

**ANÁLISE DE MUTAÇÃO GERMINATIVA p.R337H NO
GENE TP53 EM PORTADORES DE CARCINOMA DE
CÉLULAS RENAI TIPO CÉLULAS CLARAS**

MAURICIO AKIRA GONÇALVES ASSAKAWA

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Stênio de Cássio Zequi

**Co-Orientadores: Dra. Maria Isabel Alves de Souza
Waddington Achatz; Dr. Walter Henriques da
Costa**

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Gonçalves, Mauricio Akira

Análise de mutação germinativa P.R337h no gene TP53 em portadores de carcinoma de células renais tipo células claras / Mauricio Akira Gonçalves Assakawa – São Paulo, 2017.

33p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Stênio de Cássio Zequi

Descritores: 1. Mutação em Linhagem Germinativa/Germ-Line Mutation. 2. Carcinoma de Células Renais/Carcinoma, Renal Cell. 3. Genes p53/genética/ Genes, p53/genetics. 4. Síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni Syndrome

DEDICATÓRIA

**Aos meus amados e queridos pais, Jorge e Regina,
por todo o amor, carinho e apoio incondicionais;
fundamentais na minha vida.**

**Aos meus queridos avós Nair, José Gonçalves,
Tsutome e Akira Assakawa (in memoriam).
Com certeza orgulhosos, onde estiverem.**

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Stênio de Cássio Zequi, pelo apoio, paciência e ensinamentos. Um grande médico, pesquisador e professor que tive o prazer de conviver nesses últimos anos.

À Dra. Maria Isabel Alves de Souza Waddington Achatz, minha co-orientadora, por todo o suporte e sabedoria compartilhada. Agradeço pela oportunidade de trabalharem um departamento onde todos têm orgulho de sua líder.

Ao Dr. Walter Henriques da Costa, meu co-orientador, pelo apoio inquestionável. Agradeço por sua competência e dedicação, um exemplo de profissional em que muitos se inspiram.

Ao Prof. Dr. Ademar Lopes, diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica do A.C.Camargo Cancer Center, pelo apoio e sabedoria compartilhada.

Ao Dr. Gustavo Guimarães, diretor do Departamento de Urologia do A.C.Camargo Cancer Center pelo apoio e colaboração.

À equipe do laboratório de Oncogenética, Renata Tonhosolo, Karina Santiago e Fernanda Fortes, por todo apoio, ensinamento e paciência.

Aos coordenadores e equipe do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center, Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos e Dra. Dirce Maria Carraro, Louise Danielle de Carvalho Mota e Eloísa Helena Ribeiro Olivieri, pelo apoio durante fase fundamental do projeto.

Aos bibliotecários do A.C.Camargo Cancer Center, em nome da Sra. Suely Francisco, pelo apoio e atenção na revisão desta dissertação.

Às Sras. Karla Cristina Brito de Barros, Luciana Costa Pitombeira, e Ana Maria Kuninari da Pós-Graduação do A.C.Camargo Cancer Center pela ajuda e orientação.

Ao A.C.Camargo Cancer Center e seu programa de pós-graduação pela enorme oportunidade que me foi oferecida.

Ao Prof. Dr. Marjo Deninson Cardenuto Perez, Dr. Moacyr Fucs, Dr. Lívio Beneduzzi, Dr. Celso Oliveira, Dr. Roni de Carvalho Fernandes, Dr. Christian Fuhro, Dr. Márcio Rosa Pagan, Dr. Dalmo de Barros, Dr. Luis Gustavo Morato, Dr. Marcos Bróglia, Dr. Alex Menezes e Dr. Artur Ramos Moreno pelo apoio e ensinamentos durante a residência médica.

Ao Dr. Silvio da Ressurreição Pires, pelos ensinamentos durante e após a residência médica, exemplo constante de capacidade e seriedade.

Aos colegas e amigos Dr. Álvaro Bosco, Dr. Gustavo Cuck, Dr. Deusdetit Vieira Cortez e Dr. Luiz Renato Guidoni pelo incentivo, ajuda e confiança.

Aos colegas Dr. Rui Mascarenhas, Dr. André Costa Matos, Dr. Ravendra Ryan Moniz, Dr. Moacir Rafael Radaelli, Dr. Hallison Castro, Dr. Raphael Moreira, Dr. André Mazzini, Dr. Bruno César Vedovato e pela convivência, companherismo e ensinamentos durante a residência médica.

Aos amigos e colegas Dr. Leandro Ricciluca Matiello Félix e Dra Fernanda Bellotti Formiga pela amizade e companherismo durante e depois da residência médica.

Ao colega Dr. Paulo Maron, companheiro de pós-graduação. Por toda a ajuda e convivência durante esse período.

Aos amigos e colegas de faculdade Dr. Guilherme Braga Lamacchia, Dr. Noé de Marchi Neto, Dr. Diego Tebaldi e Dr. Yoshinobu Nagasse pelo companherismo e amizade desde os primeiros dias de Santa Casa até hoje.

RESUMO

Assakawa MAG. **Análise de mutação germinativa p.R337h no gene *TP53* em portadores de carcinoma de células renais tipo células claras.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

A maioria dos carcinomas de células renais é classificado como esporádico. O subtipo células claras é o mais frequente (80-90%). As síndromes hereditárias relacionadas ao aumento da chance do desenvolvimento de câncer renal são responsáveis por 3% a 5% dos casos, no entanto estima-se que este número seja subestimado. Até o momento, foram descritas dez síndromes e doze genes relacionados ao risco hereditário de câncer renal. Na população brasileira, foi identificada a maior prevalência de uma mutação específica do gene supressor tumoral *TP53* (p.R337H) relacionada à Síndrome Li-Fraumeni, a qual está relacionada ao desenvolvimento de tumores em idade precoce. O objetivo desse estudo foi avaliar a presença da mutação germinativa p.R337H no gene *TP53* em pacientes portadores de carcinoma de células renais subtipo células claras, permitindo a definição da ocorrência do câncer renal como parte do espectro tumoral de pacientes portadores da mutação p.R337H. Amostras de sangue obtidas de pacientes submetidos à nefrectomia parcial ou radical no A.C. Camargo Cancer Center entre os anos de 2007 a 2014 com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma de células renais do tipo células claras, foram utilizadas para investigação da presença da mutação p.R337H. A mutação foi pesquisada por meio de Polimorfismo no Comprimento do Fragmento de Restrição (*PCR-RFLP*) específica para o Éxon 10 do gene *TP53* e para confirmação, realizou-se sequenciamento pelo método Sanger. Foram avaliadas duzentas e cinco amostras e apenas 0,5% apresentou a mutação p.R337H. Este estudo tentou correlacionar a Síndrome Li-Fraumeni ao câncer renal, propiciando a realização de pesquisas futuras para o entendimento das síndromes hereditárias relacionadas ao câncer renal, embora os dados gerados neste projeto não sugerem correlação específica entre a mutação estudada e desenvolvimento de câncer renal subtipo células claras.

