dito acima, muitos dos casos descritos na literatura apresentam características de ambas as síndromes<sup>5,7,8</sup>. Foram encontradas mutações idênticas em famílias com diagnósticos distintos de síndrome de Cowden e de Bannayan-Riley-Ruvalcaba, e também foram descritas famílias que compartilham os fenótipos das duas síndromes<sup>1,7-9</sup>.

A maioria dos pacientes do sexo feminino com síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba que apresentou mutações ger-

minativas em *PTEN* (principalmente mutações levando à proteína truncada) e desenvolveu fibroadenomas e/ou câncer de mama, características da síndrome de Cowden mais relatadas também em pacientes portadores desta com mutações identificadas. Também foi encontrada associação entre mutações em *PTEN* e fenótipo de lipomatose; não foi possível estabelecer uma relação fenótipo-genótipo para outras lesões, malignas e benignas, nas duas síndromes<sup>7,9</sup>.

De um modo geral, as mutações germinativas em *PTEN* são mais frequentes em famílias com síndrome de Cowden ou com sobreposição das duas síndromes, e menos frequentes

**Tabela 29.5.2**  
**Critérios para Diagnóstico da Síndrome de Cowden**

<i>Critérios Patognomônicos</i>	<i>Critérios maiores</i>	<i>Critérios Menores</i>
Lesões mucocutâneas	Carcinoma de mama	Outras lesões de tireóide (ex.: adenoma ou bócio multinodular)
Triquilemomas faciais	Carcinoma de tireóide (não medular) especialmente carcinoma folicular	Retardo mental ( QI ≤ 75)
Queratoses acrais	Macrocefalia (megalencefalia)	Hamartomas gastrointestinais
Pápulas papilomatosa	Doença de Lhermitte-Duclos	Doença fibrocística da mama
Lesões mucosas	Carcinoma endometrial	Lipomas
		Fibromas
		Tumores genitourinários (ex.: carcinoma de células renais, fibróides uterinos ou malformações)

*Diagnóstico operacional em um indivíduo*

1. Apenas lesões mucocutâneas se:
  - a) Seis ou mais pápulas faciais, das quais três devem ser triquilemomas ou
  - b) Pápulas cutâneas faciais e papilomatose de mucosa oral ou
  - c) Papilomatose de mucosa oral e queratoses acrais ou
  - d) Seis ou mais queratoses palmo-plantares
2. Dois critérios maiores, sendo um macrocefalia ou doença de Lhermitte-Duclos
3. Um critério maior e três menores
4. Quatro critérios menores

*Diagnóstico operacional em uma família com um indivíduo diagnóstico*

1. Critérios patognomônicos
2. Qualquer critério maior com ou sem critérios menores
3. Dois critérios menores

em famílias com fenótipo apenas de síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba<sup>4,7,9</sup>. As mutações no éxon 5 foram mais frequentemente relacionadas à síndrome de Cowden e ao fenótipo de neoplasia, sugerindo papel importante desta região na função supressora de tumor do gene<sup>8,9</sup>. Devido a maioria de as mutações germinativas estarem localizadas na porção C-terminal do gene ou 5' em relação ao centro ativo da enzima fosfatase (éxons 5, 7 e 8), foi sugerido que esta região do gene seria responsável por um fenótipo mais grave<sup>7,9</sup>.

**RASTREAMENTO CLÍNICO E GENÉTICO**

Não há consenso quanto aos exames de seguimento para afetados, sua periodicidade e idade de início, assim como exames de rastreamento para suspeitos. A literatura sugere exames de tireóide (clínico e ultra-sonografia) e dermatológico anualmente após os dezoito anos ou cinco anos antes do primeiro caso de câncer de tireóide na família, e avaliação anual de mamas (mamografia e/ou ultra-sonografia) após os trinta anos ou cinco anos antes do primeiro caso<sup>2,4</sup>.

A indicação de teste genético (através do seqüenciamento do gene *PTEN*) para confirmação de diagnóstico nas síndromes de Cowden e/ou Bannayan-Riley-Ruvalcaba deve ser feita em indivíduos que preenchem os critérios diagnósticos clínicos e em indivíduos com ao menos um parente de primeiro

grau afetado (seguindo os mesmos critérios). Após detecção da mutação, o exame deve ser oferecido aos parentes de primeiro grau adultos assintomáticos, previamente submetidos a aconselhamento oncogenético e a termo de consentimento informado, para excluirmos pacientes não-portadores do processo de rastreamento e oferecermos acompanhamento adequado aos portadores.

**CONCLUSÃO**

A importância clínica da síndrome reside principalmente no risco elevado de desenvolvimento de neoplasias e possibilidade de transmissão à prole, sendo necessário rastreamento cuidadoso de indivíduos em risco e aconselhamento genético oncológico. Neste aspecto, o teste molecular preditivo tem grande importância ao identificar os portadores, apresentando sensibilidade de 13 a 80% segundo a literatura para a síndrome de Cowden e aproximadamente 60% para a síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba<sup>7,9</sup>. É também importante o reconhecimento das síndromes de Cowden e Bannayan-Riley-Ruvalcaba como variações de um mesmo fenótipo, pesquisando alterações características de ambas nos pacientes suspeitos, e levando em consideração o provável risco para desenvolvimento de neoplasias na síndrome de Bannayan-Riley-Ruvalcaba<sup>5,7,9</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bonneau D, Longy M. Mutations of the human PTEN gene. *Hum Mut*, 16:109-122, 2000.
2. Eng C. Cowden syndrome. *J Genet Counsel*, 6(2):181-192, 1997.
3. Eng C. Genetics of Cowden syndrome: through the looking glass of oncology. *Int J Oncol*, 12:701-710, 1998.
4. Eng C. Will the real Cowden syndrome please stand up: revised diagnostic criteria. *J Med Genet*, 37:828-830, 2000.
5. Fargnoli MC, Orlow SJ, Semel-Concepcion J, Bologna JL. Clinicopathologic findings in the Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *Arch Dermatol*, 132(10):1214-1218, 1996.
6. Longy M, Lacombe D. Cowden disease: report of a family and review. *Ann Genet*, 39(1):35-42, 1996.
7. Marsh DJ, Kum JB, Lunetta KL, Bennett MJ, Gorlin RJ, Ahmed SF et al. PTEN mutation spectrum and genotype-phenotype correlations. In: Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome suggest a single entity with Cowden syndrome. *Hum Mol Genet*, 8(8):1461-1472, 1999.
8. Parisi MA, Dinulos MB, Leppig KA, Sybert VP, Eng C, Hudgins L. The spectrum and evolution of phenotypic findings in PTEN mutation positive cases of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome. *J Med Genet*, 38:52-58, 2001.
9. Waite KA, Eng C. Protean PTEN: form and function. *Am J Hum Genet*, 70:829-844, 2002.

## 29.6 Neoplasias Endócrinas Múltiplas

*Marilza Cristina Legrazie Ezabella  
Adriana Bezerra Nunes  
Delmar Muniz Lourenço Junior  
Sergio Pereira de Almeida Toledo*

### INTRODUÇÃO

As neoplasias endócrinas múltiplas são classificadas em dois grupos: tipo 1 (NEM1) e tipo 2 (NEM2). São síndromes complexas hereditárias caracterizadas pela ocorrência de distúrbios proliferativos diversos no tecido endócrino, variando desde hiperplasia até adenoma e carcinoma.

As glândulas envolvidas mais comumente nestas síndromes são a paratireóide, a hipófise, o pâncreas, as células parafoliculares da tireóide e a supra-renal. Postula-se que os tipos celulares envolvidos nos referidos tumores tenham um precursor embriológico comum no neuroectoderma.

As síndromes da neoplasia endócrina múltipla são transmitidas de modo autossômico dominante, mas pode haver uma variabilidade considerável na penetrância e incidências específicas do tumor entre famílias. As dosagens hormonais são usadas em conjunto com as características clínicas no diagnóstico desses distúrbios. Agora que alguns dos genes associados foram mapeados, existe a possibilidade de usar o teste genético para aprimorar o diagnóstico dos tumores endócrinos hereditários. Esta revisão irá descrever os principais aspectos clínicos e os avanços recentes no seu entendimento e estratégias terapêuticas.

### NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 1

#### CONCEITO

A Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1 (NEM1) é doença de ocorrência familiar ou pode apresentar-se como um caso “*de novo*”, ocorrendo igualmente em todas as etnias, raças, áreas geográficas e em ambos os sexos. A NEM1 é transmitida por um padrão de herança autossômico dominante com elevada penetrância e expressividade clínica variável<sup>13</sup>. Os aspectos clínicos e gênicos desta patologia foram recentemente revistos<sup>11</sup>. O diagnóstico clínico da NEM1 nos casos-índice requer o reconhecimento de tumores em pelo menos duas das três glândulas endócrinas-alvo principais (paratireóide, pâncreas endócrino/duodeno e hipófise). Para o diagnóstico de NEM familiar, é necessário o reconhecimento de um caso de NEM1, com, no mínimo, um parente em primeiro grau com tumor em pelo menos uma destas três glândulas endócrinas-alvo já citadas. Tumores neuro-endócrinos tímico/brônquicos e das glândulas adrenais (tumores não-secretores) também podem estar presentes<sup>3,12</sup>.

#### ETIOLOGIA

O gene da NEM1 foi clonado e seqüenciado em 1997<sup>4</sup>, está localizado no cromossomo 11, tem 9Kb e dez éxons, e

tanto o éxon 1 como 832 bases do éxon 10 não são traduzidos. O gene *MEN1* codifica transcrito de 2,8Kb correspondente à proteína *menin*, expressa em vários tecidos, de localização intranuclear, composta de 610 aminoácidos, não apresentando homologia com qualquer outra proteína já conhecida e que interage diretamente com o fator Jun-D<sup>1</sup>. Cerca de 300 mutações germinativas e/ou somáticas no gene *MEN1* foram descritas, não havendo *hot-spots* ou qualquer correlação genótipo-fenótipo. A maioria das mutações são *non-sense* ou *frameshift*, gerando uma proteína anômala e com perda de sua função supressora tumoral<sup>2,7</sup> (Fig. 29.6.1).

## QUADRO CLÍNICO

### Hiperparatireoidismo

O hiperparatireoidismo (HPT) é a manifestação clínica mais freqüente da NEM1 (80-100%) e sua primeira manifestação clínica em 85 a 100% dos casos<sup>15</sup>. O HPT/NEM1 difere do HPT esporádico por ser de aparecimento mais precoce, apresentar hiperplasia das quatro glândulas, não ter preferência sexual, estar associado a outros tumores e ter freqüente recidiva pós-cirúrgica. Seu diagnóstico não difere do HPT isolado<sup>3</sup>. O tratamento definitivo é cirúrgico; duas abordagens são utilizadas: paratireoidectomia total seguida por auto-enxerto e paratireoidectomia subtotal, mantendo tecido paratireoideo viável em região cervical<sup>3,11</sup>.

### Tumores Neuroendócrinos Pancreáticos

São a segunda lesão mais freqüente na NEM1 com prevalência em rastreamento clínico variando de 30 a 75%<sup>3</sup>.

### Gastrinoma

São tumores secretores de gastrina, podendo ser esporádicos ou relacionados a NEM1. Cerca de 25% dos casos são relacionados a NEM1<sup>3</sup>. É o tumor pancreático mais freqüente na NEM1, com penetrância de 30-50% aos 50 anos de idade.

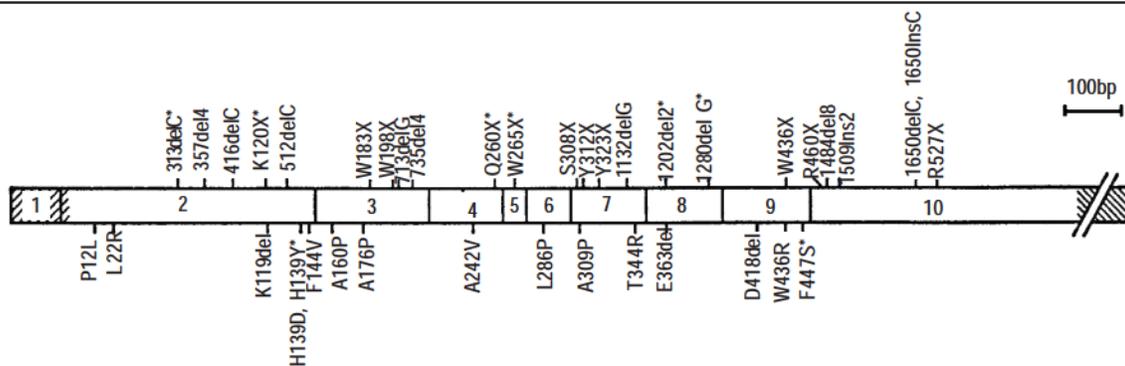
São malignos em pelo menos 60% dos casos. Os associados a NEM1 são considerados menos malignos que os esporádicos. O gastrinoma/NEM1 apresenta múltiplas tumorações pancreáticas, têm apresentação duodenal em 70% dos casos e é mais precoce<sup>13</sup>. Um terço dos casos apresenta associação de hipersecreção ácida gástrica (> 15mmol/hora) e hipergastrinemia (gastrina > 1.000pg/ml). Os dois terços restantes terão valores intermediários gastrinemia (100-1.000pg/ml). Nestes casos, a realização de testes funcionais provocativos (secretina, infusão de cálcio e refeição-padrão) são úteis no estabelecimento do diagnóstico<sup>13</sup>. No tratamento do gastrinoma/NEM1, tem-se como fundamental: 1) a utilidade do uso dos bloqueadores do receptor H-2 (para gastrinomas) e dos análogos da somatostatina para vários tumores neuroendócrinos pancreáticos, na prevenção da morbidade desta doença; 2) o tratamento cirúrgico é controverso devido à multiplicidade de nódulos e à malignidade destes tumores; seu estadiamento com exames de imagens é dependente da escolha da intervenção cirúrgica<sup>3</sup>.

### Insulinoma

É o segundo tumor pancreático mais prevalente (35%) na NEM1<sup>3</sup>. Uma pequena minoria (< 10%) de pacientes com insulinoma está relacionada a NEM1<sup>13</sup>. Eventualmente, pode ser a primeira manifestação clínica de NEM1, <sup>11</sup> usualmente é multifocal, enquanto a forma esporádica em 90% é solitária. Não há diferenças no diagnóstico clínico e laboratorial de insulinoma/NEM1 e insulinoma esporádico<sup>11</sup>.

### Adenomas Hipofisários

Os tumores hipofisários relacionados a NEM1 usualmente são detectados entre 17 e 65 anos com predomínio na quarta década, não diferindo assim dos tumores esporádicos (13-75 anos). Em geral, menos de 5% dos adenomas hipofisários e 2 a 3% dos prolactinomas são relacionados a NEM1<sup>13</sup>. Podem ser a primeira manifestação clínica de NEM1 em 10 a 25% dos casos<sup>3,11</sup>. A prevalência de tumores hipofisários na



**Fig. 29.6.1** — Representação esquemática do gene *MEN1*. As áreas escuras representam porções do gene não traduzidas. Mutações de 47 famílias com NEM1 e oito casos de NEM1 "de novo" são ilustrados, sendo 13 mutações frameshift e 11 non-sense (acima do diagrama) e três deleções in-frame e 13 missense (abaixo do diagrama). Mutações em NEM1 "de novo" estão indicadas com asterisco. Oito mutações na NEM1 familiar foram encontradas mais de uma vez (modificado de Agarwal e col, 1997)<sup>2</sup>.

NEM1 é variável. O diagnóstico de adenomas hipofisários/NEM1 segue os mesmos padrões dos adenomas esporádicos<sup>13</sup>. Os prolactinomas são os mais freqüentemente associados a NEM1 (76%), seguidos por somatotropinomas (8%), de ACTH (6%) e adenomas não-funcionantes (6%)<sup>13</sup>. Os tumores relacionados a NEM1 diferem dos esporádicos por apresentarem menor incidência de adenomas secretores de gonadotrofinas e de adenomas cromóforos; pela maior incidência de prolactinomas e de adenomas plurihormonais; e por serem multicêntricos<sup>13</sup>. O tratamento dos tumores hipofisários na NEM1 não difere daquele empregado para tumores hipofisários esporádicos<sup>3</sup>.

### Tumor Carcinóide Tímico e Brônquico

A maioria dos estudos revela uma incidência de 7% de tumor carcinóide na NEM1. Quando consideramos os tumores carcinóides tímicos em geral, observa-se que 25% deles são relacionados a NEM1, o que sugere que todo paciente com tumor carcinóide tímico deveria ser rastreado para NEM1. O grau de malignidade dos tumores carcinóides brônquicos é de 26%, não diferindo dos esporádicos (22%). Os tumores carcinóides tímicos, tanto esporádicos quanto relacionados a NEM1, apresentam elevado grau de malignidade (90%). O tratamento de escolha é a cirurgia<sup>13,16</sup>.

