

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**Síndrome de Li-Fraumeni: caracterização clínica e molecular de pacientes
com o fenótipo da síndrome**

Camila Matzenbacher Bittar

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (Genética e Biologia Molecular).

Orientadora: Prof^a Dr^a Patricia Ashton-Prolla

Porto Alegre, agosto de 2019.

Este trabalho foi realizado no Ambulatório de Oncogenética e no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

Dedico essa conquista a todos os pacientes que participaram e confiaram no trabalho do nosso grupo. À Lívia também, que foi fundamental, junto com minha família, para que eu conseguisse completar essa trajetória. Muito obrigada!

Agradecimentos

Primeiramente à Profa. Patricia Ashton-Prolla, por ter sido uma excelente orientadora. Agradeço pelas oportunidades, apoio, ensinamentos, disponibilidade para discutir casos e problemas, pela ajuda constante em todas as etapas da minha formação desde a residência até o momento atual, me estimulando a sempre buscar o melhor.

Colega e amiga Cristina Netto, sempre tão importante nos dias de ambulatório e reuniões pré-clínicas, com suas relevantes contribuições no atendimento aos pacientes tornaram este trabalho possível. E ainda obrigada pelo companheirismo, incentivo e ajuda no dia a dia deixando a rotina mais leve e prazerosa.

Igor Araújo por todo apoio, amizade, ajuda e grandes contribuições, sem as quais eu não teria conseguido chegar até aqui. Tiago Andreis, obrigada pela disponibilidade, amizade e contribuições importantes. Yasminne Rocha, incansável IC que estava sempre pronta para ajudar.

Minhas queridas amigas Ivaine, Pati S, Liliane e Taiane pelo companheirismo e amizade no dia a dia do laboratório e HCPA e também fora dali.

Ao Dr. Gabriel Macedo, pelo auxílio nas análises, contribuições e amizade.

Colegas e ex-colegas do Laboratório de Medicina Genômica, por todos estes anos de convivência. Um agradecimento especial aos colegas, amigos e colaboradores Clevia, Barbara, Cleandra.

Equipes assistentes do Ambulatório de Oncogenética, Zona 11 e CPC, em especial equipes da Oncologia, Oncologia Pediátrica, Mastologia, Ginecologia e aos secretários (com um agradecimento especial ao funcionário Carlos, sempre tão colaborativo). Equipe clínica da Oncogenética (em especial Alessandra Borba, Osvaldo Artigalás e Daniele Konzen) e do SGM (em especial Temis, Carol, Teresa e Julio) por sempre estarem dispostos a ouvir, ajudar, dividir pacientes, dúvidas e amizade.

Elmo (PPGBM) pelo auxílio em questões burocráticas e palavra amiga.

Minhas amigas e amigos especiais de longa data Francieli, Cati, Carina, Fernanda, Camila V, Bruno e Mariane que estão sempre ao meu lado.

Minha filha Lívia, por ser tão querida, companheira e especial. Meus pais, Christina e Antonio e meu irmão Eduardo, por serem meus exemplos e meus maiores incentivadores. Minha vó Ninny que esteve comigo até esse final e me ensinou muito.

Sumário

Lista de abreviaturas.....	6
Resumo	7
Abstract.....	9
Capítulo I – Introdução.....	10
1.1 Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer:	10
1.2 Síndrome de Li-Fraumeni:	11
1.3 O gene <i>TP53</i> e alterações moleculares relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes:	81
1.4 Tipos de variantes patogênicas de <i>TP53</i> e LFS.	83
1.5 Alterações moleculares de <i>TP53</i> e heterogeneidade fenótipo na LFS.	83
1.6 Frequencia populacional de variantes germinativas em <i>TP53</i>	85
1.7 Frequencia de variantes germinativas em <i>TP53</i> em indivíduos com critérios de Chompret para LFS/LFL.	86
1.8 A variante germinativa <i>TP53</i> R337H no Brasil	87
1.9 Estudos de prevalência da variante R337H no Brasil	89
1.10 Painéis multigênicos e a Síndrome de Li-Fraumeni	91
1.11 Recomendações de seguimento e manejo clínico para pacientes com LFS: 93	
Capítulo II – Justificativa.....	96
Capítulo III – Objetivos	97
Capítulo IV – Artigo 1	98
Capítulo V – Artigo 2	98
Capítulo VI – Discussão.....	115
Capítulo VII – Perspectivas	120
Capítulo VIII – Referências Bibliográficas.....	122
Capítulo IX – Produção Científica Adicional no Período:	135
Capítulo X – Anexos.....	138