SUMMARY

Assakawa MAG. **[TP53 p.R337h germline mutation analysis in patients with clear cell renal cell carcinoma]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Most cases of Renal Cell Carcinoma are classified as sporadic tumor. Clear Cell is the most frequent subtype (80-90%). Hereditary syndromes related to a greater chance of developing kidney cancer are responsible for 3% to 5% of the cases but this number is sub estimated. Ten syndromes and 12 genes related to kidney cancer have been described until this date. In the Brazilian population, an specific mutation on the tumoral supressor gene p53 has been identified (p.R337H) related to Li-Fraumeni Syndrome, which is associated with an early onset of tumors. The main purpose of this project is to evaluate the presence of the germinative mutation p.R337H in the gene p53 in patients with Renal Cell Carcinoma – Clear Cell subtype. We will be able to define the Renal Cell Carcinoma as part of p.R337H mutation spectrum. Patients that went throught partial or radical nephrectomy between 2007 and 2014 in our institution, and the tumors were classified as RCC – Clear Cell subtype will be included in this study. The mutation was investigated by PCR-RFLP specific to TP53 exon 10 and confirmation sequencing was performed by the Sanger method. Two hundred and five samples were evaluated and only one (corresponding to 0.5 %) presented p.R337H mutation. This study attempted to correlate the Li- Fraumeni syndrome with renal cancer, leading to future researches to understand the hereditary syndromes related to renal cancer, even though the data in this project exclusively cannot corralate the studied mutation and development of kidney cancer clear cell subtype.

LISTA DE FIGURAS E QUADRO

Figura 1	O gene TP53 e a proteína p53.....	9
Figura 2	PCR-RFLP para triagem da mutação p.R337h em pacientes com câncer renal de células claras.....	18
Figura 3	Detecção da mutação p.R337h no gene TP53, por meio de PCR-RFLP e sequenciamento em paciente com carcinoma renal de células claras atendido no A.C.Camargo Cancer Center.....	19
Quadro 1	Síndromes hereditárias relacionadas ao risco aumentado de câncer renal.....	7

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Carcinoma de Células Renais	2
1.2	Síndomes Hereditárias e o Câncer Renal	5
1.3	Síndrome Li-Fraumeni	7
1.4	Gene, Proteína TP53 e Mutação Germinativa P.R337H	9
2	JUSTIFICATIVAS.....	11
3	OBJETIVO.....	12
4	MATERIAIS E MÉTODOS	13
4.1	Casuística.....	13
4.2	Triagem da Mutação p.r337h em Pacientes com Carcinoma Renal Tipo Células Claras por Meio PCR-RFLP	13
4.3	Confirmação da Mutação P.R337H em Pacientes com Carcinoma Renal Tipo Células Claras por Meio de Sequenciamento Sanger	14
5	RISCOS E ASPECTOS ÉTICOS	17
6	RESULTADOS	18
7	DISCUSSÃO	20
8	CONCLUSÃO.....	24
9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	25

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

A carcinogênese resulta de várias etapas e pode envolver diferentes genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos, sendo os principais grupos de genes envolvidos nesse processo: i) proto-oncogenes, ii) genes supressores de tumor e iii) genes relacionados ao reparo do DNA (DANTAS et al. 2009). A identificação de genes e os diversos mecanismos de mutação possibilita um entendimento maior sobre a doença, diagnóstico mais precoce e maior eficácia no tratamento (GARNIS et al. 2004).

No Brasil, as estimativas do Instituto Nacional do Câncer-INCA para o biênio 2016-2017 apontam para a ocorrência de aproximadamente 600.000 casos novos de câncer (Ministério da Saúde 2016). Sem considerar os casos de câncer de pele não melanoma, estimam-se 420 mil casos novos de câncer. Em homens, os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto, estômago e cavidade oral; e, nas mulheres, os de mama, cólon e reto, colo do útero, pulmão e estômago. Para a maior parte dos tumores malignos conhecidos estima-se que 5 a 10% sejam hereditários (Ministério da Saúde 2016). Portadores de síndromes hereditárias tem, na sua maioria, mutações germinativas em genes que produzem proteínas que atuam de forma fundamental impedindo a progressão no processo da carcinogênese. Estas alterações germinativas causam em seu portador um maior risco de câncer quando comparado à população em geral.

A população brasileira possui características próprias devido a sua

diversidade étnico-cultural com variações regionais. Algumas das síndromes de câncer hereditário vem sendo estudadas no país, como Retinoblastoma, Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo, Síndrome de Câncer de Mama e Ovário Hereditários, Doença de von Hippel-Lindau e Síndrome de Li-Fraumeni (DE OLIVEIRA et al. 2012; BARBOSA et al. 2013; DOMINGUEZ-VALENTIN et al. 2013; SILVA et al. 2014; GOMY et al. 2010; ACHATZ 2007). Essas síndromes apresentam particularidades quanto ao fenótipo e espectro de mutações nas famílias estudadas. Esses achados são baseados em um número limitado de famílias brasileiras, mas potencialmente aumentam o risco de câncer nos indivíduos portadores de mutações. Não é possível extrapolar os dados obtidos em outras regiões do mundo sobre a frequência de mutações e riscos relacionados a síndromes de câncer hereditário, reforçando a necessidade de conhecer as características das mutações e otimizar o rastreamento clínico levando em consideração as particularidades da nossa população.

1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS RENAIIS

O Carcinoma de Células Renais (CCR) representa 3,8% de todas as neoplasias malignas sendo responsável por aproximadamente 90% das neoplasias renais (SIEGEL et al. 2016; American Cancer Society-ACS 2017). Existe uma predominância do sexo masculino na proporção de 2:1 com maior incidência entre 60 e 70 anos de vida (LIPWORTH et al. 2006). Em 2013, em estudo epidemiológico realizado no continente europeu foram diagnosticados cerca de 84.400 novos casos de CCR e 34.700 mortes por câncer renal foram registradas (FERLAY et al. 2013).

A incidência mundial varia entre 2.9 a 15.3/100.000 habitantes (CHOW et al. 2010). No Brasil, sua incidência atinge 10 casos/100.000 na região sul do país (WUNSCH-FILHO 2002). Os principais fatores de risco são: i) história familiar, ii) tabagismo, iii) obesidade e iv) hipertensão(CHOW et al. 2010).

Os principais subtipos do carcinoma de células renais são os de células claras (80-90%), o papilífero (10-15%) e o cromóforo (4-5%) (EBLE et al. 2004). Diferentes alterações citogenéticas definem o tipo histológico, acarretando em diferentes evoluções clínicas e respostas ao tratamento instituído.