### RASTREAMENTO CLÍNICO

Recentemente, um protocolo de rastreamento clínico foi sugerido, já considerando a descoberta do gene e o rastreamento gênico dos familiares sob risco de NEM1. Este protocolo é direcionado a indivíduos portadores de mutação germinativa no gene *MEN1* e para aqueles sob risco nos quais não se pôde detectar a mutação. Devido à elevada penetrância da doença, o rastreamento clínico é preconizado por toda a vida para os portadores de mutação no gene *MEN1*. Este rastreamento inclui dosagens anuais de: PTH, cálcio, gastrina, secreção ácida, glicose, insulina, glucagon, prolactina e IGF-1. Além disto, a cada três anos há recomendação de estudo por imagem: TC, RNM, octreoscan, ultra-som endoscópico, dos órgãos de maior risco<sup>15</sup>.

### RASTREAMENTO GENÉTICO

As recomendações para a realização de análise de mutações no gene *MEN-1* estão sendo desenvolvidas. Dentre os candidatos devem ser incluídos: casos-índice de NEM1 e parentes sob risco, e neste último grupo a abordagem deverá ser direcionada primeiramente para: a) parentes em primeiro grau; b) casos-índice que tenham achados clínicos sugestivos de NEM1, mas que não possam ser incluídos nos critérios diagnósticos de NEM1 como por exemplo: tumores múltiplos de paratireóide antes da idade de 30 anos ou tumores neuroendócrinos pancreáticos múltiplos em qualquer idade<sup>15</sup>.

Como exemplo de rastreamento gênico, estamos utilizando em nosso meio o método do DGGE no estudo gênico da NEM1<sup>9-11</sup>. Na Fig. 29.6.2 mostramos padrão eletroforético de heterozigose por nós encontrado no éxon 2 do gene *MEN1*

de uma extensa família brasileira. O seqüenciamento gênico revelou uma mutação gênica: uma deleção de citosina no códon 67 do éxon 2 do gene *MEN1*.

Recentemente, Brandi e col.<sup>3</sup> relataram os resultados de Consenso sobre NEM1 (e NEM2) que fixa as normas básicas para o diagnóstico e tratamento. Propõe-se: a) seguimento anual bioquímico associado a seguimento com exames de imagem a cada três anos; b) paratireoidectomia total ou subtotal, criopreservação das paratireóides e timectomia preventiva; c) uso de inibidores de bomba de próton no controle da hipersecreção de gastrina e análogos da somatostatina nos gastrinomas e em outros tumores pancreáticos relacionados a NEM1; d) cirurgia é o tratamento de escolha nos casos de hipoglicemia devido à insulinoma; e) há controvérsias quanto a indicação de tratamento cirúrgico e protocolo cirúrgico em relação aos gastrinomas, o mesmo ocorrendo com pacientes assintomáticos com tumores êntero-pancreáticos relacionados a NEM1; f) todos casos familiares de NEM1 parecem ter mutação gamética inativadora no gene *MEN1*; g) a caracterização gênica é fundamental, mas raramente orienta para conduta cirúrgica (como ocorre na NEM2).

## NEOPLASIA ENDÓCRINA MÚLTIPLA TIPO 2

### CONCEITO

O termo Neoplasia Endócrina Múltipla do tipo 2 (NEM2) refere-se a um grupo de síndromes tumorais, de herança autossômica dominante, com alto grau de penetrância e expressividade variável, que são clinicamente distintas. O aspecto comum a elas é a presença do carcinoma medular de tireóide (CMT).

Essa variabilidade no fenótipo tornou necessária uma classificação operacional<sup>6</sup> com pelo menos três subtipos principais, baseando-se na ocorrência de outras patologias. Quando a tendência ao CMT é expressa como o único fenótipo tumoral na família, estando presente em mais de quatro indivíduos, denomina-se Carcinoma Medular de Tireóide Familiar (CMT-F). Quando o CMT é, dentro de uma família, associado a hiperparatireoidismo (HPT) e/ou feocromocitoma (FEO),

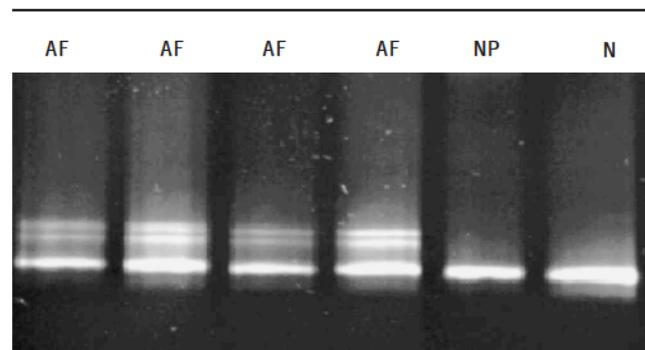


Fig. 29.6.2 — Gel de poliacrilamida a 7,5% ilustrando padrão de bandas obtido ao DGGE: os casos afetados (AF) apresentam três bandas eletroforéticas (padrão anormal). O indivíduo controle-normal (N) e o familiar não-portador (NP) da mutação gênica, ambos apresentam uma única banda (padrão normal)<sup>10,12</sup>.

classifica-se como NEM2A. A NEM2B compartilha a predisposição herdada ao CMT e FEO que ocorre na NEM2A, porém com diferenças clínicas: o paciente NEM2B tende também a ter neuromas mucosos, ganglioneuromas intestinais, hábito marfanóide e o HPT é raro. Nesta última manifestação fenotípica, o CMT costuma ser mais precoce e agressivo que na NEM2A e CMTF.

A associação em algumas famílias entre NEM2 e doença de Hirschsprung, bem como NEM2 e Líquen amilóide cutâneo, propiciou a inclusão destas patologias dentro do espectro NEM2.

A NEM2 é pouco freqüente: 20 a 25 casos novos/ano no Reino Unido<sup>17</sup>. Em geral, manifesta-se como NEM2A (60-90% dos casos), sendo a NEM2B uma forma bastante rara (2-5%). O diagnóstico de CMT-F é feito em 35% dos casos. O diagnóstico de NEM2 é construído a partir da suspeita clínica pela expressão dos tumores, história familiar e confirmado pelo teste genético.

## QUADRO CLÍNICO

Em geral, as características clínicas e bioquímicas dos tumores componentes das síndromes NEM2 não diferem expressivamente daquelas de cada tumor quando este ocorre isoladamente; por isso, esses aspectos serão citados apenas brevemente. Por sua vez, a concomitância de múltiplas endocrinopatias pode ter implicações específicas para o tratamento. A identificação de tumores familiares em uma faixa etária inferior a dos casos esporádicos possivelmente decorre do alto grau de suspeita clínica e triagem dos indivíduos sob risco. Contudo, destaca-se na história familiar a detecção de mutação “*de novo*” em 50% dos pacientes NEM2B, o que é bem diferente dos 95% dos NEM2A que apresentam sempre um dos pais afetados. Para o diagnóstico de CMT-F é fundamental o antecedente de, no mínimo, quatro casos de CMT na família, e os achados genéticos justificam a preocupação com esse critério.

### Carcinoma Medular de Tireóide

O CMT desenvolve-se nas células C da tireóide, derivadas da crista neural e não relacionadas embriologicamente com as células foliculares da tireóide. A hiperplasia de células C e a multicentricidade do CMT são características de distinção entre forma esporádica e hereditária. Vários hormônios e aminas biogênicas são secretados pelo CMT, e o mais importante é a calcitonina, cuja dosagem sérica serve como excelente marcador tumoral para diagnóstico e acompanhamento. Testes de estímulo para calcitonina são usados para detectar a presença de hiperplasia de células C, a lesão primordial<sup>17</sup>. A evolução de hiperplasia de células C para CMT microscópico tem duração de tempo variável, e não se sabe em que ponto desta evolução as metástases iniciam. Cerca de 50% dos indivíduos com nódulos palpáveis já apresentam metástases cervicais. Essas metástases podem ocorrer em linfonodos cervicais e mediastinais ou em órgãos à distância principalmente cérebro, pulmões, fígado e ossos. É importante ressaltar que 25% dos pacientes com metástases ganglionares

cervicais, sem evidência de outras metástases à distância, podem ser curados por uma ressecção cirúrgica com esvaziamento ganglionar cervical, salientando a importância nessa doença do diagnóstico realizado num estágio precoce.

### Feocromocitoma

O FEO ocorre em 50% dos pacientes NEM2A e NEM2B. Algumas peculiaridades podem ter implicações na investigação diagnóstica e estratégia terapêutica. Quando associado a NEM2, o FEO é bilateral em mais de 50% dos casos. Inclusive, em virtude da multicentricidade característica da NEM2, acredita-se que potencialmente todos os casos apresentariam envolvimento bilateral, embora não sincrônico entre as glândulas. Outro ponto importante é a localização invariável do FEO na medula adrenal. Os raros relatos de FEO extra-adrenal nessa síndrome surgem de restos de tecido adrenal ou representam recorrência de um FEO na região anatômica da glândula adrenal. Este tecido expressa a enzima feniletanolamina-N-metil-transferase, que catalisa a metilação da noradrenalina para adrenalina. Por conseguinte, o tipo de catecolamina mais produzido pelo FEO associado ao NEM2 é a adrenalina, ocasionando a clínica de palpitações, nervosismo, inquietação e ausência de hipertensão. É incomum o FEO preceder o desenvolvimento do CMT ou ser a manifestação inicial do NEM2, e alguns autores sugerem que os FEO familiares podem ter comportamento mais indolente e menos sintomático que as variantes esporádicas. O rastreamento deve ser feito anualmente até os 35 anos, basicamente com dosagens urinárias de catecolaminas e metanefrinas, embora as medidas de metanefrinas e normetanefrina plasmáticas sejam mais sensíveis<sup>5</sup>. A maioria dos autores concorda que a avaliação por imagens (tomografia, ressonância magnética e 131-meta-iodo-benzilguanidina) deve ser reservada para quando existir alteração bioquímica.

### Hiperparatireoidismo

A baixa freqüência — apenas 25% dos casos — torna difícil estudar a história natural do HPT na NEM2. Clinicamente, é semelhante ao HPT esporádico, embora seja observada uma maior freqüência de HPT assintomáticos na NEM2. A hiperplasia de múltiplas paratireóides é mais freqüentemente encontrada que adenomas múltiplos. O diagnóstico é estabelecido pelo achado PTH sérico alto ou inapropriadamente normal na presença de hipercalcemia.

### Líquen Amilóide Cutâneo

Lesão cutânea descrita como pruriginosa e pigmentada na região interescapular ou superfícies extensoras da extremidade, com deposição amilóide no local. Talvez resulte de uma neuropatia primária.

### Doença de Hirshsprung

Ausência congênita dos gânglios autonômicos intestinais, que se apresenta geralmente como obstrução intestinal neonatal grave.

## ASPECTOS GENÉTICOS

A causa genética dessas síndromes envolve mutações no proto-oncogene *RET*, no locus 10q11.2. O gene *RET* estende-se por 50kb e contém 21 éxons, todos codificantes<sup>8</sup>. A proteína RET é um receptor tirosina-quinase envolvido na regulação do crescimento, sobrevida, diferenciação e migração de células da linhagem da crista neural. Vários fatores neurotróficos têm sido identificados como ligantes de RET: GDNF, Nerturina, Persepina e Artemina, e co-ligantes: GFR- $\alpha$ 1, GFR- $\alpha$ 2, GFR- $\alpha$ 3 e GFR- $\alpha$ 4. Não obstante a necessidade deste tetrâmero complexo para ativar a sinalização via RET, as mutações associadas a NEM2 têm sido encontradas apenas no gene *RET* (Fig. 29.6.3).

Apesar de todos os éxons serem codificantes, as mutações ativadoras causadoras de NEM2 se agrupam em éxons de regiões de particular importância para a função da molécula. Assim, na região extracelular, o domínio rico em cisteínas, fundamental para que ocorra a ligação ao ligante e dimerização, pré-requisito para ativação, é onde estão 80% das mutações relacionadas a NEM2. As demais mutações descritas estão em sítios de função catalítica tirosina-quinase ou em alça de reconhecimento de substrato intracelular

A localização da mutação no gene *RET* apresenta uma relação com a expressão do subtipo clínico. Deste modo, a maioria das mutações relacionadas a NEM2A e CMT-F são substituições das cisteínas nos éxons 10 e 11. Particularmente, a mutação na cisteína 634, éxon 11, é a mais frequentemente encontrada e tem sido associada ao surgimento de FEO e HPT<sup>14</sup>. A mutação Met918Thr, no éxon 16, localizada no domínio tirosina-quinase alterando a especificidade do substrato intracelular, está associada às características fenotípicas

NEM2B. Mutações nos éxons 13, 14 e 15 (códon 768, 804, 891) têm sido descritas em fenótipos CMT-F.

A relação genótipo/fenótipo tem sido direcionada para a idade ao diagnóstico e a presença de metástases, que são importantes fatores prognósticos, conforme já descrito. Além disso, estudos *in vitro* demonstram diferenças na ativação oncogênica de acordo com o tipo de mutação. Isso permite uma classificação na literatura das mutações como de alto risco: 611, 618, 629 e 634, que são mutações nas quais se recomenda intervenção terapêutica mais precoce, e outras consideradas de menor risco, nos códon 609, 768, 790, 791, 804 e 891, geralmente com início mais tardio da doença e, especula-se, cuja tireoidectomia poderia ser postergada.

## ASPECTOS TERAPÊUTICOS

No que diz respeito ao tratamento, continua válido que a oportunidade de cura existe quando a cirurgia é realizada num estágio precoce da doença. Os protocolos de radioterapia e quimioterapia convencionais não alcançam boa resposta, bem como alguns variantes. Expectativas promissoras em relação à terapia gênica têm surgido com a divulgação de estudos experimentais<sup>18</sup>.

A indicação de tireoidectomia em indivíduo portador de mutação do gene *RET* tem sido muito discutida. A maioria dos grupos recomenda a intervenção, apoiada pelos relatos de metástases em crianças com idade inferior a cinco anos. Esse argumento sobrepujou os receios pelo risco cirúrgico nesta faixa etária. A indicação é preferencialmente baseada em resultados de análise genética. Assim, para mutações de alto risco, o último consenso define a idade ideal para cirurgia como cinco anos para NEM2A e um ano para NEM2B<sup>3</sup>.

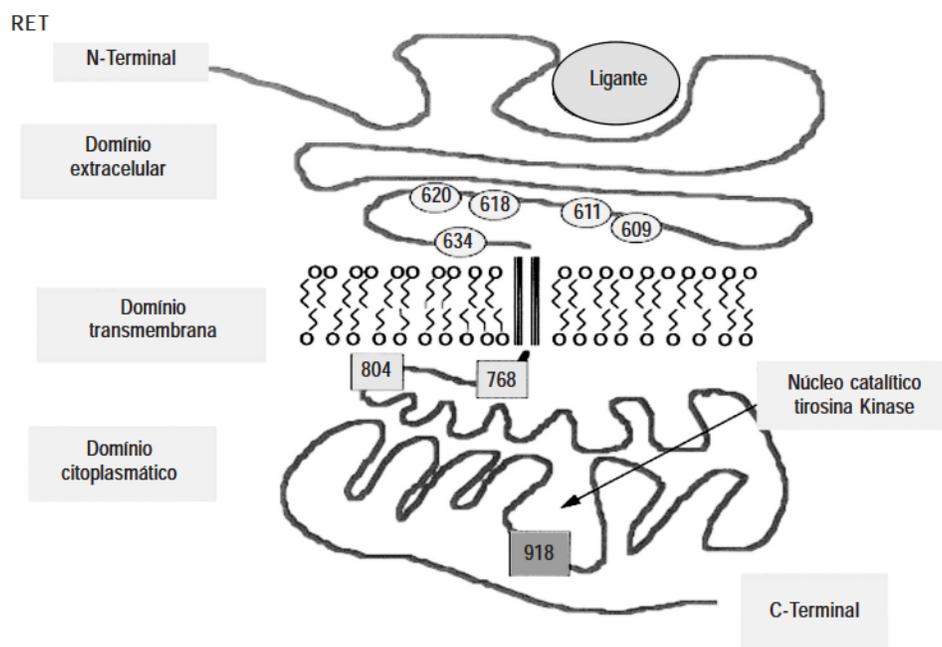


Fig. 29.6.3 — Representação gráfica dos domínios da proteína RET e da localização das mutações mais frequentes associadas a NEM2.