Lista de abreviaturas

3'UTR	3' Untranslated Region (Região 3' não-traduzida)
5'UTR	5' Untranslated Region (Região 5' não-traduzida)
ACE	Aberrant clonal expansions (expansões clonais aberrantes)
<i>BRCA1</i>	Gene <i>BRCA1</i> (Breast Cancer Type 1 Susceptibility Protein)
<i>BRCA2</i>	Gene <i>BRCA2</i> (Breast Cancer Type 2 Susceptibility Protein)
CAC	Carcinoma Adrenocortical
<i>CHEK2</i>	Gene <i>CHEK2</i> (Checkpoint Kinase 2)
CNV	Copy Number Variation
CPC	Carcinoma de Plexo Coroide
DNA	Deoxyribonucleic acid (Ácido desoxirribonucléico)
DBD	<i>DNA-binding domain</i> (domínios de ligação do DNA)
gnomAD	<i>Genome Aggregation Database</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
LFL	Síndrome Li-Fraumeni-like
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
miRNA	microRNA
MLPA	<i>Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification</i>
MDM2	<i>Mouse Double Minute 2</i>
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i> (Rede Nacional de Câncer)
NGS	<i>Next generation sequencing</i> (Sequenciamento de nova geração)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Men
RMCI	Ressonância Magnética de corpo inteiro
R337H	Variante patogênica no gene <i>TP53</i> c.1010G>A; p.(Arg337His)
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Single Nucleotide Polymorphism (Polimorfismo de nucleotídeo único)
<i>TP53</i>	Gene <i>TP53</i> (Tumor Protein P53)
VP	Variante patogênica
VUS	<i>Variant of uncertain significance</i> (Variante de significado incerto)

Resumo

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma doença autossômica dominante associada a mutações germinativas no gene *TP53* e caracterizada por uma predisposição ao desenvolvimento de um amplo espectro de tumores em idade precoce. Os tumores mais comuns relacionados à LFS são carcinoma adrenocortical (CAC), câncer de mama pré-menopáusico, sarcomas ósseos e de partes moles e tumores cerebrais. Atualmente, o critério de Chompret revisado em 2015 é o critério considerado de maior utilidade clínica para diagnóstico molecular da LFS.

O objetivo principal desta tese foi caracterizar os pacientes com suspeita clínica de LFS no sul do Brasil, região conhecida pela prevalência mais alta de uma variante patogênica (VP) germinativa fundadora do gene *TP53* conhecida como R337H (c.1010G>A; p.(Arg337His). No período de julho de 2015 até janeiro de 2019, foram identificados 211 pacientes não relacionados, que preenchem os critérios revisados de Chompret, foram identificados. Destes, 191, todos com pelo menos um diagnóstico de câncer, foram recrutados para estudo molecular e clínico. A análise molecular incluiu avaliação de toda a sequência codificadora de *TP53* e pesquisa de rearranjos gênicos. Vinte e seis (13,6%) probandos apresentaram VP germinativas de *TP53*, todas alterações pontuais de sequência. A idade média ao diagnóstico do primeiro tumor nesses 26 portadores foi 13,65 anos e 18 (69,23%) são portadores da VP R337H.

Em complementação à análise molecular, foi realizada uma caracterização das variantes de significado incerto (VUS) encontradas nos pacientes testados nesta tese e em análises anteriores, bem como em uma instituição parceira, Hospital do Amor no estado de São Paulo. A análise criteriosa de 12 VUS, e a reclassificação de algumas destas, reforça a necessidade de cautela e frequente revisão das informações acerca de VUS para garantir que a conduta clínica mais adequada para o paciente e seus familiares seja proposta.

Os achados deste estudo demonstram a heterogeneidade clínica da LFS no Sul do Brasil, evidenciam algumas particularidades da variante fundadora R337H na região e apontam para a necessidade de estudos maiores e colaborativos com

outros centros para melhor definir e a prevalência da LFS, o espectro clínico e a penetrância dos diferentes tipos de VP de *TP53* no Brasil.