O tratamento padrão dos CCR é a cirurgia, tanto a nefrectomia radical como a nefrectomia parcial, esta última com indicações restritas a pacientes com insuficiência renal, tumores bilaterais, rins únicos e síndromes familiares com grande chance de recidiva. Atualmente, com a preocupação de preservar a máxima quantidade de néfrons possível, sua indicação vem sendo empregada para tumores de até 4,0cm com resultados oncológicos a longo prazo comparáveis ao tratamento radical (BECKER et al. 2009). A indicação da nefrectomia parcial vem aumentando para tumores de até 7,0cm com o intuito de diminuir o comprometimento da função renal a longo prazo em pacientes bem selecionados (OHNO et al. 2011). Outras possibilidades de tratamento incluem os procedimentos minimamente invasivos como a crioablação e a radiofrequência, que podem ser realizados por via laparoscópica ou percutânea. Suas indicações se limitam para tumores pequenos e de localização favorável. Os resultados oncológicos ainda são discutíveis e o acompanhamento pós terapêutica possuem limitação pelos exames de imagem disponíveis (EL DIB et al. 2012). A observação vigilante é uma opção para pacientes com tumores pequenos, de alto risco cirúrgico e idade avançada (BOSNIAK 1995).

Para a doença avançada, já com a presença de metástases a distância, a associação, quando possível, da nefrectomia radical com imunoterapia ou terapia com alvos moleculares surge como opção (BIGOT et al. 2013).

Os fatores prognósticos relacionados ao CCR podem ser divididos em anatômicos, histológicos, clínicos e moleculares. Os fatores anatômicos são representados pela classificação TNM da *American Joint Committee on Cancer-AJCC*, atualizado em 2009, onde são avaliados tamanho, infiltração venosa, invasão de cápsula renal, envolvimento da glândula adrenal e metástases linfonodais ou a distância. Outras classificações anatômicas, como o sistema *Preoperative Aspects and Dimesions Used for na Anatomical-PADUA*, a pontuação nefrométrica R.E.N.A.L. e o C-index, foram propostas para padronizar a descrição das neoplasias renais (FICARRA et al. 2009; KUTIKOV et al. 2009; SIMMONS et al. 2010). Os fatores histológicos incluem o grau de anaplasia celular (FUHRMAN et al. 1982), o subtipo do CCR, presença de características sarcomatóides, invasão microvascular, necrose tumoral e invasão do sistema coletor. Mais recentemente, segundo diretrizes do Consenso da *International Society of Uro pathology-ISUP*, em 2012, orienta-se pela descrição de componentes rabdoídes, da extensão de necrose intratumoral e se propôs um novo sistema de graduação (RIOUX-LECLERCQ et al. 2014). Os fatores clínicos baseiam-se em *performance status*, sinais, sintomas, e dados hematimétricos. Diversos marcadores moleculares vêm sendo investigados, como a anidrase carbônica tipo nove, o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), o fator indutor de hipóxia (HIF), as proteínas Ki67 e *Phosphatase and Tensin Homolog-PTEN*, a molécula de adesão celular E-caderina, a proteína C reativa e a glicoproteína de superfície celular CD44 (LI et al. 2008; SABATINO et al. 2009).

Nosso Grupo, além de sugerir o uso da Classificação da *American Society of Anesthesiology* (DE CÁSSIO ZEQUI et al. 2010, FERREIRA et al. 2013), vem investigando o valor prognóstico de diversos marcadores imunohistoquímicos, como fatores prognósticos em Carcinoma de Células Renais, como Sintase do Oxido Nítrico (NO₂) (ZEQUI 2008), do CD 133, CD 44 (DA COSTA 2011; DA COSTA et al. 2012), do Prolibormo (DA COSTA et al. 2014), da Caspase 7 (VILELLA-ARIAS et al. 2013), do VHL (ALVES et al. 2014), e da Eritropoetina (FERREIRA 2014) em Carcinoma de Células Renais. Até o momento, nenhum desses marcadores é capaz de predizer com acurácia o comportamento do carcinoma de células renais.

1.2 SÍNDOMES HEREDITÁRIAS E O CÂNCER RENAL

A maioria dos carcinomas de células renais é classificado como esporádico. As síndromes hereditárias que levam ao maior risco para o desenvolvimento do câncer renal são responsáveis por 3% a 5% dos casos, no entanto estima-se que este número seja subestimado (PAVLOVICH et al. 2004). Até o momento, foram descritas dez síndromes e doze genes associados ao risco de herança do câncer renal (Quadro 1). Os pacientes normalmente desenvolvem tumores em idade mais precoce, podendo ser multifocais ou bilaterais (HAAS e NATHANSON 2014). Dentre estas, a mais reconhecida é a síndrome de von Hippel Lindau, na qual pode haver associação de CCR, angiomas de retina, cerebelo, feocromocitoma adrenal, cistoadenomas de epidídimo e de ligamento redondo e que apresenta mortalidade superior a 50% tanto pelo CCR, quanto pelos tumores do sistema nervoso central (FRANTZEN et al. 1993). A ocorrência do CCR pode ser o evento principal, como no Carcinoma Renal

Papilífero Hereditário (HPRCC), ou uma manifestação menos frequente da síndrome, como no Complexo Esclerose Tuberosa (TSC) (VERINE et al. 2010).

O conhecimento biomolecular obtido através do estudo de pacientes destas afecções hereditárias de carcinoma renal, permitiu um grande progresso no conhecimento da fisiopatologia e dos mecanismos moleculares envolvidos nestas síndromes, como o papel da via que resulta na ativação do HIF-1, decorrentes de hipóxia, ou mutações e/ou deficiências do gene de VHL, na Síndrome de von Hippel Lindau (MARANCHIE et al. 2002). Esses conhecimentos foram extrapolados para as neoplasias renais esporádicas de fenótipos correspondentes aos das respectivas síndromes hereditárias. Disso decorreu o desenvolvimento de novas drogas que vem aumentando a sobrevida de pacientes com doença metastática, as chamadas terapias de alvo moleculares. São utilizados aqueles que atuam em receptores do VEGF como o Sunitinibe, Sorafenibe, Axitibibe e Pazopanibe; anticorpos monoclonais que bloqueiam a ação do VEGF como o Bevacizumabe (PAL et al. 2013); além dos inibidores da proteína mTOR como o Everolimus e Temsirolimus (HUDES et al. 2007).

Quadro 1 - Síndromes hereditárias relacionadas ao risco aumentado de Câncer Renal

Síndrome	Alterações Citogenéticas	Proteína	Câncer Renal
Doença Mutante BAP1	<i>BAP1</i>	Proteína BRCA1 associated protein 1	Células Claras
Sd. Birt-Hogg Dubé	<i>FLCN</i>	Foliculina	Oncocitoma/Cromóforo
Câncer renal de células claras com translocação do cromossomo 3	<i>Translocação do cromossomo 3</i>		Células Claras
Leiomiomatose Hereditária	<i>FH</i>	Fumarato Hidratase	Papilífero tipo II
Câncer Renal Papilífero Hereditário	<i>MET</i>	c-MET	Papilífero tipo I
Sd. Hamartomatosa PTEN	<i>PTEN</i>	PTEN	Células Claras
Paraganglioma Feocromocitoma Hereditário	<i>SDHB SDHC SDHD</i>	Succinato desidrogenase subunidades B, C, D	Células Claras, Cromóforo Oncocitoma
Complexo Esclerose Tuberosa	<i>TSC1 TSC2</i>	hamartina/tuberina	Angiomiolipoma
Doença de Von Hippel Lindau	<i>VHL</i>	pVHL	Células Claras

Fonte: Adaptado de HAAS e NATHANSON (2014)

1.3 SÍNDROME LI-FRAUMENI

A Síndrome Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome hereditária clínica e geneticamente heterogênea. Foi descrita primeiramente em 1969 pelo Dr. Frederick Li e Dr. Joseph F. Fraumeni Jr. em estudo de famílias que apresentavam uma variedade de tumores com início precoce, incluindo sarcomas na infância e câncer de mama em adultos jovens (LI e FRAUMENI et al. 1969). É caracterizada por uma herança autossômica dominante.