## CONCLUSÕES

O modelo da NEM2 é ímpar, oferecendo vários aspectos patogênicos fascinantes dentro do contexto dos estudos de oncogênese molecular. Certamente o que coloca a NEM2 numa posição especial em relação a outras síndromes genéticas é a utilidade da informação molecular na decisão terapêutica. Excluir do seguimento clínico 50% dos membros familiares sem a mutação é um aspecto muito importante, mas, sem dúvida, a transformação do prognóstico da doença pela identificação dos genótipos mutantes tem sido o resultado de maior impacto<sup>3</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM. Menin interacts with the AP1 transcription factor jun D and represses jun-D-activated transcription. *Cell*, 96:143-52, 1999.
2. Agarwal SK, Kester MB, Debelenko LV, Heppner C, Emmert-Buck MC, Skarulis MC. Germline mutations of the MEN-1 gene in familial Multiple Endocrine Neoplasia Type 1 and related states. *Hum Mol Genet*, 6:1169-75, 1997.
3. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, Bilezikian JP, Beck-Peccoz P, Bordi C et al. Consensus: Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 type 2. *J Clin Endocrinol Metab*, 86(12):5658-71, 2001.
4. Chandrasekharappa SC, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Collins FS, Emmert-Buck MR et al. Positional cloning of the gene for Multiple Endocrine Neoplasia-Type 1. *Science*, 276:404-7, 1997.
5. Eisenhofer G, Lenders JW, Linehan VM et al. Plasma normetanephrine and metanephrine for detecting pheochromocytoma in von Hippel-Lindau disease and multiple endocrine neoplasia type 2. *N Eng J Med*, 340:1872, 1999.
6. Eng C. The RET proto-oncogene in multiple endocrine neoplasia type 2 and Hirschsprung's disease. *N Eng J Med*, 335:943-951, 1996.
7. Hoff AO, Cote GJ, Gagel RF. Multiple Endocrine Neoplasias. *Ann Rev Physiol*, 62:377-411, 2000.
8. Jhian SM. The RET proto-oncogene in human cancers. *Oncogene*, 19:5590-97, 2000.
9. Lourenço DM, Toledo SPA. Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1. In: Cukiert A, Liberman B, Neuroendocrinologia Clínica e Cirúrgica. Ed. Lemos, 577-602, 2002a. N.R.: não tem a cidade?
10. Lourenço DM, Changling D, Mackowiak IIF, Cordeiro AC et al. Multiple endocrine neoplasia Type 1: Clinical and genetic studies of a large Brazilian family. The Endocrine Society's 84th annual meeting, P1-675, 310-11, 2002b.
11. Lourenço DM. Neoplasia endócrina múltipla Tipo 1: estudo clínico e gênico de uma grande família brasileira. Tese de Doutorado, FMUSP, 2001.
12. Marx SJ, Agarwal SK, Heppner C, Kim YS, Kester MB, Goldsmith PK et al. The Gene for Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *Bone*, 25(1):9-22, 1999.
13. Metz DC, Jensen RT, Bale AE, Skarulis MC, Eastman RC, Nieman L et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type I: clinical features and management. In: Bilezikian JP, Levine MA, Marcus R. The Parathyroids. Raven Press Ltd, New York, 591-646, 1994.
14. Nunes AB. Identificação de mutações no proto-oncogene RET associadas à forma hereditária do carcinoma medular de tireóide. Tese de Doutorado, FMUSP, 2002.
15. Schussheim DH, Skarulis MC, Agarwal SK, Simonds WF, Burns AL et al. Multiple Endocrine Neoplasia Type 1: new clinical and basic finding. *Trends Endocrinol Metab*, 12(4):173-8, 2001.
16. Teh BT. Thymic carcinoids in Multiple Endocrine Neoplasia Type 1. *J Int Med*, 243:501-04, 1998.
17. Toledo SPA, Abelin NMA, Ezabella MCL, Hayashida CT, Dahia PL. Neoplasias Endócrinas Múltiplas. In: BL Wajchenberg (ed). Tratado de Endocrinologia Clínica. Roca, N.R.: não tem a cidade? 944-964, 1992.
18. Yamazaki M, Zhang R, Straus FH, Messina M, Robinson BG et al. Effective gene therapy for medullary thyroid carcinoma using recombinant adenovirus inducing tumor-specific expression of interleukin-12. *Gene Ther*, 9(1):64-74, 2002.

## 29.7 Doença de Von Hippel-Lindau

*José Cláudio Casali da Rocha*

## INTRODUÇÃO

Desde 1864, alguns oftalmologistas começaram a relatar que lesões angiomasas da retina podiam ocasionar a perda da visão e algumas vezes estavam associadas a lesões

semelhantes no cerebelo. Somente em 1904 a natureza familiar dos angiomas de retina foi reconhecida pelo oftalmologista alemão Eugen von Hippel (1867-1938) que denominou estas lesões de *angiomatosis retinae*. No entanto, foi o patologista sueco Arvin Lindau que em 1927 relatou que o heman-

gioblastoma (HB) de cerebello e o angioma de retina (AR) apresentavam a mesma morfologia sugerindo um mecanismo patogênico semelhante, comum a esses tumores e de causa hereditária. A associação com outros tumores, como carcinoma de células claras do rim (CR), feocromocitoma (FE), tumores pancreáticos e cistoadenoma do epidídimo, entre outros, vem sendo relatada na literatura apenas nas últimas décadas do século XX. A primeira revisão da literatura veio com o clássico estudo de Melbon e Rosen (1964) que estabeleceu os critérios diagnósticos clínicos utilizados até hoje e descreveu uma família extensamente afetada pela síndrome por eles denominada de “Von Hippel-Lindau” (VHL)<sup>11</sup>.

A doença de Von Hippel-Lindau (VHL) é uma doença hereditária multissistêmica, causada por mutação no gene *VHL* que predispõe o portador a manifestações benignas e malignas em diversos órgãos. O início dos sintomas pode ocorrer a partir dos primeiros anos de vida e inclui, entre outros, angioma de retina; hemangioblastoma (HB) de sistema nervoso central (SNC); feocromocitoma (FE); carcinoma renal do tipo células claras (CR) e cistos múltiplos renais, pancreáticos, hepáticos e de epidídimo.

O diagnóstico clínico baseia-se em critérios que consideram a história familiar e a apresentação clínica das lesões. Muitas vezes, o diagnóstico é dificultado ou retardado até que estes critérios sejam preenchidos. A idade do início da doença é variável e depende da expressividade da doença no indivíduo e da intensidade do rastreamento de lesões assintomáticas. Assim, um programa de rastreamento intensivo pode aumentar significativamente o número de indivíduos afetados na família. O aconselhamento genético e os avanços dos métodos de diagnóstico e de tratamento vêm mudando o curso desta enfermidade com a diminuição da morbidade e da mortalidade, contribuindo para a melhoria da qualidade de

vida das famílias afetadas por esse mal e para o entendimento da doença<sup>1</sup>.

## QUADRO CLÍNICO

A doença de VHL é uma doença multissistêmica e de apresentação clínica variada. Uma característica peculiar desta síndrome é a combinação de tumores malignos e benignos em mais de dez órgãos-alvo diferentes. As manifestações clínicas podem ocorrer ao longo de toda a vida do indivíduo. Aproximadamente 60,2% dos pacientes desenvolvem HB cerebelar; 41%, AR; 25,3%, carcinoma renal de células claras (CR); 14,5%, HB espinhal e 14,5%, FE (Fig. 29.7.1). Relativamente, poucos pacientes desenvolvem todas as manifestações da doença e cerca de 50% dos pacientes têm apenas uma manifestação. Os cistos são, na grande maioria das vezes, assintomáticos e representam os achados clínicos mais frequentes. Afetam principalmente o rim e o pâncreas e são geralmente múltiplos<sup>7</sup>.

A seguir, são discutidas as manifestações mais características da doença de VHL.

## ANGIOMA DE RETINA

O AR é geralmente a manifestação mais precoce da doença. O AR é indistinguível morfologicamente do HB do cerebello sendo de apresentação comum na doença VHL, com idade média de diagnóstico aos 25 anos (variando de 1 a 67 anos). O oftalmologista tem um papel crítico no diagnóstico da doença, uma vez que 43% dos pacientes apresentam AR como primeira manifestação clínica. Apesar de ser frequentemente assintomático, o AR pode causar danos visuais graves à medida que atinge maiores proporções ou quando está

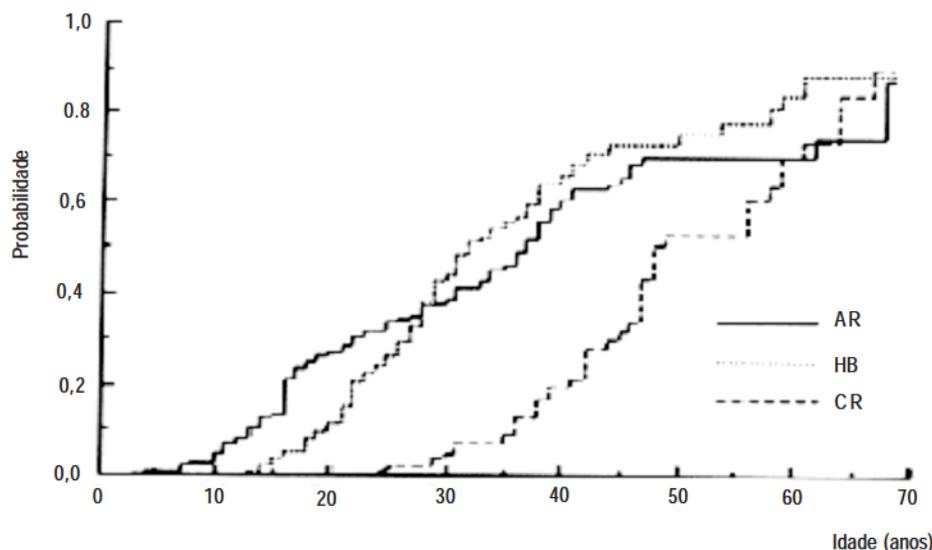


Fig. 29.7.1 — Incidência cumulativa dos casos de angioma de retina (AR), hemangioblastoma (HB) do SNC e de carcinoma renal do tipo células claras (CR) pela idade do diagnóstico destas lesões (adaptado de Choyke e col. (1995)<sup>1</sup>.

localizado centralmente. O tratamento consiste na fotocoagulação a laser para lesões diagnosticadas precocemente, crioterapia para lesões maiores, e enucleação nos casos graves<sup>8</sup>.

## HEMANGIOBLASTOMA DO SNC

Os HB do SNC localizam-se preferencialmente no cerebelo, na medula espinhal e mais raramente no cérebro. Apenas 2% dos HB do SNC ocorrem no parênquima cerebral. Clinicamente, o HB na doença de VHL desenvolve-se quase invariavelmente antes dos 50 anos, e a idade média de diagnóstico é aos 29 anos (variando de 11 a 78 anos). Os HB tendem a ocorrer de forma múltipla, e frequentemente apresentam componentes císticos e sólidos. Devido ao seu crescimento lento, muitas vezes são assintomáticos. Os sintomas podem ser intermitentes como cefaléia, vertigem, vômito, ataxia, fala arrastada, nistágmo, dismetria e paralisia do nono par craniano, até quadros neurológicos agudos graves com perdas sensoriais e motoras dependendo da localização da lesão. O tratamento primário das lesões sintomáticas consiste na exérese cirúrgica da lesão. Em casos especiais, os tratamentos com radioterapia ou radiocirurgia têm sido utilizados para o controle da progressão das lesões<sup>8</sup>.

## CARCINOMA RENAL

O tipo histológico dos CR de pacientes com VHL é tipicamente de células claras e em 35% das vezes se apresentam clinicamente com componente cístico. A idade média do diagnóstico é aos 37 anos, variando de 16 a 76 anos. O CR, associado à doença de VHL, ocorre em uma idade menor quando comparado com o seu correspondente esporádico (em torno dos 62 anos), é mais frequentemente bilateral (mais de 75% dos pacientes portadores de VHL) e multicêntrico em 87% dos casos. Além disso, o CR da doença de VHL parece apresentar uma taxa de crescimento menor e metástase mais tardia em relação à forma esporádica (não hereditária)<sup>1,8</sup>.

## LESÕES PANCREÁTICAS

Lesões pancreáticas, incluindo cistos, cistoadenomas, tumores neuroendócrinos, adenocarcinoma, hemangioblastoma e metástase de carcinoma renal, têm sido descritas associadas a VHL<sup>1</sup>. Recentemente, o envolvimento pancreático na evolução da doença foi estudado em 158 pacientes consecutivos pertencentes a 94 famílias francesas. O envolvimento pancreático foi observado em 77,2% dos pacientes e incluíam cistos pancreáticos (91,1%), tumores neuroendócrinos (12,3%) e lesões combinadas (11,5%). O pâncreas foi o único órgão afetado em 7,6% dos pacientes. As lesões pancreáticas necessitaram de intervenção cirúrgica em apenas 8,2%, quando sintomáticas ou para ressecção de tumores neuroendócrinos<sup>5</sup>.

## FEOCROMOCITOMA

As famílias que apresentam fenótipo associado à FE frequentemente desenvolvem o FE antes de outras manifestações da doença. A média de idade ao diagnóstico do FE em

VHL é de  $29 \pm 14$  anos (variando de 5 a 62 anos). Frequentemente, o FE é bilateral (cerca de 42%), podendo apresentar-se como tumor extra-adrenal (paraganglioma) ou mesmo como um FE maligno<sup>1</sup>.

## OUTRAS MANIFESTAÇÕES

O cistoadenoma do epidídimo ocorre em 10 a 26% dos pacientes com VHL. Tumores de saco endolinfático têm sido descritos em associação com VHL em 11% dos pacientes ocasionando perda auditiva, zumbido e paresia (N.R.: não seria paralisia?) facial e, portanto, devem ser considerados no rastreamento clínico dos indivíduos com diagnóstico de VHL<sup>9</sup>. Manifestações paraneoplásicas podem ocorrer, como policitemia secundária associada ao HB do cerebelo (5 a 20%) ou ao tumor renal. Recentemente, a presença de mutações germinativas no gene *VHL* em pacientes com policitemia congênita sugerem que este quadro seja uma das formas variantes da doença de VHL<sup>13</sup>.

## ASPECTOS GENÉTICOS

A doença de VHL tem sido encontrada em todos os grupos étnicos. Estudos epidemiológicos revelaram uma incidência de 1/39.000 a 1/53.000 nascimentos e uma prevalência de 1/31.000 a 1/85.000. Devido à raridade e à diversidade clínica desta doença, é provável que muitos casos sejam subestimados. A penetrância é de 97% em torno dos 60 anos. A síndrome VHL é hereditária e segue um padrão de herança autossômico dominante, afetando igualmente ambos os sexos e predispondo a prole a uma chance de 50% de herdar um alelo com mutação de um dos pais com a doença.

Ocasionalmente, uma mutação *de novo* no gene ocorre na ovogênese, espermatogênese ou mesmo nas fases iniciais da embriogênese, dando origem a um indivíduo afetado cujos pais não são afetados pela doença VHL. A incidência estimada de mutação *de novo* é menor que 5% das mutações detectadas. Porém, estudos recentes com detecção de mutação germinativa em tumores “aparentemente esporádicos” sugerem que este número seja maior.

A suspeita de que o gene implicado na doença de VHL poderia estar situado no braço curto do cromossomo 3 veio através do estudo de famílias com CR hereditário, cujos membros afetados apresentavam na análise do cariótipo uma quebra no braço curto do cromossomo 3 e translocação do segmento quebrado para o cromossomo 8. Este achado levou aos estudos genéticos de ligação (*Linkage*) com foco no cromossomo 3 nas décadas de 1980 que resultaram na localização do gene na região 3p25-26. Em 1993, o gene *VHL* foi identificado por pesquisadores no Instituto Nacional do Câncer (NCI) nos Estados Unidos<sup>6</sup>. Desde então, enormes avanços vêm sendo alcançados no entendimento da fisiopatologia e da tumorigênese desta doença.

## CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Embora muitas vezes os testes genéticos sejam de enorme valor para o diagnóstico de VHL, os critérios diagnósti-

cos utilizados para a doença de VHL são essencialmente baseados nos achados clínicos. Na presença de uma história familiar positiva para a doença de VHL, o diagnóstico clínico pode ser feito pela identificação de uma única manifestação característica da síndrome: AR, HB do SNC, tumores renais, FE, cistos pancreáticos múltiplos, ou cistoadenoma papilífero de epidídimo. Na ausência de história familiar, é necessário o diagnóstico de pelo menos duas lesões características, e uma delas deve ser AR ou HB do SNC<sup>11</sup>. Os cistos renais e de epidídimo são muito frequentes na população geral para serem considerados sinais confiáveis para o diagnóstico de VHL e, portanto, não devem ser considerados lesões características.

## CLASSIFICAÇÃO DE VHL E CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Em decorrência da sua enorme heterogeneidade clínica, a síndrome VHL tem sido classificada pela ausência ou presença de FE na família em VHL tipo 1 e VHL tipo 2 (7 a 20%), respectivamente. Posteriormente, a observação de que as famílias com VHL tipo 2 (com FE) cursavam com espectros clínicos diferentes dependendo do tipo de mutação permitiu a subdivisão em: tipo 2A (com FE, com AR e/ou HB, sem CR); tipo 2B (com FE, com AR e/ou HB, com CR); e tipo 2C (com FE, sem AR e/ou HB, sem CR)<sup>17</sup>. A policitemia congênita associada com mutações germinativas no gene *VHL* tem sido recentemente classificada como VHL tipo 3<sup>13</sup>.