A LFS predispõe a um amplo espectro tumoral. Os tipos mais comuns são câncer de mama em mulheres na pré menopausa, sarcomas de tecidos moles e osteossarcomas, tumores cerebrais e carcinoma adrenocortical. Classicamente é

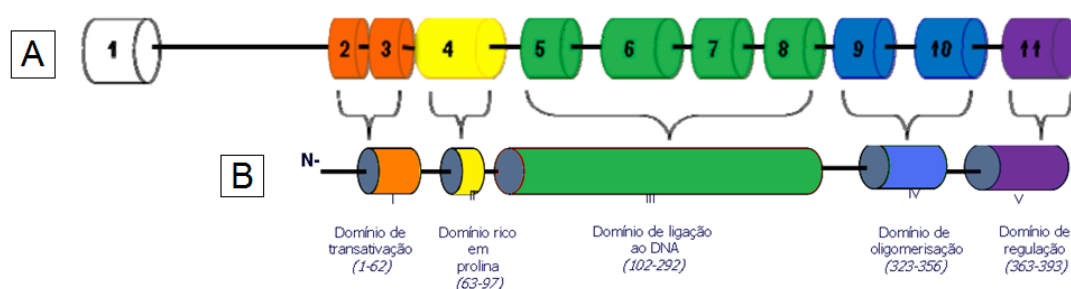
definida como a presença de sarcoma antes dos 45 anos e um parente de primeiro grau com qualquer tipo de tumor antes dos 45 anos, além de um segundo parente de primeiro ou segundo grau com a mesma linhagem tumoral antes dos 45 anos, ou sarcoma em qualquer idade (LI e FRAUMANI 1988). Pacientes com LFS apresentam 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, comparados a 1% na população geral.

Estima-se que 90% dos portadores desenvolvam câncer até 60 anos de idade (BIRCH et al. 2001). Já foram identificados um espectro maior de tumores relacionados à LFS, como câncer de pulmão, colorretal, próstata, ovário, pâncreas, além de linfomas, melanoma e carcinoma do plexo coróide (GONZALEZ et al. 2009). A variante Li-Fraumeni like (LFL) foi proposta para definir casos de pacientes que apresentavam tumores típicos em idade precoce, mas que não possuíam a expressão fenotípica clássica da síndrome (BIRCH et al. 1994).

No início dos anos 90, mutações germinativas no gene supressor tumoral *TP53* foram descritas como a principal causa da LFS (MALKIN et al. 1990). Até o ano de 2012, 532 famílias haviam sido identificadas com mutações germinativas do *TP53*. Aproximadamente 70% e 40% das famílias com LFS e LFL, respectivamente, apresentam mutações (BIRCH et al. 1994; VARLEY 2003). A penetrância do câncer em indivíduos portadores de mutações no gene *TP53* é menor que 20% em crianças, mas pode atingir 100% em pacientes na oitava década de vida (WU et al. 2010).

1.4 GENE *TP53* E MUTAÇÃO GERMINATIVA p.R337H

O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfo proteína nuclear de 53 kD que contém 393 aminoácidos (Figura 1). Esta proteína é capaz de se ligar a sequências específicas do DNA sendo um fator de transcrição que controla de forma positiva ou negativa a expressão de diversos genes envolvidos em várias vias celulares. A proteína p53 possui papel fundamental em diversos processos celulares, incluindo a inibição da proliferação celular, apoptose e reparo de DNA. Desta forma, o *TP53* foi classificado como um gene supressor tumoral (LEVINE 1997; WANG e HARRIS 1997). Ao contrário de outros genes supressores de tumor que são inativados por perda alélica, o gene *TP53* distingue-se pela alta frequência de mutações (HERNANDEZ-BOUSSARD et al. 1999).



Fonte: Adaptado do International Agency for Research on Cancer IARC (2016)

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

Estudos demonstraram a associação de mutações do gene *TP53* com o CCR tipo cromóforo (CONTRACTOR et al. 1997). Na década de 90, mutações germinativas no gene *TP53* foram associadas a LFS. O mesmo foi estudado devido a indicação prévia da inativação do *TP53* nos tumores esporádicos relacionados à síndrome (MALKIN et al. 1990).

Estudo brasileiro de 2006 avaliou o padrão da prevalência de mutações germinativas no gene *TP53* e o perfil tumoral de famílias que preenchiam os critérios da LFS/LFL. Foi identificada a alta prevalência (0,3%) de mutação germinativa específica (no Éxon 10) que codifica o domínio de oligomerização com a troca de uma arginina por uma histidina (R337H - CGC para CAC no códon 337). No mesmo estudo, verificou-se a ocorrência de tumores renais e tireoidianos que haviam sido apenas relatados na descrição inicial da LFS (LI e FRAUMENI 1969; ACHATZ et al. 2007). Devido a alta prevalência, a mutação p.R337H foi pesquisada juntamente com as mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com câncer de mama e ovário hereditário. Foi encontrada uma prevalência de 2,5% (3:120), sugerindo a pesquisa da variante R337H do gene *TP53* em pacientes com critério para a síndrome do câncer de mama e ovário hereditário, negativas para *BRCA1/2* (SILVA et al. 2014).

Ainda não existem estudos na literatura correlacionando a mutação p.R337H a tumores renais, mais especificamente ao subtipo células claras do carcinoma de células renais.

2 JUSTIFICATIVAS

A identificação de genes associados ao câncer renal hereditário vem possibilitando um melhor conhecimento da patogênese das neoplasias. As mutações em cada gene tendem a ser associadas a específicos subtipos de câncer renal. A identificação de mutações genéticas específicas e a associação com os subtipos histológicos do CCR melhoram o conhecimento sobre o câncer renal e sobre as síndromes hereditárias. A prevalência aumentada da mutação p.R337H no gene *TP53* na população brasileira motivou a realização deste estudo. Neste cenário, a pesquisa da mutação em pacientes diagnosticados com carcinoma de células renais do tipo células claras permite a definição da ocorrência ou não do câncer renal como parte do espectro tumoral de pacientes portadores do p.R337H. A realização deste estudo propiciará correlacionar as duas entidades (LFS e CCR), promovendo a realização de estudos futuros para melhor compreensão das síndromes hereditárias relacionadas ao câncer renal na população brasileira.

3 OBJETIVO

Investigara presença da mutação p.R337H no gene *TP53* em pacientes diagnosticados com carcinoma de células renais tipo células claras.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados para esse estudo os pacientes admitidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Centro de Tratamento e Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center, no período de 2007 a 2014, submetidos a nefrectomia radical ou parcial, com diagnóstico anátomo-patológico de Carcinoma de Células Renais do tipo células claras. Foram excluídos os pacientes diagnosticados com outros subtipos de carcinoma de células renais ou que não possuíam material disponível para a pesquisa.

4.2 TRIAGEM DA MUTAÇÃO p.R337H EM PACIENTES COM CARCINOMA RENAL TIPO CÉLULAS CLARAS POR MEIO PCR-RFLP

As amostras de DNA dos pacientes selecionados obtidas do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center foram previamente quantificadas e tiveram a integridade observada. Foram utilizadas amostras de DNA com qualidades definidas como excelente, ótima e boa, apenas para documentação. Todas as amostras de DNA foram diluídas a concentração de uso de 30 ng/ul. O DNA genômico foi utilizado em reações de *PCR* para amplificação de parte do Éxon 10 do gene *TP53*. Foram desenhados os oligonucleotídeos: 10-TP53-Fc (10 ao 10):

GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG e 10-TP53-Rb (10 ao 10): CGTCCCTGGGTTTGGATGTT, seguindo-se os protocolos descritos por PALMERO et al. (2008). As condições da *PCR* foram: 2,0mM MgCl₂, 0,2mM dNTP, 0,2μM cada oligonucleotídeo, 0,5U Platinum® *Taq* DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen), 2,0μL tampão *Taq* High Fidelity 10x (concentração final de 1x) e água autoclavada para completar 20μL de reação. A amplificação foi iniciada por desnaturação inicial 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94°C durante 30 segundos, pareamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 45 segundos e extensão final a 68°C por 5 minutos.

O *amplicon* gerado na *PCR* de 468pb foi submetido à digestão com a enzima de restrição *HhaI*, que reconhece a sequência de DNA alterada pela mutação no códon 337. A separação dos fragmentos de restrição gerados foi realizada por meio eletroforese em gel de agarose à 4%, seguindo-se os protocolos descritos por ACHATZ et al. (2007). As amostras com resultados duvidosos ou indefinidos eram submetidas à repetição do método.

4.3 CONFIRMAÇÃO DA MUTAÇÃO P.R337H EM PACIENTES COM CARCINOMA RENAL TIPO CÉLULAS CLARAS POR MEIO DE SEQUENCIAMENTO SANGER

Para confirmar a presença de mutações no códon 337 do gene *TP53*, as amostras com padrão positivo para mutação, previamente triadas por meio da *PCR-RFLP* foram sequenciadas utilizando a metodologia tradicional de SANGER e COULSON (1975).

Inicialmente, para a remoção dos iniciadores e dNTPs remanescentes da PCR, 5 μ L da solução contendo o fragmento dos genes de interesse amplificado foram purificados com 2 μ L da mistura de enzimas *Éxonuclease I (Exo I)* e *Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) (USB)* e incubação a 37°C por 30 minutos seguido de inativação por aquecimento a 80°C por 15 minutos. Após a purificação seguiu-se a reação de sequenciamento dos fragmentos dos genes de interesse bidireccionalmente (*fowardereverse*), em reações independentes. Utilizou-se 3,5 μ L do *amplicon* da PCR purificado, em reação contendo: 0,3 μ Moligonucleotídeo iniciador *fowardoureverse*, 1 μ L *Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems)*, 1,5 μ L Tampão *Save Money 5X (Applied Biosystems)* e 3,7 μ L água livre de nuclease (*Sigma*). As ciclagens foram: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 95°C por 18 segundos, 55°C por 18 segundos e 60°C por 4 minutos. Utilizando-se o termociclador *96-Well GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)*. Após amplificação seguiram-se as etapas de precipitação e lavagens por meio decentrifugação, adicionando-se 1 μ L 125mM pH 8,0 EDTA e 1 μ L 3M pH 8,0 acetato de sódio e adição de 25 μ L etanol absoluto (*Merck*), e incubação por 15 minutos no escuro e em temperatura ambiente. Seguiu-se com a centrifugação a 4000rpm por 30 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado por inversão; centrifugação invertida por 10 segundos a 650rpm, aceleração e desaceleração de 2. A etapa de precipitação foi finalizada a partir da adição de 35 μ L de etanol 70% gelado (*Merck*) seguido por centrifugação a 4000rpm por 20 minutos a 4°C. Os precipitados do sequenciamento foram secos a 95°C por 20 minutos e ressuspendidos em 13 μ L de *formamida Hi-Di (Applied Biosystems)* seguido por desnaturação a 95°C por 3 minutos. A solução obtida foi utilizada para eletroforese no analisador

automático de DNA (*ABI Prism modelo 3130XL (Applied Biosystems)*).

As sequências obtidas foram analisadas no *software*, CLC Main Workbench 5.0.2. (CLC bio). O programa alinha as sequências obtidas com as sequências referências de cada fragmento gênico de maneira a permitir uma análise comparativa que aponta conflitos entre as leituras. Estas sequências referências foram obtidas da base de dados NCBI Reference Sequence (RefSeq), mantido pelo NCBI/NIH (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/>).

5 RISCOS E ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo realizou uma análise molecular de amostras anonimizadas e uma avaliação retrospectiva dos prontuários para inclusão de pacientes. Não houve a participação direta de pacientes e não interferiu de modo algum nas condutas médicas já previamente indicadas para cada paciente. A utilização de material do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center seguiu as normas já estabelecidas pelo próprio setor. Esse projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa-CEP da Fundação Antônio Prudente-A.C.Camargo Cancer Center/SP sob o número 1978/14 o qual foi aprovado em reunião realizada em 11/11/2014. (Anexo 1)

6 RESULTADOS

Após seleção dos pacientes através do sistema de prontuário eletrônico do hospital, foram obtidos 220 registros para solicitação de material ao Biobanco. Não foi possível a extração de DNA de 5 casos por não haver material suficiente. Em 20 casos foram aliquoteados apenas uma das amostras por duplicidade de registro.

Dos 220 casos iniciais, as amostra disponíveis totalizaram 205 e foram provenientes dos pacientes que possuíam material de sangue periférico armazenados e disponíveis no Biobanco do hospital, as quais foram incluídas de forma anônima.

Após a triagem por *PCR-RFLP* das 205 amostras, algumas amostras foram submetidas a repetição devido aos resultados duvidosos e/ou inconclusivos (Figura 2), apenas uma amostra identificada/codificada como SG 22134 apresentou perfil de digestão compatível (Figura 3A) com a mutação p.R337H o que foi confirmado por sequenciamento (Figura 3B).