As evidências que justificam esta classificação foram baseadas na correlação entre o genótipo e o fenótipo apresentado por estas famílias. As famílias com VHL tipo 1 frequentemente apresentam grandes deleções e mutações pontuais que causam uma terminação prematura da transcrição gênica (microdeleções e inserções e mutações *non-sense*) resultando em uma proteína truncada, enquanto 96% do grupo com VHL tipo 2 apresentam mutações do tipo *missense*<sup>3</sup>.

## O GENE VHL

O gene *VHL* (3p25-26) foi clonado em 1993, é composto por três éxons e apresenta dois códon de início da transcrição produzindo duas proteínas funcionais de 160 e 213 aminoácidos, respectivamente. O cDNA do gene *VHL* possui 1810pb em extensão com uma fase aberta de leitura (*Open Reading Frame*) de 852pb. A expressão do gene *VHL* é necessária para a embriogênese, como foi demonstrado com experimentos em camundongos *knock-out*<sup>4</sup>.

Um maior entendimento do papel deste gene na tumorigênese foi alcançado com a identificação de alvos funcionais da proteína VHL (pVHL). A pVHL é capaz de ligar-se forte e especificamente com as subunidades B e C da Elongina III, inibindo a sua atividade transcricional. Nos pacientes com doença VHL, a mutação no gene *VHL* interfere com este mecanismo de controle, acelerando o processo transcricional e favorecendo o crescimento celular<sup>2</sup>. Aproximadamente 50% das mutações no gene *VHL* afetam o domínio  $\alpha$  da pVHL, nos resíduos de contato com a Elongina C.

O papel da pVHL na angiogênese tumoral colocou o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) como um dos

possíveis alvos da pVHL. Foi demonstrado que a pVHL pode inibir a transcrição do gene *VEGF*, e a presença da pVHL intacta é necessária para a via de angiogênese induzida por hipoxia. Desta forma, demonstrou-se que a hipoxia induzia a transcrição de mRNAs, como o mRNA de VEGF, PDGF-B (cadeia B do fator de crescimento derivado de plaqueta) e de GLUT1, através de uma via mediada pela pVHL. Além deste efeito transcricional em VEGF, foi demonstrado que a pVHL também age interferindo na estabilidade do mRNA de VEGF tendo, deste modo, um efeito pós-transcricional. Assim, a pVHL íntegra é necessária para a desestabilização do mRNA de VEGF sob condições normóxicas. Maxwell e col. (1999) demonstraram que o mediador da pVHL na regulação da resposta à hipoxia é o HIF1 (hipoxia-inducible factor-1)<sup>10</sup>. A pVHL íntegra tem uma ação de ubiquitinação das subunidades  $\alpha$  de HIF1 (HIF $\alpha$ ) na presença de oxigênio, marcando-a para degradação pelo proteossoma 26S. Células deficientes de pVHL são incapazes de degradar as subunidades HIF $\alpha$  produzindo a ativação constitutiva dos genes induzidos por HIF e contribuindo para o fenótipo angiogênico dos tumores relacionados ao VHL<sup>16</sup>.

## TESTE GENÉTICO

Até hoje, aproximadamente 600 famílias com VHL já foram identificadas na Europa, nos Estados Unidos e no Japão sendo caracterizadas mais de 200 mutações germinativas distintas no gene *VHL* nestas famílias. O diagnóstico molecular da doença baseia-se na aplicação de técnicas de biologia molecular que visam à detecção de mutações germinativas no gene *VHL*. Historicamente, a detecção de mutações variava de 36 a 82%, dependendo das técnicas utilizadas. Mais recentemente, com os avanços na análise das mutações com a combinação das técnicas de seqüenciamento, *Southern-blot* quantitativo e FISH, tem sido possível detectar mutações germinativas no gene *VHL* de 73 a 100% dos probandos<sup>15,18</sup>. Aproximadamente 20% dos pacientes com mutações germinativas do gene *VHL* apresentam grandes deleções detectadas por *Southern-blot* ou por FISH, 27% têm mutações tipo *missense* e 27% mutações *non-sense* ou *frameshift*. Métodos de pré-rastreamento de mutação têm sido propostos antes do seqüenciamento de diversos genes, e o SSCP (*single strand conformational polymorfism*) é uma das técnicas mais utilizadas. Recentemente, a técnica DHPLC (*denaturing high performance liquid chromatography*) revelou-se um método prático e bastante sensível.

O teste genético em pacientes com VHL permite avaliar a amplitude do fenótipo da doença baseado no estudo de outras famílias com a mesma mutação. Também pode ser utilizado como teste preditivo, selecionando os indivíduos considerados como de alto risco e, portanto, candidatos ao programa de rastreamento clínico de lesões. A pesquisa de mutação no gene *VHL* é particularmente importante nos indivíduos com lesões relacionadas a VHL sem história familiar. Como todos os tumores associados à doença de VHL também ocorrem de forma esporádica, o diagnóstico clínico de casos *de novo* pode ser dificultado ou mesmo pode ser retardado até que critérios mínimos sejam conseguidos.

Tabela 29.7.1

Programa de Rastreamento Clínico de Lesões para Indivíduos Considerados como Alto Risco para a Doença de VHL, de Acordo com o Consenso de Especialistas Reunidos no 5º Simpósio Internacional da Doença de Von Hippel-Lindau, em Pádua (2002).

Exame Complementar	Consenso de Especialistas em VHL
Catecolaminas urinárias.	No mínimo uma vez ou se PA elevada.
Oftalmoscopia.	A partir de seis anos anualmente.
Angiografia fluoresceínica.	Não é rotina.
TC ou RM cerebral e espinhal.	Iniciar aos 20 anos e repetir a cada três anos.
US ou TC ou RM abdominal.	Iniciar entre 15-20 anos e repetir anualmente.

No Brasil, o teste genético para pesquisa de mutação no gene *VHL* está disponível desde 1998. Este estudo possibilitou a avaliação de 83 indivíduos pertencentes a 20 famílias com diagnóstico clínico de VHL. A taxa de 100% de detecção de mutação foi alcançada através da combinação das técnicas de seqüenciamento direto e de *Southern-blot* quantitativo. Das mutações deletérias encontradas, oito nunca haviam sido descritas anteriormente em outras populações e correspondem a 50% das mutações pontuais. A correlação entre o genótipo e o fenótipo apresentado pelas famílias reforça algumas observações descritas na literatura. O fenótipo de VHL tipo 1 foi associado com mutações potencialmente deletérias à proteína VHL e o fenótipo VHL tipo 2 foi associado a mutações do tipo *missense*. Especificamente, a mutação no códon 167 do gene *VHL* se correlacionou com um alto risco para o desenvolvimento de feocromocitoma apresentado em duas famílias com VHL. O perfil clínico da doença de VHL no Brasil mostra semelhanças de incidência e idade de apresentação com outros países onde a doença foi estudada. No entanto, 12 famílias (60%) foram caracterizadas como de alto risco para o desenvolvimento de CR, baseado na ocorrência familiar e nas características intrínsecas das mutações. Três das quatro famílias com grandes deleções apresentavam alta incidência de HB do SNC. Também foi observada uma tendência das mutações concentrarem-se principalmente nos éxons 1 e 2 do gene *VHL* incluindo as regiões de emenda (85,5%). Este estudo contribuiu para o entendimento da doença de Von Hippel-Lindau no Brasil, possibilitou o diagnóstico precoce através do teste molecular, bem como interveio na história natural da doença nas famílias com VHL através do aconselhamento genético oncológico e do programa de rastreamento de lesões<sup>14</sup>.

## ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento do risco de câncer familiar serve tanto para analisar os fatores de risco para o desenvolvimento dos tumores nos membros das famílias, bem como para informar as opções disponíveis para a prevenção e para o tratamento precoce das lesões. O aconselhamento genético familiar é educativo no sentido que orienta os membros da família a compreenderem os aspectos clínicos e hereditários relativos à doença e a escolherem alternativas de ação preventi-

vas e terapêuticas. São discutidos aspectos epidemiológicos e genéticos da origem dos tumores e o espectro da apresentação clínica, diagnóstico e tratamento da doença. O aconselhamento também consiste na atuação direta do geneticista sobre os aspectos psicossociais do paciente visando à redução da ansiedade, adaptação à carga de estresse relacionada à doença, conforto no luto e ajuda na decisão sobre o teste genético.

Nos membros assintomáticos da família, o enfoque principal é o preventivo. A identificação dos indivíduos de alto risco na família permite ao geneticista dirigir o programa de rastreamento clínico para estes indivíduos. O rastreamento clínico é um programa de prevenção e de detecção precoce das lesões recomendado à população de risco, com impacto positivo na redução da morbidade e na mortalidade da doença<sup>12</sup>. A estimativa do risco é baseada na análise do heredograma, após cuidadosa coleta da história familiar. Sempre que possível é importante obter documentos que comprovem a ocorrência das lesões nos familiares afetados. Os indivíduos assintomáticos de primeiro e de segundo grau relacionados ao paciente têm um risco de 50 e 25% respectivamente de serem portadores da mutação germinativa no gene *VHL* e, portanto, são considerados para avaliação molecular com o teste genético.

O teste positivo define a população de alto risco para a doença VHL que deve seguir um estreito acompanhamento em programa especial de rastreamento clínico (Tabela 29.7.1). Familiares de primeiro e de segundo grau que aguardam o resultado do teste genético ou que não foram testados são considerados clinicamente como alto risco e também devem ser incluídos no programa de rastreamento clínico regular. Mesmo os testes positivos não significam que o portador se tornará sintomático no futuro. Por isso, é recomendado que indivíduos sob risco sejam encaminhados para aconselhamento genético com um geneticista clínico, antes mesmo do teste.

Como a doença de VHL é multissistêmica, é recomendado que os pacientes e seus familiares de risco sejam acompanhados por uma equipe multidisciplinar constituída pelos profissionais médicos e de apoio das diversas especialidades relacionadas às manifestações clínicas da doença de VHL, como geneticista clínico, urologista, neurocirurgião, oftalmologista, endocrinologista, psicólogo, enfermeira, assistente

social, nutricionista, entre outros. Logo que o diagnóstico de VHL seja suspeitado, o geneticista clínico deve ser consultado para coordenar os vários exames necessários para avaliar completamente o probando e também para identificar portadores assintomáticos entre seus familiares.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Choyke PL, Glenn GM, Walther MM et al. von Hippel-Lindau disease: genetic, clinical and imaging features. *Radiology*, 194:629-42, 1995.
2. Duan DR, Pause A, Burgess WH et al. Inhibition of transcription elongation by the VHL tumor suppressor protein. *Science*, 269:1402-6, 1995.
3. Friedrich CA. Genotype-phenotype correlation in von Hippel-Lindau syndrome. *Hum Mol Genet*, 10:763-7, 2001.
4. Gnarr JR, Ward JM, Porter FD et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci, USA*, 94(17):9102-7, 1997.
5. Hammel PR, Vilgrain V, Terris B et al. Pancreatic involvement in von Hippel-Lindau disease. The Groupe Francophone d'Etude de la Maladie de von Hippel-Lindau. *Gastroenterology*, 119:1087-95, 2000.
6. Latif F, Tory K, Gnarr J et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 260:1317-20, 1993.
7. Maddock IR, Moran A, Maher ER et al. A genetic register for von Hippel-Lindau disease. *J Med Genet*, 33:120-7, 1996.
8. Maher ER, Kaelin WG. Von Hippel-Lindau disease. *Medicine*, 76:381-91, 1997.
9. Manski TJ, Heffner DK, Gladys MG et al. Endolymphatic sac tumors. A source of morbid hearing loss in von Hippel-Lindau disease. *JAMA*, 277:1461-6, 1997.
10. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW et al. The tumor suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399:271-5, 1999.
11. Melbon KL, Rosen SW. Lindau's disease. Review of the literature and study of a large kindred. *Am J Med*, 36:595-617, 1964.
12. Offit K. Genetics in clinical cancer care: scope of cancer genetic counseling. In: *Thirty-third Annual Meeting; 1997 May 17-20, ASCO, Denver-Colorado*, 317-20 (Educational book), 1997.
13. Pastore Y, Jedlickova K, Guan Y, Liu E, Fahner J, Hasle H et al. Mutations of von Hippel-Lindau tumor-suppressor gene and congenital polycythemia. *Am J Hum Genet*, 73(2):412-9, 2003.
14. Rocha JC, Silva RL, Mendonca BB, Marui S, Simpson AJ, Camargo AA. High frequency of novel germline mutations in the VHL gene in the heterogeneous population of Brazil. *J Med Genet*, 40(3):e31, 2003.
15. Stolle C, Glenn G, Zbar B et al. Improved detection of germline mutations in the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Hum Mutation*, 12:417-23, 1998.
16. Tanimoto K, Makino Y, Pereira T, Poellinger L. Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J*, 19:4298-309, 2000.
17. Van der Harst E, de Krijger RR, Dinjens WN et al. Germline mutations in the vhl gene in patients presenting with pheochromocytomas. *Int J Cancer*, 77(3):337-40, 1998.
18. Yoshida M, Ashida S, Kondo K et al. Germ-line mutation analysis in patients with von Hippel-Lindau disease in Japan: an extended study of 77 families. *Jpn J Cancer*, 91:204-12, 2000.

## 29.8 Neurofibromatose Tipo I

*Fernanda Teresa de Lima*

### INTRODUÇÃO

As neurofibromatoses são doenças genéticas que afetam primariamente o crescimento celular de tecidos neurais<sup>16</sup>. Foram descritas como doenças neurocutâneas, facomatoses, neurocristopatias e defeitos mesodérmicos<sup>17</sup>, como uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer<sup>10</sup> e como síndrome macrossômica<sup>8</sup>.

Constituem um grupo heterogêneo de doenças, sendo a forma mais comum a neurofibromatose tipo 1 (NF1), tam-

bém conhecida como doença de Von Recklinghausen<sup>1</sup>. A segunda forma mais freqüente é a NF2, caracterizada por schwannomas vestibulares bilaterais. As formas alternativas da NF1 são definidas como condições que apresentam algumas das características clássicas, mas não de uma maneira típica, e incluem fenótipo de deleção total do gene, forma mista e formas localizadas. Outras formas representam variantes com manifestações adicionais atípicas, podendo ou não cumprir os critérios diagnósticos da doença<sup>1</sup>.

A NF1 afeta cerca de 1:3.500 indivíduos com uma prevalência variando de 2 a 4,6 em dez mil nascidos vivos em diferentes estudos, sem diferir nas várias populações estudadas<sup>8</sup>. Cerca de 50% de todos os pacientes com NF1 não têm história familiar positiva, e, portanto, constituem casos *de novo*.

A NF1 é uma doença autossômica dominante com penetrância completa, com uma alta taxa de mutações<sup>18</sup>. O mosaïcismo germinativo em portadores de NF1 pode sugerir não-penetrância, e está associado à patogênese dos raros casos de NF1 segmentar. A penetrância completa implica um baixo risco de recorrência para a irmandade de afetados (portadores de uma mutação *de novo*) cujos pais são normais. Como a doença apresenta uma grande variabilidade clínica, os pais devem ser submetidos à avaliação clínica e complementar antes de serem definidos como não-afetados<sup>5</sup>.

## QUADRO CLÍNICO

A NF1 tem uma expressão muito variável, entre diferentes famílias, entre diferentes indivíduos de uma mesma família e entre diferentes segmentos de um mesmo indivíduo. É progressiva, com diferentes manifestações clínicas nas diferentes faixas etárias<sup>1,6,18</sup>. A seguir, são discutidas as principais manifestações clínicas da NF1.

## NEUROFIBROMAS

Os neurofibromas são tumores benignos que surgem da bainha dos nervos periféricos, compostos principalmente por células de Schwann e podem ser classificados como discretos (cutâneos ou subcutâneos) ou plexiformes (nodulares ou difusos)<sup>8</sup>.

Os neurofibromas cutâneos, sésseis ou pedunculados, se movem quando a pele é movida e raramente causam dor. Os neurofibromas subcutâneos geralmente são ovóides ou esféricos e pode-se deslizar a pele sobre eles, causando dor ao comprimir os nervos<sup>8</sup>. Ambos se apresentam como massas com margens bem definidas, raramente estão presentes ao nascimento e podem estar associados a prurido<sup>17</sup>.

Os neurofibromas plexiformes são tumores que se estendem ao longo do nervo, podendo crescer exageradamente e causar desfiguração, apresentando ramificações digitiformes que se insinuam nos tecidos adjacentes normais, tornando a remoção cirúrgica completa praticamente impossível<sup>8</sup>. Ao envolver a pele, podem apresentar hiperpigmentação e hipertricose. Os neurofibromas plexiformes difusos que envolvem a pele geralmente se tornam aparentes nos primeiros dois anos de vida. Os neurofibromas plexiformes podem malignizar, dando origem aos tumores malignos da bainha dos nervos periféricos (TMBNP), antes denominados neurofibrossarcomas ou schwannomas malignos<sup>8</sup>.