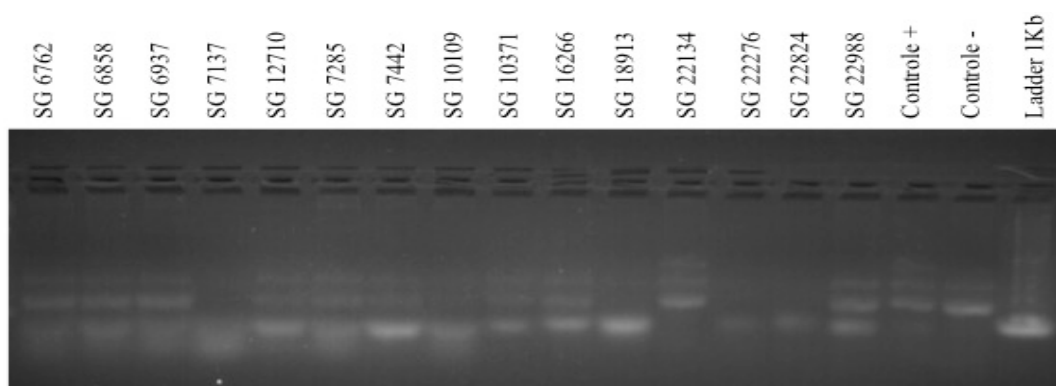


Figura 2- *PCR-RFLP* para triagem da mutação p.R337H em pacientes com câncer renal de células claras.

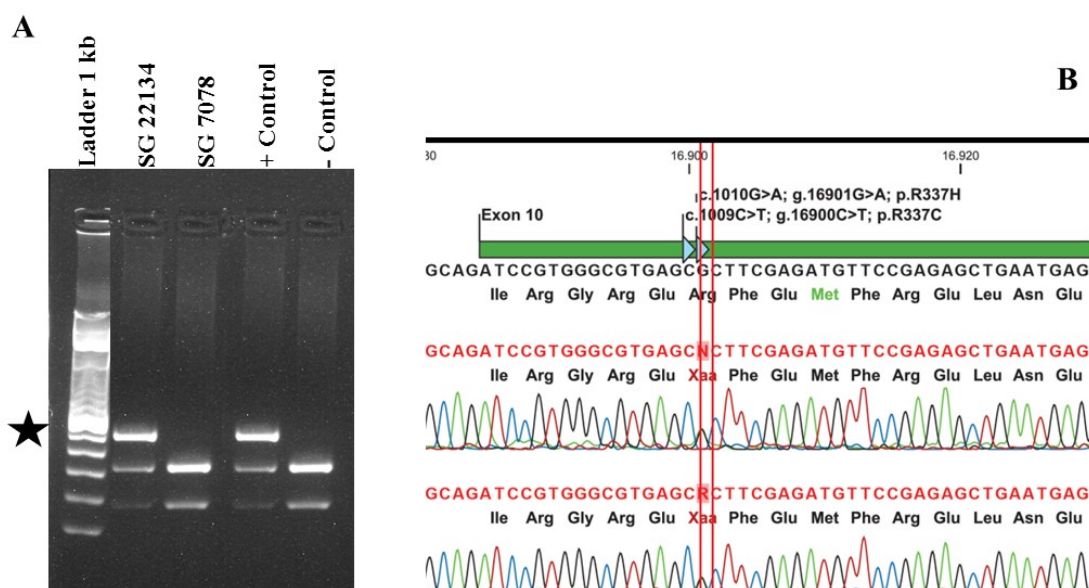


Figura 3 - Detecção da mutação p.R337H no gene TP53, por meio de *PCR-RFLP* e sequenciamento em paciente com carcinoma renal de células claras atendido no A.C.Camargo Cancer Center. A amostra de DNA obtida a partir do Biobanco do A.C.Camargo Cancer Center foi submetida à amplificação por *PCR* do Éxon 10 do gene *TP53* (com oligonucleotídeos flanqueando a região da mutação p.R337H). O *amplicon* de 468 pares de base, foi então submetido à digestão com a enzima *HhaI*. (A), Padrão de restrição (*RFLP*). Estrela preta indica o fragmento clivado (correspondente ao padrão da mutação p.R337H). 1 Kb Ladder, marcador de peso molecular; SG 22134; SG 7078; + Controle e - Controle de quatro indivíduos com códon mutante e selvagem, respectivamente. (B) Sequenciamento evidenciando a presença da mutação p.R337H em heterozigose de único indivíduo selecionado para o estudo paciente com câncer renal do tipo células claras. O sequenciamento (realizado a partir de produto de *PCR* em análise independente) da amostra codificada como SG 22134 evidencia a substituição da segunda base do códon 337 G para A.

7 DISCUSSÃO

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

Assim, esta síndrome mostra-se cada vez mais frequente no Brasil, podendo existir um número muito maior de portadores, que não possuem conhecimento do alto risco para desenvolver tumores, mesmo pertencendo a famílias com indivíduos aparentemente saudáveis. Indivíduos nesta situação podem se beneficiar com o diagnóstico da síndrome uma vez que o rastreamento implantado inicialmente tem

implicação direta no prognóstico de pacientes LFS/LFL.

O espectro tumoral típico da síndrome de Li-Fraumeni inclui o câncer de mama, sarcomas de partes moles, tumores cerebrais, sarcomas ósseos, leucemia e carcinoma adrenocortical (LI e FRAUMENI1988), totalizando aproximadamente três quartos (74%) de todos os tumores associados a mutações germinativas no gene *TP53* (PETITJEAN et al. 2007).

Segundo dados da ACS, em 2017, serão 63.990 novos casos de câncer renal nos EUA, sendo o décimo tipo de câncer mais comum entre homens e mulheres. Aproximadamente 90% desses novos casos serão diagnosticados com carcinoma de células renais e 80% desses serão do subtipo células claras (ACS 2017; MOCH et al. 2000; LEIBOVICH et al. 2010). Serão classificados como tumores relacionados às Síndromes Hereditárias apenas 3 a 5% dos casos. Esses valores são subestimados (HAAS e NATHANSON 2014), justificando a necessidade da pesquisa de alterações genéticas relacionadas a esse tipo de câncer.

Neste estudo verificou-se a ocorrência da mutação germinativa p.R337H em pacientes diagnosticados com câncer renal de células claras, tipo de tumor que já havia sido descrito como parte do espectro LFS/LFL, porém não compondo os tumores clássicos da síndrome (ACHATZ et al. 2007). A ocorrência de um espectro tumoral mais amplo foi verificada, em vários relatos sobre portadores de mutação germinativa no gene *TP53*. Foram descritos em portadores o melanoma, tumores de células germinativas, carcinoma gástrico e de pâncreas, câncer de pulmão e câncer colorretal (HARTLEY et al. 1987, 1989; VARLEY et al. 1995, 1997; RUIJS et al. 2010).