## MANCHAS CAFÉ-COM-LEITE

As manchas café-com-leite típicas da NF1 são ovóides, de cor uniforme e bordas bem definidas. Podem ocorrer em qualquer lugar do corpo. São caracterizadas histologicamente pela presença de melanossomos gigantes dentro dos melanócitos<sup>8</sup>.

## EFÉLIDES

As efélides, ou sardas, podem ser similares à cor das manchas café-com-leite, mas geralmente tem entre 1 a 3mm de diâmetro e ocorrem agrupadas. Podem aparecer de maneira difusa sobre o tronco e extremidades proximais, mas geralmente estão restritas a regiões intertriginosas e de superposição de pele, especialmente regiões axilares, inguinais, palpebrais superiores, cervicais e inframamárias. As efélides axilares podem estar presentes ao nascimento, mas geralmente aparecem na infância tardia, como as efélides nas outras regiões<sup>8</sup>.

## NÓDULOS DE LISCH

Os nódulos de Lisch são hamartomas pigmentados presentes na íris, geralmente bilaterais. Não estão associados a comprometimento visual e são observados por lâmpada de fenda. Desenvolvem-se em função da idade, geralmente após os 10 anos<sup>8</sup>.

## GLIOMAS ÓPTICOS

Os gliomas ópticos são astrocitomas pilocíticos grau I (WHO), ocorrendo normalmente nas vias ópticas anteriores, geralmente benignos<sup>15</sup>. O período de maior risco para o desenvolvimento de gliomas ópticos sintomáticos é durante os primeiros seis anos de vida e seu curso, na NF1, parece ser mais benigno que nos casos esporádicos. Podem se comportar de duas maneiras: nunca causar sintomas e serem descobertos somente por neuroimagem, ou crescerem a ponto de causar sintomas, até se estabilizarem, raramente progredindo. Os gliomas ópticos, além dos sintomas visuais, podem causar puberdade precoce<sup>15</sup>. Nos negros com NF1, a ocorrência de gliomas ópticos é menor<sup>8</sup>.

## LESÕES ÓSSEAS

A escoliose displástica e a pseudoartrose tibial são as lesões ósseas mais graves da NF1. O abaulamento dos ossos longos e afilamento dos córtex são lesões displásticas congênitas e podem complicar com pseudoartrose e fraturas patológicas<sup>8</sup>.

## OUTRAS MANIFESTAÇÕES E COMPLICAÇÕES

Outras manifestações e complicações estão apresentadas na Tabela 29.8.1.

## AValiação CLÍNICA E CONDUTA

### CRITÉRIOS DIAGNÓSTICOS

Os critérios diagnósticos estão listados na Tabela 29.8.2<sup>16</sup>. Esses critérios têm alta especificidade e sensibilidade em adultos<sup>11</sup>, mas, nos primeiros anos, as crianças podem não preenchê-los, uma vez que os sinais da NF1 são idade-dependentes<sup>6</sup>.

**Tabela 29.8.1**  
**Complicações da NF1<sup>7,9,12,17</sup>**

<i>Esqueléticas</i>	<i>Neurológicas</i>	<i>Endócrinas</i>	<i>Neoplásicas</i>	<i>Cardiovasculares</i>
Displasia da asa do esfenóide	Alterações de coordenação motora	Puberdade precoce ou tardia	TMBNP	HAS
Displasias craniofaciais	Déficit cognitivo		Gliomas	Vasculopatias
Displasias vertebrais	Alterações psiquiátricas		Feocromocitomas	Cardiopatias congênicas
Deformidades esternais	Cefaléia		Tumores derivados de células da crista neural	Estenose da artéria renal
<i>Genu varum/ valgum</i>	Epilepsia		Tumores carcinóides	
Pseudoartrose	Estenose de aqueduto		Rabdomiossarcomas	
Lesões líticas ósseas	Alterações cerebrovasculares			
Baixa estatura				
Macrocefalia				
Escoliose				

### Avaliação Clínica Inicial

A abordagem inicial de pacientes com NF1 deve constar de detalhada anamnese, dando ênfase aos sinais e sintomas da NF1; exame físico, com antropometria, medida da pressão arterial (PA), avaliação da pele, inspeção dos ossos longos e coluna; exame neurológico; exame oftalmológico e avaliação de outros membros da família<sup>6</sup>.

É consenso que estudos de neuroimagem não precisam ser realizados de rotina e que devem ser solicitados na presença de sintomas, como convulsões, macrocefalia, puberdade precoce, alterações da aprendizagem, ou sintomas oftalmológicos<sup>11</sup>. Outros exames complementares também devem ser solicitados caso haja sintomas<sup>2</sup>.

### História Natural da Doença, Acompanhamento e Tratamento

O acompanhamento do paciente com NF1 deve ser multidisciplinar e anual<sup>16</sup> ou de acordo com os sintomas<sup>11</sup>. Huson

(1989) recomenda que seja semestral para crianças, uma vez que a maior parte das complicações se desenvolve nessa faixa etária<sup>12</sup>. Os principais sinais e sintomas que devem ser monitorados de acordo com cada faixa etária estão listados na Tabela 29.8.3. Avaliações oftalmológicas devem ser realizadas anualmente<sup>2</sup>. Existem recomendações especiais para o acompanhamento dos pacientes de acordo com a idade<sup>2,11,12,16</sup>. Na presença de qualquer alteração, em qualquer faixa etária, o paciente deve ser referido a um especialista, para realizar investigação e tratamento adequados<sup>2,11</sup>.

Não existe um tratamento específico para a NF1<sup>12</sup>. O tratamento é voltado para as complicações, à medida que ocorrem, que são tratadas como o seriam se isoladas, e à sua antecipação e prevenção<sup>2,12</sup>.

### MORBIDADE E MORTALIDADE

A NF1 é uma doença progressiva, imprevisível e associada com um aumento da mortalidade por causas relacionadas à doença e diminuição da expectativa de vida. A maior cau-

**Tabela 29.8.2**  
**CrITÉRIOS DIAGNÓSTICOS DE NF1<sup>16</sup>**

NF1 está presente em um paciente com dois ou mais dos seguintes critérios:

- Seis ou mais manchas café-com-leite > 5mm no maior diâmetro em indivíduos pré-puberis ou > 15mm após a puberdade.
- Dois ou mais neurofibromas de qualquer tipo ou um ou mais neurofibromas plexiformes.
- Sardas nas regiões axilares ou inguinais (sinal de Crowe).
- Um tumor na via óptica.
- Dois ou mais nódulos de Lisch (hamartomas da íris).
- Uma lesão óssea distinta, como displasia da asa do esfenóide ou espessamento do córtex de ossos longos com ou sem pseudoartrose.
- Um parente de primeiro grau com NF1 que preencha os critérios acima.

**Tabela 29.8.3**  
**Principais sinais/sintomas, de acordo com a faixa etária<sup>2,11</sup>.**

Primeiros Dois Anos	Pré-escolar	Escolar	Adolescência	Adultos
neurofibromas plexiformes	desenvolvimento puberal	escoliose	neurofibroma	
estatura	dificuldade de aprendizado	neurofibroma	HAS	
perímetro cefálico	gliomas	DNMP		neoplasias
displasias ósseas	sardas	alterações de comportamento		
manchas café-com-leite	cefaléia	distúrbios do crescimento		
		escoliose		

sa de morte está relacionada à malignidade. A morbidade da doença está relacionada à progressão dos vários sinais e sintomas já descritos<sup>8</sup>.

## GENÉTICA

### ESTRUTURA E EXPRESSÃO GÊNICAS

O gene da NF1 está localizado em 17q11.2<sup>14</sup> e tem uma estrutura complexa. O cDNA contém 8.454 nucleotídeos e a região codificadora cobre cerca de 335kb de DNA genômico<sup>14</sup>. É transcrito na direção centrômero-telômero. Foram identificados 60 éxons, numerados de 1 a 49, alguns subdivididos e designados por letras<sup>19</sup>.

Existem vários *locus* homólogos ao *locus* da NF1, que representam pseudogenes não processados causados por duplicações repetidas do *locus* da NF1<sup>19</sup>. Foi sugerido que estes pseudogenes fossem responsáveis pela alta taxa de mutações encontradas no gene *NF1*, por conversão gênica entre o *locus* *NF1* e os pseudogenes<sup>19</sup>.

Dentro do intron 27b existem três outros genes, cada um com dois éxons, transcritos na direção oposta à transcrição do gene *NF1*. O gene *EVI2A* codifica um peptídeo de 232 aminoácidos, expresso no cérebro e medula óssea, com um domínio transmembrana. O gene *EVI2B* codifica um peptídeo de 448 aminoácidos, de função desconhecida. O gene *OMGP* codifica um peptídeo de 416 aminoácidos expresso na superfície celular de oligodendrócitos. Não foram identificados fenótipos associados à inativação de qualquer um desses genes<sup>19</sup>.

A região 3' não traduzida se estende por 3,5kb após o sinal de parada da tradução e é altamente conservada, o que sugere que seja importante na estabilidade do mRNA<sup>14</sup>. O mRNA tem cerca de 12 a 14kb, identificado em todos os tecidos, em baixos níveis. Existem três isoformas geradas por *splicing* alternativo, com diferentes padrões de expressão. A forma mais comum inclui o éxon 23a, que está dentro do único domínio funcional identificado, apresenta diminuição da atividade catalítica da enzima codificada<sup>19</sup>. A isoforma com o éxon 48a é expressa em derivados musculares e a isoforma com o éxon 9a é expressa somente no cérebro durante a embriogênese<sup>19</sup>. O mRNA também sofre um processo regulatório pós-transcricional, onde a base 3.916 no éxon 23-1 é deaminada de C para U, gerando uma parada prematura da

leitura no códon 1.303. Foram encontrados diferentes níveis de mRNA editado em TMBNPs, neurofiromas benignos e astrocitomas, especulando-se que a inativação do alelo normal por edição do mRNA leve a uma proliferação celular anormal<sup>19</sup>.

### FUNÇÃO PROTÉICA

O gene *NF1* codifica a proteína neurofibromina, de 2.818 aminoácidos e 327kD, com uma região de homologia com a família de proteínas ativadoras de GTPase (GAP), o domínio relacionado a GAPs (GRD). O GRD pode estimular a atividade de GTPase intrínseca de *ras*<sup>18,19</sup>. O gene *RAS* é um proto-oncogene que codifica a proteína RAS, membro de uma superfamília de proteínas G que estão ativas quando ligadas a GTP e inativas quando ligadas a GDP. Uma das vias de transdução de sinal mediada por *RAS* é a via *RAF*-MAP quinases. A proteína *RAS*-GTP ativada envia sinais, através de uma fosfoinositol 3'quinase (PI3-quinase), que inibem a apoptose e, através da via *RAF*-MAP quinase, sinais que estimulam a proliferação celular. A neurofibromina inativa *RAS*-GTP e a diminuição de seus níveis levam a um aumento da sinalização através da via *RAF*-MAP quinase e PI3 quinase, aumentando a proliferação e a sobrevivência celular<sup>19</sup>.

### MUTAÇÕES E FENÓTIPOS

A análise de mutações nos pacientes com NF1 é de difícil execução devido ao grande tamanho do gene e à falta de pontos quentes de mutação. Várias metodologias foram utilizadas, tais como heteroduplex e SSCP para triagem de mutações e análise por Southern blot e FISH para triagem de grandes deleções. A maior parte dos estudos, baseados na análise do DNA, encontrou mutação em cerca de 20% dos pacientes e se concentrou no GRD. O método mais efetivo é o teste da proteína truncada (PTT), que detecta mutações confirmadas por seqüenciamento em cerca de 70% dos pacientes<sup>18,19</sup>.

Vários tipos de alterações no gene foram encontrados, incluindo anomalias cromossômicas; deleção de todo o gene, de vários éxons ou pequenas deleções intragênicas; inserções e mutações de ponto<sup>19</sup>. A maior parte das mutações resulta em uma proteína truncada<sup>18</sup>. Mutações idênticas são pouco comuns. A mutação mais comum identificada é a subs-

tituição C5839T no éxon 31<sup>19</sup>. A maior parte das mutações de ponto tem origem paterna e a maior parte das deleções intragênicas ocorre durante a oocitogênese materna<sup>18,19</sup>.

A variedade de mutações encontradas sugere que sejam geradas por muitos mecanismos diferentes. Não existe uma correlação entre a mutação e o fenótipo resultante, excetuando-se os fenótipos associados a grandes deleções do gene, que sugerem que genes contíguos ao gene *NF1* possam ser importantes no desenvolvimento do fenótipo<sup>19</sup>.

A variabilidade clínica observada na NF1 é uma questão intrigante, que pode ser em parte explicada por inativação do alelo normal em células somáticas, o que está relacionado com algumas neoplasias e com mosaicismos somáticos<sup>1</sup>. Outras hipóteses levantadas, pela observação de agrupamento familiar de algumas características da NF1, foi a existência de genes modificadores ou atuação de genes envolvidos em traços limitados ao sexo masculino<sup>1</sup>. Também foi sugerido que fatores ambientais, como traumas mecânicos pudessem estar envolvidos no desenvolvimento de neurofibromas cutâneos<sup>1</sup>.

## NEOPLASIAS

Entre as neoplasias mais comuns estão os tumores malignos de bainha do nervo periférico (TMBNP), tumores difíceis de detectar e de mau prognóstico. Devem ser suspeitados quando o paciente desenvolve intensa dor sem explicação plausível, aumento rápido no tamanho ou mudança na consistência de um neurofibroma plexiforme ou déficit neurológico<sup>4</sup>. Os TMBNPs devem ser biopsiados e removidos cirurgicamente com amplas margens livres sempre que possível. O tratamento oncológico deve ser idêntico à de tumores de tecidos moles de pacientes não-NF1. A radioterapia auxilia no controle local e pode retardar o início de uma recidiva, mas tem pouco efeito na sobrevida em longo prazo. Existem controvérsias quanto ao uso de quimioterapia, que pode ser benéfica para tumores localizados em locais de difícil acesso à radioterapia<sup>4</sup>. Foi demonstrado que esses tumores exibem perda da expressão do gene *NF1* e aumento da ativação do *ras*, além de outras alterações genéticas (p27-Kip1, p53, p16). Pacientes com microdeleções do gene *NF1* tem um risco maior de desenvolvê-los<sup>4</sup>.

Além dos gliomas ópticos, já discutidos anteriormente nesse capítulo, os gliomas na NF1 podem ocorrer em qualquer ponto do neuroaxis e apresentam maior frequência de progressão maligna que tumores semelhantes na população em geral, sem NF1<sup>13</sup>.

Os pacientes com NF1 apresentam um risco maior para desenvolver neoplasias hematológicas, especialmente leucemia mielomonocítica crônica, leucemia linfoblástica aguda e linfoma não-Hodgkin. Foi relatado que pacientes com NF1 e xantogranuloma juvenil podem apresentar um risco maior para leucemia mielóide crônica juvenil, embora essa associação não seja conclusiva<sup>13</sup>. As células leucêmicas nos pacientes com NF1 apresentam perda de heterozigiosidade do gene *NF1* e a perda da neurofibromina foi associada com um aumento da ativação do *ras*<sup>13</sup>.

Dentre as neoplasias, os feocromocitomas têm uma forte associação com NF1. A maioria está na medula adrenal, 10%

são bilaterais e 10% são malignos. Geralmente, são detectados na idade adulta e os pacientes apresentam hipertensão arterial sistêmica (HAS), agitação e ansiedade imotivadas, taquicardia e sudorese excessiva. Níveis elevados de epinefrina estão associados com HAS intermitente e níveis elevados de norepinefrina, com a HAS mantida. Além disso, pode haver alteração do metabolismo da glicose<sup>10</sup>. A glândula adrenal normal expressa o mRNA do gene *NF1* contendo o éxon 23a, e os feocromocitomas expressam o mRNA sem esse éxon. O significado deste fato não está ainda esclarecido, mas supõe-se que esteja relacionado com a patogênese tumoral<sup>10</sup>.

Outros tumores derivados de células da crista neural foram descritos, incluindo carcinoma medular de tireóide e melanomas. A expressão do gene *NF1* é alta nas células derivadas da crista neural, o que sugere que a perda da expressão gênica desregule o crescimento desses tecidos, levando ao aparecimento de neoplasias<sup>10</sup>.

Na NF1, tumores carcinóides ocorrem com maior frequência na raça negra. Geralmente, são diagnosticados entre a quarta e a sexta década de vida e aparecem na região da ampola de Vater. Quase todos contêm somatostatina. Os pacientes com feocromocitoma são especialmente propensos a desenvolvê-los e vice-versa<sup>7</sup>. Outros tumores endócrinos descritos em pacientes com NF1 incluem adenomas de paratireóide e carcinomas de tireóide<sup>7</sup>.