O trabalho aqui apresentado é o primeiro a descrever a prevalência da

mutação germinativa p.R337H no gene TP53 em pacientes diagnosticados com câncer renal de células claras na população brasileira, atendidos no A.C.Camargo Cancer Center. Houve importante coparticipação entre os serviços dentro do hospital, entre eles, o Núcleo de Urologia do Departamento de Cirurgia Pélvica, o Departamento de Oncogenética, o Biobanco, além do Centro Internacional de Pesquisa do A.C.Camargo Cancer Center. Por ser um centro de referência do tratamento de câncer e pesquisa, foi possível alcançar um número grande de pacientes. A casuística atingida nesse trabalho foi de 205 indivíduos, representando uma *coorte* considerável, para o tipo celular do câncer acometido. Sabe-se que em portadores da mutação p.R337H, a penetrância estimada, para o tipo tumoral mais comum do espectro da síndrome Li-Fraumeni (tumor adrenocortical) é de 10% (FIGUEIREDO et al. 2006), porém como observado nesse estudo, outros tipos tumorais podem também estar associados à síndrome, para tal a investigação da presença da mutação p.R337H e sua penetrância devem ser investigadas e reavaliadas em outros tipos de câncer.

Embora a maioria dos portadores dessa mutação no Brasil seja de pacientes da região Sul, e Sudeste, o A.C.Camargo Cancer Center é um centro de referência localizado no sudeste brasileiro, que recebe pacientes de todas as partes do país, provavelmente recebendo pacientes da região sul. Além disso, é um dos centros com boa estrutura em oncogenética e no estudo de pacientes com síndromes de tumores familiares.

Pela baixa prevalência dessa mutação neste grupo, acredita-se que essa mutação não esteja presente de modo significativo em pacientes com CCR tipo células claras. Essa informação, até então inédita, é relevante para o planejamento de

pesquisadores interessados no tema.

Embora fosse interessante investigar se o paciente com mutação identificada em nosso grupo apresenta ou apresentou outras neoplasias comum as síndromes LF/LFL, pelo fato de ser um estudo anonimizado, não poderíamos acessar seus dados, salvo autorização de nosso Comitê de Ética em Pesquisa. Este tema deveria ser debatido, pois caso o paciente apresente a síndrome e não saiba, pode merecer um seguimento dirigido as outras afecções das síndromes de LF /LFL e não apenas para seu carcinoma renal.

Como houve apenas este caso em nossa série, e no Brasil já se encontrou CCR em poucos pacientes com as síndrome LF/LFL, embora o CCR pareça não fazer parte da síndrome, talvez o CCR possa ocorrer muito raramente em casos de LFL, sem que detectemos mutação, o que demanda mais investigação.

Nosso estudo tentou correlacionar um subtipo mais frequente de câncer renal e uma mutação com prevalência aumentada na população brasileira. A frequência da mutação p.R337H chega a 0,3% em população controle do sul do país (PALMERO et al. 2008). O achado de uma mutação em 205 amostras não permite afirmar qualquer relação da mutação germinativa com o carcinoma renal subtipo células claras. Estudos futuros incluindo outros subtipos tumorais, estudos prospectivos relacionando dados clínicos de pacientes e outras colaborações com diversas instituições são necessários para aprofundar o conhecimento sobre a relação entre o câncer renal e a mutação p.R337H.

8 CONCLUSÃO

Nesta série de pacientes com CCR tipo células claras atendidos num centro terciário brasileiro, a ocorrência de mutação germinativa p.R337H, do gene TP 53, foi verificada em apenas 0,5% dos casos. Desse modo, não é possível identificar qualquer associação entre essa mutação a o carcinoma de células renais tipo células claras, sugerindo que este tipo de câncer não faz parte do espectro tumoral da síndrome estudada.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Alves MR, Carneiro FC, Lavorato-Rocha AM, et al. Mutational status of VHL gene and its clinical importance in renal clear cell carcinoma. **Virchows Arch** 2014; 465:321-30.

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts & figures 2017**. <URL:<https://www.cancer.org/content/dam/cancer-org/research/cancer-facts-and-statistics/annual-cancer-facts-and-figures/2017/cancer-facts-and-figures-2017.pdf>> [2016 dez 12]

Barbosa RH, Aguiar FC, Silva MF, et al. Screening of RB1 alterations in Brazilian patients with retinoblastoma and relatives with retinoma: phenotypic and genotypic associations. **Invest Ophthalmol Vis Sci** 2013; 54:3184-94.

Becker F, Siemer S, Kamradt J, Zwergel U, Stöckle M. Important aspects of organ preserving surgery for renal tumors: indications, new standards, and oncological outcomes. **Dtsch Arztebl Int** 2009; 106:117-22.

Bigot P, Lebdaï S, Ravaud A, et al. The role of surgery for metastatic renal cell carcinoma in the era of targeted therapies. **World J Urol** 2013; 31:1383-8.

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.

Bosniak MA. Observation of small incidentally detected renal masses. **Semin Urol Oncol** 1995; 13:267-72.

Chow WH, Dong LM, Devesa SS. Epidemiology and risk factors for kidney cancer. **Nat Rev Urol** 2010; 7:245-57.

Contractor H, Zariwala M, Bugert P, Zeisler J, Kovacs G. Mutation of the p53 tumour suppressor gene occurs preferentially in the chromophobe type of renal cell tumour. **J Pathol** 1997; 181:136-9.

da Costa WH. **Estudo do valor prognóstico e da expressão imuno-histoquímicas células-tronco tumorais, através do CD133 e CD44 em carcinoma de células renais**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

de Costa WH, Rocha RM, Cunha IW, et al. CD133 immunohistochemical expression predicts progression and cancer-related death in renal cell carcinoma. **World J Urol** 2012; 30:553-8.

da Costa WH, Rezende M, Carneiro FC, et al. Polybromo-1 (PBRM1), a SWI/SNF complex subunit is a prognostic marker in clear cell renal cell carcinoma. **BJU Int** 2014; 113:E157-63.

Dantas ELR, Sá FHL, de Carvalho SMF, Arruda AP, Ribeiro EM, Ribeiro EM. Genética do câncer hereditário. **Rev Bras Cancerol** 2009; 55:263-9.

de Oliveira Reis AH, de Carvalho IN, de Sousa Damasceno PB, et al. Influence of MDM2 and MDM4 on development and survival in hereditary retinoblastoma. **Pediatr Blood Cancer** 2012; 59:39-43.

de Cássio Zequi S, de Campos EC, Guimarães GC, et al. The use of the American Society of Anesthesiology Classification as a prognostic factor in patients with renal cell carcinoma. **Urol Int** 2010; 84:67-72.

Dominguez-Valentin M, Nilbert M, Wernhoff P, et al. Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families. **Hered Cancer Clin Pract** 2013; 11:18.

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA. **Pathology & genetics tumours of the urinary system and male genital organs**. Lyon: IARC Press; 2004. p.7. (IARC WHO Classification of Tumours, nº 6). p.7.

El Dib R, Touma NJ, Kapoor A. Cryoablation vs radiofrequency ablation for the treatment of renal cell carcinoma: a meta-analysis of case series studies. **BJU Int** 2012; 110:510-6.

Ferlay J, Steliarova-Foucher E, Lortet-Tieulent J, et al. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. **Eur J Cancer** 2013; 49:1374-403.