Os rhabdomyosarcomas ocorrem em 1 a 2% dos pacientes com NF1, sendo a maioria embrionária. A distribuição dos tumores não difere da distribuição na população sem NF1. À existência de uma isoforma músculo-específica da neurofibromina, sugere-se que o gene *NF1* deva ter uma função específica durante a diferenciação da célula muscular e que a perda da expressão protéica esteja associada a uma maior proliferação dessas células<sup>10</sup>.

A associação entre tumor de Wilms e NF1 é controversa e não comprovada. No entanto, crianças com NF1 e tumores embrionários parecem ser mais susceptíveis ao desenvolvimento de neoplasias secundárias após quimioterapia e radioterapia<sup>10</sup>.

## MODELOS ANIMAIS

Homólogos da neurofibromina foram estudados na levedura e na *Drosophila*, mas foi o desenvolvimento de camundongos transgênicos que possibilitou o seu estudo em um sistema biológico semelhante ao humano<sup>19</sup>. Animais *knock-out* convencionais possibilitaram o estudo da função gênica e desenvolvimento de *knock-outs* condicionais permitiu o estudo da função da neurofibromina em tecidos específicos, o que é particularmente útil para o estudo da tumorigênese. Outra abordagem para o estudo da formação tumoral envolve a geração de animais heterozigotos para mutações no gene *nf1* e outros genes supressores de tumores relevantes. A existência de isoformas da neurofibromina levou à construção de animais deficientes em éxons específicos relacionados às isoformas. O estudo desses animais pode contribuir para o entendimento de fatores genéticos e biológicos determinantes da tumorigênese e fornecer informações cruciais que permitam o desenvolvimento de alvos moleculares para o desenvolvimento de potenciais drogas terapêuticas<sup>3</sup>.

## ACONSELHAMENTO GENÉTICO

O aconselhamento genético deve ser oferecido para todas as famílias portadoras de NF1. O risco de NF1 para cada descendente de um portador é de 50%, independente do sexo. É importante ressaltar que existe uma grande variabilidade clínica da doença e que não existem ainda maneiras de se prever a gravidade e a evolução<sup>6</sup>.

O diagnóstico pré-natal pode ser realizado por análise direta de mutações, quando um dos pais já tem o diagnóstico molecular ou por análise de ligação, se na família houver membros afetados disponíveis e marcadores informativos suficientes para sua realização<sup>6</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Carey JC, Viskochil DH. Neurofibromatosis type 1: a model condition for the study of the molecular basis of variable expressivity in human disorders. *Am J Med Genet*, 89:7-13, 1999.
2. Committee on Genetics, American Academy of Pediatrics. Health Supervision for children with neurofibromatosis. *Pediatrics*, 96:368-72, 1995.
3. Dasgupta B, Gutmann DH. Neurofibromatosis 1: closing the GAP between mice and men. *Curr Opin Genet Dev*, 13:20-7, 2003.
4. Ferner RE, Gutmann DH. International consensus statement on malignant peripheral nerve sheath tumors in neurofibromatosis 1. *Cancer Res*, 62:1573-7, 2002.
5. Friedman JM. Clinical genetics. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999a.
6. Friedman JM. Evaluation and management. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999b.
7. Friedman JM. Vascular and endocrine abnormalities. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999c.
8. Friedman JM, Riccardi VM. Clinical and epidemiological features. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.
9. Gutmann DH. Abnormalities of the nervous system. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.
10. Gutmann DH, Gurney JG. Other malignancies. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.
11. Gutmann DH, Aylsworth A, Carye JC, Korf B, Marks J, Pyeritz RE et al. The diagnostic evaluation and multidisciplinary management of neurofibromatosis 1 and neurofibromatosis 2. *JAMA*, 278:51-7, 1997.
12. Huson, SM. Recent developments in the diagnosis and management of neurofibromatosis. *Arch Dis Child*, 64:745-9, 1989.
13. Korf BR. Malignancy in neurofibromatosis type 1. *The oncologist*, 5:477-85, 2000.
14. Li Y, O'Connell P, Breidenbach HH, Cawthon R, Stevens J, Xu G et al. Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1). *Genomics*, 25:9-18, 1995.
15. Listerick R, Gutmann DH. Tumors of the optic pathway. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.
16. National Institutes of Health Consensus Development Conference. Neurofibromatosis: conference statement. *Arch Neurol*, 45:57-8, 1988.
17. Riccardi VM. Type 1 neurofibromatosis and the pediatric patient. *Curr Probl Ped*, 22:66-197, 1992.
18. Upadhyaya M, Cooper DN. The mutational spectrum in neurofibromatosis 1 and its underlying mechanisms. In: Upadhyaya M, Cooper DN (eds). *Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype*. Oxford: BIOS Scientific Publishers Ltd, 1998.
19. Viskochil DH. The structure and function of the NF1 gene: molecular pathophysiology. In: Friedman JM, Gutmann DH, MacCollin M, Riccardi VM (eds). *Neurofibromatosis: phenotype, natural history and pathogenesis*, 3<sup>rd</sup> ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1999.

## 29.9 Retinoblastoma Hereditário

Marli de Castro Pereira Rio

### INTRODUÇÃO

O retinoblastoma é o tumor intra-ocular maligno mais comum da infância originando-se da membrana neuroectodérmica da retina embrionária. Pode ser unilateral ou bilateral, unifocal ou multifocal. Ocorre na forma hereditária (40%) e esporádica (não-hereditária) em 60% dos casos.

É creditado a Petrus Pawius a primeira descrição na literatura de um retinoblastoma. Ele descreveu um tumor ocular maligno que invadia a órbita e a região temporal. Dunphy acredita que a primeira descrição do sinal chamado reflexo de olho de gato foi descrita por Hayes em 1767, porém outros historiadores atribuem o termo a George Joseph Beer que enfatizou o sinal diagnóstico. Foi apenas em 1809 que o retinoblastoma foi descrito como uma entidade por James Wardrop<sup>1</sup>.

No Brasil, a incidência de retinoblastoma ainda é desconhecida. Estudos realizados em outros países demonstraram uma incidência em torno de 1/18.000-30.000 nascidos-vivos dependendo do país. Não existe uma aparente predileção racial ou sexual. Cerca de 90% dos diagnósticos são feitos antes dos sete anos de idade. Os tumores bilaterais são diagnosticados por volta de 13 meses de vida e os unilaterais por volta de 24 meses<sup>6</sup>.

Cerca de 90% dos pacientes com retinoblastoma sobrevivem ao tumor. Pacientes com tumores bilaterais ou unilaterais-multifocais apresentam uma predisposição genética ao desenvolvimento de tumores secundários, e a mortalidade nesses indivíduos é maior que naqueles que apresentam mutações somáticas. O diagnóstico precoce torna maior a possibilidade de cura e a conservação do globo ocular e da visão.

### QUADRO CLÍNICO E DIAGNÓSTICO

No Brasil, muitas vezes o diagnóstico é tardio fazendo com que grande parte dos retinoblastomas tenham apresentação extra-ocular, que é de pior prognóstico. As manifestações clínicas encontradas vão depender da localização do tumor, do seu tamanho e da época do diagnóstico. A manifestação clínica mais freqüente nos retinoblastomas intra-oculares é a leucocoria ( reflexo do olho de gato) que está presente em cerca de 70% dos casos e que geralmente é descrita pelos pais. Outras manifestações clínicas podem ser encontradas: estrabismo em 20% dos casos (divergente ou convergente), protusão do globo ocular, hiperemia, glaucoma (10%), heterocromia, dilatação pupilar. No retinoblastoma extra-ocular, as manifestações clínicas dependem de quais estruturas

foram afetadas, podendo encontrar manifestações como uma massa na região orbitária, proptose, sinais neurológicos focais, cefaléia, vômito. O retinoblastoma é considerado unifocal se apenas um tumor está presente, e multifocal se mais de um tumor está presente.

Pacientes com deleções envolvendo o cromossomo 13 podem apresentar algumas dismorfias faciais e malformações características como: lóbulo da orelha antevertido e espesso, testa alta, filtro proeminente e nariz curto<sup>2</sup>.

O diagnóstico clínico é feito através do exame de fundo de olho por oftalmoscopia indireta. Outros exames podem ser realizados com o intuito de encontrar outras alterações presentes nos quadros de retinoblastoma e servem para nos mostrar quais estruturas foram acometidas e em que estágio se encontra o tumor. A ecografia é precisa em detectar calcificações intra-oculares quando comparada com raio X de crânio. A tomografia computadorizada de crânio é importante para avaliar o envolvimento do nervo óptico, as estruturas orbitárias ou metástases cerebrais. Raramente, o retinoblastoma bilateral pode estar associado ao envolvimento da hipófise; neste caso, é referido como retinoblastoma trilateral (retinoblastoma bilateral + pinealoma).

Para o estadiamento do tumor, os seguintes exames são realizados: tomografia computadorizada de crânio e órbita; mapeamento ósseo com tecnécio; ultra-sonografia abdominal; punção lombar com exame citológico do líquido e mielograma<sup>3</sup>.

O diagnóstico diferencial de retinoblastoma deve ser feito com:

- Doença de Coats (retinite exudativa);
- Esclerose tuberosa;
- Doença de Norrie;
- Incontinentia pigmenti;
- Vitreoretinopatia exudativa familiar;
- Manifestações oculares do *Toxocara canis* (granuloma larval).

O tratamento varia de acordo com a extensão do tumor, as estruturas acometidas e o estadiamento. Os tipos de tratamento utilizados incluem: quimioterapia, radioterapia, crioterapia, fotocoagulação e enucleação.

### GENÉTICA DO RETINOBLASTOMA

Em 60% dos casos, o retinoblastoma é esporádico, sem história familiar positiva e acomete apenas um dos olhos (unilateral), fruto de duas mutações somáticas, não predis põem a um risco aumentado de tumores extra-oculares. Cerca de 40% dos retinoblastomas são da forma hereditária. Destes apenas ¼ apresentam um padrão familiar (com outros familia-

res afetados), e a maioria, ou  $\frac{3}{4}$  dos casos, é considerada *de novo*.

O retinoblastoma hereditário tem herança autossômica dominante, isto é, existe um risco de 50% de transmitir a predisposição ou o retinoblastoma para seus descendentes. A penetrância, chance de um genótipo ter qualquer expressão fenotípica, é maior que 90% (Fig. 29.9.1).

Os retinoblastomas hereditários podem acometer um olho (unilateral) em 15% dos casos (geralmente multifocal), ou dois olhos (bilateral) em 25% dos pacientes. Os tumores bilaterais são sempre hereditários. A distinção destas formas do retinoblastoma tem importantes implicações para os pacientes e suas famílias. A Tabela 29.9.1 mostra algumas características que podem ajudar-nos na diferenciação.

Alguns casos de retinoblastoma hereditário com baixa penetrância têm sido descritos na literatura. A penetrância incompleta é acompanhada de baixa expressividade (retinoblastoma unilateral). Alelos com baixa penetrância resultam em inativação parcial da função do gene *RB1*.

### O GENE *RB1*

Em 1971, Alfred Knudson postulou que duas mutações no mesmo locus eram necessárias para que o retinoblastoma se desenvolvesse (hipótese de Knudson). Assim, na forma hereditária, uma mutação no gene *RB1* é herdada e a outra, adquirida. A primeira mutação ocorre na célula germinativa e está presente em cada célula do corpo humano. A segunda mutação ocorre em células somáticas da retina desencadeando o aparecimento do tumor. O primeiro evento pode ser herdado de um dos progenitores, ou a mutação acontecer durante a embriogênese, neste caso chamado de mutação *de novo*. O alelo mutante, embora seja transmitido de forma autossômica dominante, é recessivo ao nível celular, uma vez que é um gene supressor de tumor. A segunda mutação, necessária para que o tumor se desenvolva, leva à perda ou inativação do alelo normal no homólogo *RB1* remanescente, geral-

mente por perda da heteroziguidade (LOH). A perda da heteroziguidade pode ser resultado de deleções ou rearranjos cromossômicos como não disjunção ou recombinação mitótica.

Existe um balanço entre os sinais estimuladores e inibidores de crescimento interagindo todas as células que formam o organismo. Uma perturbação desse balanço pode levar as células a se proliferarem desordenadamente e fora de controle, resultando em aparecimento de câncer. Múltiplos mecanismos controlam a diferenciação e a proliferação, mas o gene do retinoblastoma tem um papel importante nesse processo. O retinoblastoma foi o primeiro câncer a ser relacionado com um tipo de defeito genético específico<sup>4</sup>.

O gene *RB1* é um gene supressor de tumor, e está localizado no braço longo do cromossomo 13 (13q14). Da mesma forma que outros genes supressores de tumor, o gene *RB1* inibe a proliferação das células. O gene *RB1* foi descoberto em 1986 por Dryja e col., contém 27 éxons, ocupa uma extensão de 180kb do genoma e transcreve um RNA mensageiro de 4,7kb, com uma fase aberta de leitura (ORF) de 2,7kb. A proteína RB (pRB) apresenta 110KDa (p110), é uma fosfoproteína nuclear composta de 928 aminoácidos. Outros dois produtos do gene *RB1*, p107 e p130 foram identificados e também estão envolvidos na indução de retinoblastoma em camundongos transgênicos. A pRB, p107 e a p130 constituem uma pequena família de proteínas que compartilham seqüências similares<sup>5</sup>.

Os genes *TP53* e *RB1* participam na regulação da transcrição do DNA, impedindo que a célula saia do estágio G1 e entre na fase S do ciclo celular. A pRB atua por regulação negativa na progressão do ciclo celular, é hipofosforilada na fase G0 e início de G1, (mediado por uma quinase dependente de ciclina — cdk2), e permanece fosforilada na fase S, G2 e durante a mitose. Durante a fase G1 do ciclo celular, a pRB, forma hipofosforilada, liga-se a E2F causando a repressão da transcrição dos genes mediados por estes genes. Quando a pRB é fosforilada no final da fase G1, os fatores E2F são li-

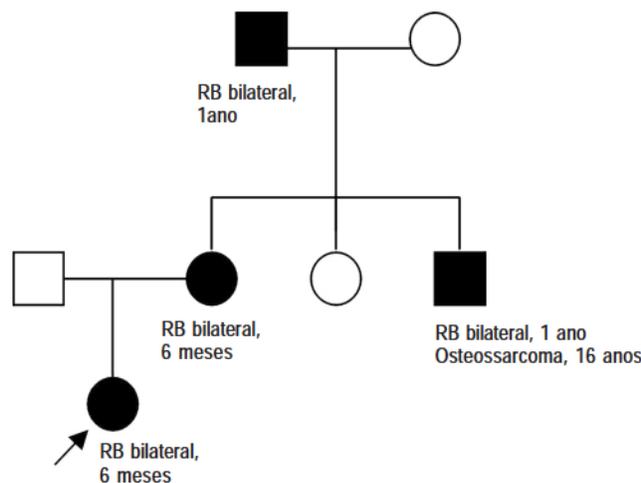


Fig. 29.9.1 — Heredograma de uma família com retinoblastoma hereditário.

**Tabela 29.9.1**  
**Características do Retinoblastoma Hereditário e do Não-hereditário**

	<i>Hereditário (40%)</i>	<i>Não-hereditário (60%)</i>
Tipo de Tumor	25% bilateral 15% unilateral	100% unilateral
História Familiar	10% positiva 30% negativa ( <i>de novo</i> )	100% negativa
Idade ao Diagnóstico	< 1 ano	~24 meses
Tipo de Mutação	Mutação germinativa	Mutação somática
Risco para outros tumores	Tumores ósseos Câncer de pele Pinealoma Outros tumores	Risco de osteossarcoma secundário (associado ao tratamento)

berados e promovem a expressão de genes que é necessária para a divisão celular. A pRB fosforilada (resíduos de treonina da pRB) encontra-se inativada por uma alteração da sua estrutura conformacional que libera a proteína E2F, um importante fator de transcrição. A atividade da pRB é controlada pelas cdk e inibidores de cdk<sup>4</sup>.

A inativação da regulação da pRB é um evento inicial necessário para o desenvolvimento do retinoblastoma e também está envolvido com a tumorigênese de outras neoplasias como os osteossarcomas e melanomas.

### MUTAÇÕES GERMINATIVAS NO GENE *RB1* E CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

O espectro das mutações do gene *RB1* varia desde alterações cromossômicas (deleções citogenéticas), genômicas (deleções submicroscópicas), bem como intragênicas (mutações de ponto). As mutações pontuais incluem tanto substituições de bases únicas, quanto pequenas deleções e inserções, até mesmo mutações complexas (Tabela 29.9.2). Cerca de 400 mutações germinativas distintas no gene *RB1* já foram relatadas em pacientes com retinoblastoma através do estudo do DNA. Cerca de 85-90% das mutações resultam de terminação prematura de um códon, através de substituição única de bases, mutações *frameshift*, ou mutações intrônicas em sítios de *splicing*.

Na maioria das famílias com retinoblastoma, todos os membros que herdaram a mutação germinativa desenvolvem múltiplos tumores em ambos os olhos. Muitas dessas famílias segregam alelos nulos que são alteradas por mutações *non-sense* ou *frameshift*. Algumas famílias têm baixa penetrância com expressividade reduzida (prevalência aumentada em retinoblastoma unilateral) e penetrância incompleta (25% ou menos). Esta baixa penetrância parece estar associada com uma mutação dos alelos *RB1* mostrando mutação na região promotora do gene *RB1* ou mutação tipo *missense* na região codificadora. Uma terceira categoria de famílias mostra penetrância reduzida, mas a expressividade não está reduzida em membros de uma família com retinoblastoma<sup>7</sup>.

Deleções visíveis ao exame citogenético envolvendo 13q14 resultam em deleções de outros genes na mesma região cromossômica podendo causar atraso de desenvolvimento e dismorfismo facial moderado<sup>2</sup>. Pequenas deleções do 13q14 mostram reduzida expressividade, uma proporção considerável destes pacientes mostram retinoblastoma unilateral apenas.

### ACONSELHAMENTO GENÉTICO

É importante ressaltar que os pacientes que apresentam a forma hereditária, com mutação germinativa *RB1*, têm risco aumentado para desenvolvimento de tumores extra-oculares. Outros tumores observados nestes pacientes são: osteossar-

**Tabela 29.9.2**  
**Distribuição das Mutações Intragênicas do Gene *RB1* em 19 Relatos Internacionais pelo País de Origem<sup>5</sup>**

<i>Tipo de Mutação</i>	<i>Alemanha</i>	<i>França</i>	<i>Reino Unido</i>	<i>Japão</i>	<i>Argentina</i>	<i>Estados Unidos</i>	<i>Total (%)</i>
Non-sense	41	14	25	2	1	0	83 (43)
Frameshift	27	20	12	5	3	0	67 (35)
Intron	9	5	4	4	0	1	23 (12)
Missense	2	5	3	1	0	0	11 (6)
Deleção <i>in-frame</i>	4	1	0	0	0	0	5 (3)
Promotor	0	0	1	0	0	2	3 (2)
Total	83	45	45	12	4	3	192

coma, sarcoma de tecidos moles e melanoma. Estes tumores geralmente se manifestam na adolescência ou na fase adulta. A incidência de tumores secundários é aumentada em mais de 50% em pacientes tratados com radioterapia.

Os familiares de primeiro grau (pais e irmãos) de pacientes com retinoblastoma hereditário sem história familiar devem ser investigados com fundo de olho. Nesses casos, há indicação do exame oftalmológico dos pais à procura de retinomas ou retinocitomas, que é a lesão cicatricial de um retinoblastoma que sofreu regressão espontânea. Do ponto de vista genético, tem o mesmo significado que o retinoblastoma causado por inativação do gene *RBI*.

Alguns exames laboratoriais estão disponíveis e nos auxiliam no diagnóstico e no aconselhamento genético. O estudo citogenético dos linfócitos do sangue periférico (por cariótipo ou por FISH) detecta deleções visíveis ou rearranjos envolvendo 13q14.-q14.2. É recomendado que esse estudo tenha resolução de cerca de 600-650 bandas e que pelo menos 30 metáfises sejam analisadas. As alterações em mosaico estão presentes em cerca de 1% dos pacientes. No entanto, estes exames só mostram anomalias cromossômicas em apenas 7,5% dos pacientes com retinoblastoma bilateral. Isso ocorre porque a análise citogenética tem baixa resolução e detecta apenas as grandes alterações. A técnica de Southern blot pode detectar pequenos rearranjos do DNA em 16% dos pacientes. Técnicas moleculares mais sofisticadas podem

detectar pequenas mutações e vêm sendo usadas, incluindo o SSCP (*single strand conformational polymorphism*), análise por heteroduplex, e o seqüenciamento direto. Essas técnicas são capazes de detectar mudanças de um único par de bases, e identificam a mutação germinativa em até 75% dos pacientes com retinoblastoma hereditário<sup>7</sup>.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Albert DM. Historic review of retinoblastoma. *Ophthalmology*, 94(6):654-662, 1997.
2. Brown S et al. Preliminary definition of a critical region of chromosome 13 in q32: Report of 14 cases with 13q deletions and review of the literature. *Am J Med Genet*, 45:52-59, 1993.
3. Camargo B, Lopes LF. *Pediatria Oncológica*, 88-92, 2000. N.R.: e a editora e cidade?
4. Duckett AS, Dagnino L, Gallie BL. Retinoblastoma: patients, tumors, gene and protein contribute to the understanding of cancer. Edited by J K Cowell. *Molecular genetics of cancer*, 297-315, 2001.
5. Harbour JW. Overview of RB gene mutations in patients with retinoblastoma. *Ophthalmology*, 105(8):1442-1447, 1998.
6. Latorre MRDO. Epidemiologia dos tumores na infância. *Acta Oncológica Brasileira*, 16(5):201-219, 1996.
7. Lohmann DR et al. Retinoblastoma. Disponível na Internet: <http://www.geneclinics.org>. N.R.: data de acesso?

## 29.10 Melanoma Familiar

Patricia Ashton-Prolla  
Charles André Carvalho

### INTRODUÇÃO

O primeiro relato de melanoma data de 1820 e descreve uma família com suspeita de suscetibilidade hereditária à doença. No entanto, somente a partir de 1983, análises genéticas formais identificaram um padrão de herança autossômica dominante em algumas famílias. Síndromes de suscetibilidade hereditária ao câncer (SSHC) podem ser definidas, no sentido mais amplo, como agrupamentos de certos tipos de neoplasias em determinada família com uma frequência maior do que a esperada para a população em geral. Atualmente, a grande maioria das SSHC está associada a mutações germinativas em genes específicos, incluindo genes supressores de tumor, oncogenes ou genes envolvidos com o reparo do DNA. Nem sempre é fácil diagnosticar uma SSHC consideran-

do unicamente dados clínicos, já que tumores esporádicos podem simular uma predisposição familiar<sup>17</sup>. Atualmente, o melanoma é considerado um modelo de doença multifatorial, onde fatores genéticos e ambientais estão envolvidos.

O melanoma é a primeira causa de morte por doenças de pele e representa cerca de 1% de todos os tumores malignos. Associado à elevada morbi-mortalidade, sua incidência tem aumentado dramaticamente nas últimas quatro décadas em diversos países industrializados. Nos EUA, 44.200 novos casos foram registrados em 1999, resultando em 7.300 mortes<sup>13</sup>; para 2002, projetam-se 53 000 novos casos<sup>14</sup>. (N.R.: informação defasada; fala-se em projeção de 53 mil novos casos para 2002, ano passado!) Entre 1973 e 1998, a incidência e a mortalidade por melanoma neste país aumentaram continuamente, em taxas superiores àquelas da maioria das outras neopla-

sias passíveis de prevenção<sup>7</sup>. Este aumento no número de novos casos pode dever-se a um diagnóstico mais precoce e eficaz e/ou a um aumento real na incidência. O envelhecimento marcado da população nos países industrializados explica grande parte deste fenômeno, associado ao aumento genérico na incidência de outras neoplasias malignas. No entanto, as mudanças culturais que levaram ao aumento na exposição solar, particularmente a valorização crescente do padrão de pele bronzeada, também podem ter contribuído para o aumento das taxas de incidência de melanoma ao longo de décadas. É fato que o diagnóstico do melanoma tem ocorrido em estágios mais precoces, resultando em importante redução na mortalidade, mas isso não parece ser o principal determinante da tendência secular de aumento na sua incidência. No Brasil, estima-se que cerca de quatro mil novos casos (INCA, 1999) sejam diagnosticados anualmente, o que provavelmente é um sub-registro dos números reais<sup>2,8</sup>.

A idade média ao diagnóstico de melanoma na população geral é de 57 anos para os homens e 50 anos para as mulheres<sup>15</sup>. Por outro lado, em indivíduos de alto risco para melanoma hereditário, esta média se antecipa para 36 anos em homens e 29 anos em mulheres. Além da idade mais precoce ao diagnóstico, os pacientes com melanoma familiar têm maior incidência de múltiplos melanomas primários<sup>6</sup>.

Como a mortalidade por melanoma é diretamente proporcional ao estágio de desenvolvimento da doença, a identificação de indivíduos geneticamente predispostos poderá ser importante para direcionar intervenções de vigilância, diagnóstico precoce e tratamento curativo.

## GENES ASSOCIADOS AO MELANOMA FAMILIAR

Quatro a 15% dos indivíduos diagnosticados com melanoma apresentam história familiar positiva para esta neoplasia. Embora agrupamentos de casos de melanoma e/ou nevos displásicos possam ocorrer em uma família devido a padrões comuns de exposição solar e não a fatores genéticos, estima-se que 5 a 7% de todos casos de melanoma sejam causados por mutações germinativas em genes de suscetibilidade e sejam, portanto, hereditários. Até o presente momento, dois genes associados a alto risco foram identificados: *CDKN2A* e *CDK4*. Um terceiro gene — *p14<sup>ARF</sup>* — também poderá ser enquadrado nesta categoria, bem como outros genes ainda não identificados (em várias famílias com história compatível há ausência de mutações nos genes descritos acima)<sup>5</sup>.

### CDKN2A

Historicamente, análises de ligação, estudos citogenéticos e de perda de heterozigosidade em indivíduos com forte história familiar associaram o locus 9p21 a um gene de suscetibilidade ao melanoma. Este gene, *p16<sup>INK4A</sup>/CDKN2A*, foi clonado em 1993 e formalmente associado a uma síndrome de melanoma familiar em 1994. Ele codifica a proteína p16, que inibe a atividade do complexo formado pela ciclina D1 com as quinases ciclina-dependentes 4 (CDK4) ou 6 (CDK6). Este complexo participa da fosforilação da proteína Rb, que permite a progressão além da fase G1 do ciclo de divisão celu-

lar. A proteína p16, portanto, tem uma ação supressora de tumor, através de regulação negativa do ciclo celular. A frequência de mutações no gene *CDKN2A* observada em vários estudos de famílias afetadas com melanoma (América do Norte, Austrália e Europa) varia de 5 a 50% (média 20%), de acordo com os critérios de inclusão das famílias. A compilação dos dados destes estudos indica que a frequência de mutações em *CDKN2A* aumenta com: a) o número de casos de melanoma na família, b) a presença de indivíduos com múltiplos melanomas primários e c) número de casos diagnosticados antes dos 50 anos. Além disso, portadores de mutação podem ter um risco aumentado de câncer de pâncreas e provavelmente de outros tumores também (carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço e tumores do sistema nervoso central). Um excesso de casos de câncer de mama também tem sido descrito em dois grupos de famílias (italianas e suecas), mas esta observação aguarda confirmação em um número maior de famílias. Além de famílias com múltiplos casos de melanoma, mutações em *CDKN2A* têm sido identificadas em 10% dos indivíduos com múltiplos melanomas primários na ausência de história familiar. Deve ser ressaltado que a frequência de mutações neste gene na população geral não é conhecida<sup>9</sup>.

### CDK4

O gene *CDK4* é um oncogene que está localizado no cromossomo 12q13 e codifica uma proteína quinase ciclina-dependente do ciclo celular. Em todas as famílias de melanoma que apresentam uma mutação (três descritas até o momento), esta se localiza no códon 24 dentro do domínio que liga CDK4 à proteína p16<sup>20</sup>.

### p14<sup>ARF</sup>

O locus p16 é peculiar pela sua capacidade de codificar dois genes diferentes, a partir de quadros de leitura distintos. O gene *CDKN2A*, que codifica p16, divide-se nos éxons E1a, E2 e E3. O transcrito alternativo desta região inicia a partir do éxon E1b (10 a 20 kb acima de E1a) e compreende também as seqüências de E2 e E3, dando origem às proteínas p19<sup>ARF</sup> (em camundongos) e p14<sup>ARF</sup> (em humanos), que não apresentam homologia significativa de sua seqüência de aminoácidos com p16, mas têm um papel importante de inibição do ciclo celular<sup>19</sup>. Do ponto de vista funcional, ambos produtos gênicos agem regulando negativamente a progressão do ciclo celular. A proteína p16 inibe competitivamente CDK4, que é um fator necessário para a progressão das células através de um ponto importante de transição do ciclo de divisão celular (após G1).

Alterações funcionais de p16 (por mutações de ponto ou deleções) aumentam a probabilidade de que células com DNA danificado escapem de processos de reparo antes da divisão celular. A proteína p14<sup>ARF</sup> regula o crescimento celular através de efeitos independentes sobre a via regulatória de p53. Sendo assim, p14<sup>ARF</sup> poderia ser um excelente candidato à condição de terceiro gene associado com melanoma hereditário. Recentemente, foram descritas quatro famílias

com múltiplos casos de melanoma e tumores do sistema nervoso central (SNC) que apresentavam mutações envolvendo a perda funcional de *p14<sup>ARF</sup>*, associando de uma forma mais definitiva esse gene à ocorrência de uma síndrome de melanoma e tumores do SNC<sup>3</sup>.

## OUTROS GENES

A presença de mutações no gene *BRCA2*, associado à síndrome de suscetibilidade hereditária ao câncer de mama e ovário, também confere um risco aumentado de melanoma<sup>16</sup>, assim como o diagnóstico de retinoblastoma, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Von Hippel-Lindau e xeroderma pigmentoso (Tabela 29.10.1)<sup>12</sup>.

## OUTROS FATORES DE RISCO GENÉTICO PARA MELANOMA

### MC1R

Além das raras mutações deletérias em genes de alta penetrância como *CDKN2A* e *CDK4*, variantes alélicas frequentes de genes de baixo risco estão provavelmente envolvidas na suscetibilidade ao melanoma. Tais variantes alélicas poderiam agir como modificadores de genes de alto risco em famílias afetadas ou como genes de suscetibilidade de baixa penetrância em casos esporádicos ou famílias com poucos casos. Considerando a exposição à radiação ultravioleta e as reações da pele a tal exposição como importantes fatores de risco, é lógico pensar que alguns destes genes de baixa penetrância estejam envolvidos com os processos de pigmentação, reparo de DNA e metabolismo de carcinógenos. Nesse contexto, o único gene que confere um risco levemente aumentado de melanoma até hoje identificado — *melanocortin-1 receptor gene (MC1R)* — codifica uma proteína que tem papel chave no processo de pigmentação da pele. O gene, localizado em 16q24, é marcadamente

polimórfico em indivíduos brancos, com mais de 20 variantes alélicas descritas. Estudos recentes mostraram que algumas destas variantes modulam o tipo de pele, a capacidade de bronzear, a cor do cabelo e o risco de melanoma, estabelecendo um elo de ligação entre estas características cutâneas e o risco de desenvolver melanoma<sup>5</sup>.

## NEUROFIBROMATOSE TIPO 1

Embora uma associação definitiva entre melanoma e neurofibromas não tenha sido descrita até o momento, alguns estudos sugerem tal possibilidade. Os melanócitos são responsáveis pelas características mais proeminentes da neurofibromatose, (manchas café-com-leite e os nevos gigantes congênitos) e, além disso, têm a mesma origem embrionária da maioria dos tumores associados à neurofibromatose (neuroectoderma)<sup>10</sup>. Uma observação interessante é a perda dos dois alelos do gene *NF1* na maioria das linhagens celulares de melanoma, sugerindo que esse gene pudesse ter um papel importante no desenvolvimento ou na progressão do melanoma<sup>1</sup>. Ainda, um estudo recente identificou uma mutação germinativa afetando o processamento do RNA dos genes *CDKN2A* e *p14<sup>ARF</sup>* em uma família com múltiplos casos de melanoma e neurofibromas<sup>18</sup>.