Ferreira DB, Zequi SC, Costa WD, et al. Use of the American Society of Anesthesiologists classification as an additional planning tool for renal cell carcinoma assessment. **J Cancer Ther** 2013; 4:7-14.

Ferreira DB. **Análise da expressão imuno-histoquímica e valor prognóstico da eritropoetina (EPO) e do seu receptor (EPO-R) em carcinoma de células renais**. São Paulo; 2014. [Tese de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Ficarra V, Novara G, Secco S, et al. Preoperative aspects and dimensions used for an anatomical (PADUA) classification of renal tumours in patients who are candidates for nephron-sparing surgery. **Eur Urol** 2009; 56:786-93. P

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

Frantzen C, Klasson TD, Links TP, Giles RH. Von Hippel-Lindau Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al. editors. **Gene Reviews**[®] [Internet]. Initial Posting: May 17, 2000; Last Update: August 6, 2015. Available from: <URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1463>> [2016 out 15]

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1982; 6:655-63.

Gad S, Lefèvre SH, Khoo SK, et al. Mutations in BHD and TP53 genes, but not in HNF1 beta gene, in a large series of sporadic chromophobe renal cell carcinoma. **Br J Cancer** 2007; 96:336-40.

Garnis C, Buys TP, Lam WL. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol Cancer** 2004; 3:9.

Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in pR337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** 2010; 31:143-50.

Gomy I, Molfetta GA, de Andrade Barreto E, et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian families with von Hippel-Lindau disease: a need for delineating genotype-phenotype correlation. **Fam Cancer** 2010; 9:635-42.

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

Haas NB, Nathanson KL. Hereditary kidney cancer syndromes. **Adv Chronic Kidney Dis** 2014; 21:81-90.

Hartley AL, Birch JM, Marsden HB, Harris M. Malignant melanoma in families of children with osteosarcoma, chondrosarcoma, and adrenal cortical carcinoma. **J Med Genet** 1987; 24:664-8.

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

Hernandez-Boussard T, Rodriguez-Tome P, Montesano R, Hainaut P. IARC p53 mutation database: a relational database to compile and analyze p53 mutations in human tumors and cell lines International Agency for Research on Cancer. **Hum Mutat** 1999; 14:1-8.

Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. **N Engl J Med** 2007; 356:2271-81.

[IARC] International Agency for Research on Cancer. TP53 **Genetic variations in human cancers**. IARC TP53 Database 2016. Available from: <URL:http://p53.iarc.fr/Download/SlideShow2016_online.pdf> [2016 dez 18]

Kutikov A, Uzzo RG. The RENAL nephrometry score: a comprehensive standardized system for quantitating renal tumor size, location and depth. **J Urol** 2009; 182:844-53.

Leibovich BC, Lohse CM, Crispen PL, et al. Histological subtype is an independent predictor of outcome for patients with renal cell carcinoma. **J Urol** 2010; 183:1309-15.

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

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

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

Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J. Serum carbonic anhydrase 9 level is associated with postoperative recurrence of conventional renal cell cancer. **J Urol** 2008; 180:510-3; discussion 513-4.

Lipworth L, Tarone RE, McLaughlin JK. The epidemiology of renal cell carcinoma. **J Urol** 2006; 176:2353-8.

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.

Maranchie JK, Vasselli JR, Riss J, et al. The contribution of VHL substrate binding and HIF1-alpha to the phenotype of VHL loss in renal cell carcinoma. **Cancer Cell** 2002; 1:247-55.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Moch H, Gasser T, Amin MB, et al. Prognostic utility of the recently recommended histologic classification and revised TNM staging system of renal cell carcinoma: a Swiss experience with 588 tumors. **Cancer** 2000; 89:604-14.

Ohno Y, Nakashima J, Ohori M, et al. Impact of tumor size on renal function and prediction of renal insufficiency after radical nephrectomy in patients with renal cell carcinoma. **J Urol** 2011; 186:1242-6.

Pal SK, Nelson RA, Vogelzang N. Disease-specific survival in de novo metastatic renal cell carcinoma in the cytokine and targeted therapy era. **PLoS One** 2013; 8:e63341.

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

Pavlovich CP, Schmidt LS. Searching for the hereditary causes of renal-cell carcinoma. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:381-93.

Petitjean A, Achatz MI, Borresen-Dale AL, Hainaut P, Olivier M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene** 2007; 26:2157-65.

Rioux-Leclercq N, Ferran A, Mahul A, et al. [Renal tumors: The International Society of Urologic Pathology (ISUP) 2012 consensus conference recommendations]. **Ann Pathol** 2014; 34:448-61.

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

Sabatino M, Kim-Schulze S, Panelli MC, et al. Serum vascular endothelial growth factor and fibronectin predict clinical response to high-dose interleukin-2 therapy. **J Clin Oncol** 2009; 27:2645-52.

Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **J Mol Biol** 1975; 94:441-8.

Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. **CA Cancer J Clin** 2016; 66:7-30.

Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Med Genet** 2014; 15:55.

Simmons MN, Ching CB, Samplaski MK, Park CH, Gill IS. Kidney tumor location measurement using the C index method. **J Urol** 2010; 183:1708-13.

Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. An extended Li-Fraumeni kindred with gastric carcinoma and a codon 175 mutation in TP53. **J Med Genet** 1995; 32:942-5.

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** 1997; 57:3245-52.

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

Verine J, Pluvinage A, Bousquet G, et al. Hereditary renal cancer syndromes: an update of a systematic review. **Eur Urol** 2010; 58:701-10.

Vilella-Arias SA, Rocha RM, da Costa WH, et al. Loss of caspase 7 expression is associated with poor prognosis in renal cell carcinoma clear cell subtype. **Urology** 2013; 82:974.e1-7.

Wang XW, Harris CC. p53 tumor-suppressor gene: clues to molecular carcinogenesis. **J Cell Physiol** 1997; 173:247-55.

Wu CC, Strong LC, Shete S. Effects of measured susceptibility genes on cancer risk in family studies. **Hum Genet** 2010; 127:349-57.

Wunsch-Filho V. Insights on diagnosis, prognosis and screening of renal cell carcinoma. **São Paulo Med J** 2002; 120:163-4.

Zequi SC. Estudo da expressão imuno-histoquímica e do valor prognóstico de sintases do óxido nítrico, metaloproteases da matriz extracelular, VEGF, caderina-E, densidade de microvasos e de vasos linfáticos em pacientes portadores de carcinoma de células renais. São Paulo; 2008. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 18 de novembro de 2014.

**Ao
Dr. Stênio de Cássio Zequi.**

Aluno: Mauricio Akira Gonçalves Assakawa (Mestrado).

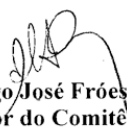
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1978/14
“Análise de mutação germinativa p.R337H no gene TP53 em portadores de carcinoma de células renais tipo células claras”**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 11/11/2014, **aprovaram** a realização do projeto (Versão 1, datado de 06 de outubro de 2014) e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre o Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Oncogenética;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia Pélvica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa (CIPE);
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Cronograma do Estudo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

Atenciosamente,


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

1/1