## INTERAÇÃO GENE-AMBIENTE

O risco que portadores de mutação em *CDKN2A* têm de desenvolver melanoma (isto é, a penetrância) foi recentemente estimado usando um total de 80 famílias provenientes da Europa, América e Austrália. Esta análise, baseada em modelos de regressão logística, mostrou uma variação no risco de melanoma de acordo com a origem geográfica: o risco cumulativo de melanoma aos 80 anos de idade foi de 58% nas famílias européias, 76% nas famílias americanas e 91% nas famílias australianas. Estes achados sugerem uma interação de *CDKN2A* com o grau de exposição solar, que por sua vez se

Tabela 29.10.1  
Genes Associados a Melanoma Familiar

Gene	Síndrome	Locus
<i>CDKN2A CDK4</i>	Melanoma familiar	9p21 12q14
<i>BRCA2</i>	Síndrome de câncer de mama e ovário hereditários	13q12-q13
<i>RB1</i>	Retinoblastoma hereditário	13q14
<i>TP53</i>	Síndrome de Li-Fraumeni	17p13
<i>VHL</i>	Síndrome de Von Hippel-Lindau	3p25-p26
<i>XPA</i>	Xeroderma pigmentoso	9q34
<i>XPB</i>		2q21
<i>XPC</i>		3p25
<i>XPD</i>		19q13
<i>XPE</i>		11p12
<i>XPF</i>		16p13
<i>XPG</i>		13q32

**Tabela 29.10.2**  
**Recomendações de Manejo de Pacientes de Alto Risco para Melanoma**

<i>Modificação de Fatores de Risco</i>	<i>Rastreamento</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>- proteção solar intensa com vestuário apropriado e filtros solares (FPS &gt; 15; UVA/UVB)</li> <li>- evitar queimaduras solares</li> <li>- evitar exposição a fontes intensas de radiação UV (bronzeadores artificiais, exposição ocupacional)</li> <li>- evitar imunossupressão e exposição a psoraleno + UVA</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- exame dermatológico de base aos 10 anos</li> <li>- educação quanto ao auto-exame mensal</li> <li>- exame dermatológico semestral incluindo genitália e escalo até estabilização dos nevos (exclui puberdade e gestação)</li> <li>- exame dermatológico anual após estabilização dos nevos</li> <li>- remoção de toda lesão pigmentada suspeita</li> <li>- US abdominal anual em indivíduos com HF de câncer de pâncreas*</li> <li>- fundoscopia anual em indivíduos com HF de melanoma ocular*</li> </ul>

(\*) Não existe qualquer evidência quanto à eficácia destas medidas.

Abreviações: FPS: fator de proteção solar; UV: ultravioleta; US: ultra-sonografia; HF: história familiar.

correlaciona com a latitude. Este risco independe do sexo do indivíduo e do efeito funcional das diferentes mutações (isto é, se alteram ou não p16 e p14<sup>ARF</sup> simultaneamente) e sugere que os mesmos fatores que afetam a incidência de melanoma em diferentes populações possam também mediar a penetrância de mutações em CDKN2A<sup>4</sup>.

### ASPECTOS PRÁTICOS DO DIAGNÓSTICO E MANEJO DO MELANOMA FAMILIAR

O primeiro passo para identificação de indivíduos em risco para o melanoma familiar é a revisão detalhada da história familiar, com a construção de heredograma de pelo menos três gerações e confirmação dos diagnósticos de neoplasia com laudos anátomo-patológicos sempre que possível. Embora os casos mais evidentes sejam aqueles com múltiplos afetados por melanoma na família, esses não são os mais comuns. A presença de melanoma e outra neoplasia maligna primária ou de múltiplos melanomas primários no mesmo indivíduo deve sempre levantar a suspeita de um fator genético predisponente, especialmente se os diagnósticos forem em idade precoce. A presença de outros tumores na família não exclui a possibilidade de uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer e o diagnóstico específico dependerá dos tipos e idades em que esses tumores não-melanoma ocorreram.

O Consórcio de Genética e Melanoma, um grupo internacional de estudo do melanoma hereditário, concluiu recentemente que o nível de evidência atual não permite ainda utilizar o diagnóstico de uma mutação em *CDKN2A* como determinante absoluto de condutas de prevenção e rastreamento. Este mesmo grupo sugere que estudos genéticos do melanoma familiar sejam ainda realizados somente no contexto de pesquisa<sup>11</sup>. Mesmo assim, vários investigadores sugeriram que estratégias de prevenção e rastreamento intensivo sejam oferecidas a indivíduos de risco. Estas recomendações de manejo, baseadas em evidências de nível IV apenas centralizam-se em dois aspectos principais: a) modificação de fatores de risco para o melanoma e b) o rastreamento com o objetivo de otimizar detecção e exérese precoce do melanoma

(Tabela 29.10.2). Estudos adicionais de seguimento em longo prazo com grupos maiores de pacientes de diversas populações serão necessários para determinar a real eficácia destas medidas em indivíduos de alto risco para o melanoma hereditário.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andersen LB, Fountain JW, Gutmann DH et al. Mutations in the neurofibromatosis 1 gene in sporadic malignant melanoma cell lines. *Nat Genet*, 3(2):118-121, 1993.
2. Azevedo G, Mendonça S. Risco crescente de melanoma de pele no Brasil. *Rev Saude Publ*, 26:290-294, 1992.
3. Bahau M, Vidaud D, Jenkins RB et al. Germline deletion involving the INK4 locus in hereditary proneness to melanoma and nervous system tumors. *Cancer Res*, 58:2298-2303, 1998.
4. Bishop DT, Demenais F, Goldstein AM et al. Geographical variation in the penetrance of CDKN2A mutations for melanoma. *J Natl Cancer Inst*, 94(12):894-903, 2002.
5. Bressac-de-Paillerets B, Avril MF, Chompret A, Demenais F. Genetic and environmental factors in cutaneous malignant melanoma. *Biochimie*, 84:67-74, 2002.
6. Greene MH. The genetics of hereditary melanoma and nevi. 1998 Update. *Cancer*, 86:1644-57, 1999.
7. Howe HL, Wingo PA, Thun MJ et al. Annual report to the Nation on the Status of Cancer (1973 through 1998), featuring cancers with recent increasing trends. *J Natl Cancer Inst*, 93:824-842, 2001.
8. Instituto Nacional do Câncer, Brasil. Disponível na Internet: <http://www.inca.org.br>.
9. Kamb A, Gruis NA, Weaver-Feldhaus J et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science*, 264:436-440, 1994.
10. Karakayali G, Güngör E, Lenk N et al. Neurofibromatosis and cutaneous melanoma: coincidence or association? *J Eur Acad Dermatol Venereol*, 12(2):190-2, 1999.
11. Kefford R, Bishop JN, Tucker M et al. Genetic testing for melanoma. *Lancet Oncol*, Nov, 3(11):653-4, 2002.

12. Lindor NM, Greene MH and the Mayo Familial Cancer Program. The Concise Handbook of Family Cancer Syndromes. *J Natl Cancer Inst*, 90:1039-1071, 1998.
13. Melanoma — National Cancer Institute — CancerNet. Disponível na Internet: <http://cancernet.nci.nih.gov>. N.R.: data de acesso?
14. Melanoma: epidemic or better detection? *Harv Health Lett*, Jul, 27(9):7, 2002.
15. Miller BA et al. *Cancer Statistics Review 1973 — 1989*. NIH Publ N° 92 — 2789. Bethesda, Md: NCI, 1992.
16. Neuhausen S, Godwin AK, Gershoni-Baruch R et al. Haplotype and phenotype analysis of nine recurrent BRCA2 mutations in 111 families: results of an international study. *Am J Hum Genet*, 62:1381-1388, 1998.
17. Offit K (ed). *Clinical cancer genetics and risk counseling*. In: *Clinical Cancer Genetics: Risk Counseling and Management*. Wiley-Liss, New York, 1-20, 1998.
18. Petronzelli F, Sollima D, Coppola G et al. CDKN2A germline splicing mutation affecting both p16INK4 and p14arf RNA processing in a melanoma/neurofibroma kindred. *Gen Chrom Cancer*, 31:398-401, 2001.
19. Piepkorn M. Melanoma genetics: an update with focus on the CDKN2A(p16)/ARF tumor suppressors. *J Am Acad Dermatol*, 42:705-722, 2000.
20. Zuo L, Weger J, Yang Q et al. Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in hereditary melanoma. *Nat Genet*, 12:97-99, 1996.



## Anexo 4 - Ficha de Avaliação Clínica

### SÍNDROME DE LI-FRAUMENI

#### Identificação:

Nome: \_\_\_\_\_  
Data de Nascimento: \_\_\_\_\_ Sexo: M/F Raça: \_\_\_\_\_ Religião \_\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_ Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_  
CEP: \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ E-mail: \_\_\_\_\_

#### Manifestações Clínicas:

Tumores	Único	Múltiplo ou bilat.	Idade ao diagnóstico	Observações
<input type="checkbox"/> Sarcoma de partes moles				
<input type="checkbox"/> Osteosarcoma				
<input type="checkbox"/> Cancer adreno-cortical				
<input type="checkbox"/> Tumor do sist. nervoso central				
<input type="checkbox"/> Leucemia				
<input type="checkbox"/> Tumor de Wilms				
<input type="checkbox"/> Câncer de mama				
<input type="checkbox"/> Melanoma				
<input type="checkbox"/> Câncer de pâncreas				
<input type="checkbox"/> Tumor de próstata				
<input type="checkbox"/> Linfoma				
<input type="checkbox"/> Outros				

#### Exames Realizados:

USG abdome. Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_  
 USG tireóide Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_  
 Mamografia/US de mama. Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_  
 Biópsia de: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_  
 Outros: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_

#### História Patológica Progressiva:

Cirurgias: \_\_\_\_\_ S/N. Qual: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
 Doenças Prévias: \_\_\_\_\_ S/N. Qual: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_\_\_  
 Exposição ambiental: \_\_\_\_\_ Período: \_\_\_\_\_

#### Hábitos

Tabaco: \_\_\_\_\_ S/N.Nº de cigarros/dia: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_  
 Álcool: \_\_\_\_\_ S/N.Doses/dia: \_\_\_\_\_ Duração: \_\_\_\_\_

#### História Familiar:

Grau de parentesco	Nome (Iniciais)	Sexo	Idade Atual	Idade ao diagnóstico	Tipo de Tumor

#### Heredograma:

## Anexo 5

## Termo de Consentimento Pós-Informado

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução CNS 196/96 e Resolução CNS 251/97 do Ministério da Saúde)

**Hospital do Câncer – A. C. Camargo – Fundação Antonio Prudente**  
Rua Prof. Antonio Prudente, 211 – Tel.3272-5000 – Fax. 3272-5088

### I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
Documento de Identidade: \_\_\_\_\_ Data de Nascimento: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Endereço: \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_ Complemento: \_\_\_\_\_  
Cidade: \_\_\_\_\_ Estado: \_\_\_\_\_ CEP: \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ Tel:(\_\_\_\_) \_\_\_\_\_

### II – DADOS SOBRE O ESTUDO

- 1- Título: “DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS”
- 2- Pesquisador: Dra. Maria Isabel Waddington Achatz CRM – 105322  
no Laboratório de Genética do Câncer - Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer - São Paulo.  
Telefone para contato: 9631-4796.  
Início do Estudo: 15 de setembro de 2003.

### III – EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL

- 1- JUSTIFICATIVA E OBJETIVOS DA PESQUISA: O diagnóstico da Síndrome de Li-Fraumeni é de grande importância clínica para a prevenção de neoplasias em famílias portadoras, que apresentam maior propensão ao desenvolvimento de múltiplos tumores. Este estudo visa realizar o diagnóstico molecular da Síndrome de Li-Fraumeni, identificar e caracterizar as mutações no gene *TP53* nos indivíduos portadores da doença.
- 2- PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS: Serão coletados 20 mL de sangue do paciente para estudo de DNA. O gene *TP53* será analisado por técnicas de biologia molecular visando a detecção da mutação.
- 3- COMPLICAÇÕES E RISCOS ESPERADOS: A SLF é uma síndrome hereditária de predisposição ao câncer. Estima-se que metade dos pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni apresente desenvolvimento de tumores antes dos 30 anos de idade e que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 70 anos de idade. O risco aparenta ser maior em mulheres, em parte devido ao alto risco de desenvolvimento de câncer de mama. Diversos tipos de tumores malignos estão diretamente relacionados à Síndrome de Li-Fraumeni, tais como sarcoma, leucemia, tumores do sistema nervoso central, câncer adrenocortical e câncer de mama de início em idade jovem. Estas lesões podem ser rastreadas e encontradas em estádios iniciais, permitindo tratamento precoce e muitas vezes menos invasivo. O teste genético visa identificar a mutação no gene *TP53* e confirmar o diagnóstico clínico da doença. No entanto, em cerca de 30% dos casos na Síndrome de Li-Fraumeni e em 50% dos casos na Síndrome de Li-Fraumeni like não é possível detectar a mutação pelos métodos atuais.
- 4- BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS: Este estudo permite o diagnóstico molecular da Síndrome de Li-Fraumeni em famílias brasileiras, confirmando o diagnóstico clínico e caracterizando as mutações do gene *TP53*. Uma vez identificada a mutação, o diagnóstico em familiares assintomáticos pode ser realizada, seguida do aconselhamento genético das famílias acometidas. A realização do teste possibilita o rastreamento de pacientes portadores da Síndrome de Li-Fraumeni que possivelmente desenvolverão algum tumor típico, diminuindo desta forma os danos causados pelo tumor devido ao diagnóstico e tratamento precoce. A caracterização da mutação no gene *TP53* e a comparação com as mutações encontradas anteriormente possibilitarão a melhor compreensão dos mecanismos da doença e o desenvolvimento de estratégias de rastreamento mais eficazes. A detecção da mutação permite caracterizar o risco do paciente como alto risco, quando o resultado for positivo, ou como baixo risco quando o exame for negativo (quando não for encontrada a mesma mutação característica da família). Caso a mutação na família com o diagnóstico clínico não seja encontrada, o teste será considerado inconclusivo.
- 5- Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e ao tratamento e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

- 6- Declaro estar ciente do meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade do meu tratamento.  
SIM NÃO
- 7- Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhum tipo de remuneração financeira.  
SIM NÃO
- 8- Declaro ter sido esclarecida sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.  
SIM NÃO
- 9- CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO: Declaro ter sido esclarecido sobre as características da Síndrome de Li-Fraumeni e sobre os benefícios e as limitações do teste genético ao qual serei submetido, conforme definido nos itens 1 a 9, e consinto em participar na qualidade de paciente do projeto de pesquisa acima descrito.

“Se o pesquisador principal não fornecer as informações/ esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo Telefone 2189-5000, ramais 1113 ou 1117”.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura e carimbo do pesquisador

## **Anexo 6 - Aprovação do Comitê de Ética**















































## Anexo 8 - Laudos fornecidos aos probandos



**Paciente:**

**Gene analisado:** *TP53*

**Data de Coleta:**

**Médico:** Maria Isabel Waddington Achatz

### **Análise de mutações no gene *TP53***

**Exame Realizado:** Após a coleta do sangue e extração do DNA dos linfócitos, os 10 exons codificadores do gene *TP53* (2 a 11) foram amplificados através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os exons 4, 5, 6, 7, 8 e 9 do gene *TP53* foram analisados através da técnica de cromatografia líquida desnaturante de alta performance (DHPLC). Todos os exons que apresentaram suspeita de alteração foram analisados por sequenciamento. Os exons 2, 3, 10 e 11 foram analisados por sequenciamento direto. Os relatos na literatura indicam que mutações germinativas no gene *TP53* devem ser encontradas em 77% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni clássica (LFS) e entre 20 a 40% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni like (LFL).<sup>I</sup>

**Resultado:** Foi observada a presença das seguintes alterações:

- R337H : CGC (Arg) → CAC (His) no codon 337 do exon 10.
- Os demais exons estudados não apresentaram evidências moleculares de polimorfismo ou mutação.

**Interpretação:** A análise de fragmentos de DNA por cromatografia líquida desnaturante de alta performance (DHPLC – Denaturing High Performance Liquid Chromatography) é um dos mais precisos métodos disponíveis para a detecção de alterações de sequência em fragmentos de DNA, com sensibilidade de virtualmente 100% na região analisada.

- A substituição de uma arginina por uma histidina no codon 337 já foi descrita como relacionada à alta incidência de tumores adrenocorticais e em estudos funcionais foi considerada como mutação.<sup>II, III</sup> É descrita como mutação no Banco de Dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC/WHO).<sup>IV</sup> **Esta substituição altera a sequência de aminoácidos levando a produção anômala da proteína p53 e caracterizando molecularmente a síndrome de Li-Fraumeni.**

Fonte: Banco de Dados da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC/WHO) (IARC *TP53* Database R10). <http://www.iarc.fr/p53/Germline.htm>

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

<sup>II</sup> 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.

<sup>III</sup> Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca 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.

<sup>IV</sup> Olivier M, Eeles R, Hollstein M, Khan MA, Harris CC, Hainaut P. The IARC *TP53* Database: new online mutation analysis and recommendations to users. Version: R10, July 2005. **Hum Mutat** 2002; 19:607-14.

## Anexo 9 - Laudos fornecidos aos familiares



**Paciente:**

**Gene analisado:** éxon 10 do gene *TP53*

**Data de Coleta:**

**Médico:** Maria Isabel Waddington Achatz

### **Análise da mutação R337H no éxon 10 do gene *TP53***

**Exame Realizado:** Após a coleta do sangue e extração do DNA dos linfócitos, o éxon 10 do gene *TP53* foi amplificado através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Em seguida foi analisado por sequenciamento direto. Os relatos na literatura indicam que mutações germinativas no gene *TP53* devem ser encontradas em 77% das famílias com Síndrome de Li-Fraumeni clássica (SLF) e entre 20 a 40% das famílias com síndrome de Li-Fraumeni like (LFL).

**Resultado:** O éxon 10 não apresentou evidências moleculares de polimorfismo ou mutação.

**Interpretação:** Não foram caracterizadas mutações germinativas pelos métodos utilizados.