Abstract

Li-Fraumeni Syndrome (LFS) is an autosomal dominant disease associated with pathogenic germline variants in the *TP53* gene and is characterized by a predisposition to develop a broad spectrum of tumors at an early age. The most common LFS related tumors are adrenocortical carcinoma (ACC), premenopausal breast cancer, bone and soft tissue sarcomas, and brain tumors. Currently, the Chompret criteria, revised in 2015, is considered of greatest clinical utility for molecular diagnosis of LFS.

The main objective of this thesis was to characterize patients with clinical criteria of LFS in southern Brazil, a region known for the highest prevalence of a *TP53* germline pathogenic variant known as R337H (c.1010G> A; p. (Arg337His)). From July 2015 to January 2019, 211 unrelated patients who met the revised Chompret criteria were identified, out of which 191 were recruited for molecular and clinical study, all with at least one cancer diagnosis. The molecular analysis include evaluation of the entire *TP53* coding sequence and screening for gene rearrangements. Twenty-six (13.6%) probands had *TP53* pathogenic germline variants (PV), all point sequence changes. Mean age of the first tumor in these 26 carriers was 13.65 years and 18 of them (69.23%) had the PV R337H.

In addition, characterization of the variants of uncertain significance (VUS) found in the patients tested in this thesis and previous analyzes, was performed, together with a partner institution, Hospital do Amor in the state of São Paulo. The careful analysis of 12 VUS, and the reclassification of some of these, reinforces the need for caution and frequent review of information about VUS to ensure that the most appropriate clinical management for the patient and family members is proposed.

The findings of these study demonstrate the clinical heterogeneity of LFS in southern Brazil, highlights some particularities of the founder PV R337H in the region and point to the need for larger and collaborative studies with other centers to better define the prevalence of the LFS, the clinical spectrum and the penetrance of the different types of pathogenic variants of *TP53* in Brazil.

1.1 Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer:

Os tumores diagnosticados em humanos são, em sua grande maioria, de etiologia multifatorial, resultando de interações complexas entre os genes e o ambiente. O primeiro estudo a reconhecer a possibilidade de uma forma hereditária de câncer é datado de 1866, o qual analisou quatro gerações de uma família com diversos casos de câncer de mama em idade jovem (Hodgson, 2008).

Atualmente, estima-se que pelo menos 5 a 10% dos tumores diagnosticados sejam de etiologia hereditária (de la Chapelle, A; Petomäki, 1998; Ferreira, CG; Rocha, 2010). Nesses casos, VP germinativas em genes de predisposição ao câncer (oncogenes, genes supressores de tumor ou genes dos sistemas de reparo do DNA), que geralmente possuem alta penetrância, são as responsáveis por uma parcela significativa dos casos hereditários. Variantes germinativas situadas nesses grupos de genes conferem risco alto ou moderado para o desenvolvimento de tumores, causando as chamadas síndromes de predisposição ao câncer. A maioria destas síndromes está associada a mutações de perda de função em genes supressores tumorais e apresenta herança autossômica dominante (Tucker & Friedman JM, 2002).

No entanto, em muitos casos não é possível identificar uma alteração patogênica herdada, mesmo em famílias que preenchem critérios clínicos para a síndrome em questão, o que constitui o conceito denominado de *Missing Heritability* (Southey et al., 2013). Acredita-se que a presença combinada de múltiplas variantes em genes de baixa penetrância e exposição a fatores de risco ambientais possam explicar a outra parcela de casos (de 20 a 30%) que associa-se a agregação familiar (Amadou, 2017). Outra possibilidade é a presença de variantes localizadas fora das regiões codificadoras, mas associadas a impacto fenotípico por estarem relacionadas a regiões regulatórias dos genes em questão (p.ex. região promotora ou introns) ou ainda em genes relacionados com a regulação da

expressão de oncogenes e genes supressores de tumor (Macedo et al., 2016, 2018).

Cada síndrome de predisposição ao câncer tem critérios próprios, determinados para uso quando da suspeita clínica e para a subsequente indicação de teste genético específico (Leroy et al., 2017). Portanto, quando encontramos um indivíduo e/ou família que apresenta diagnóstico de tumor em idade jovem, múltiplos tumores primários, presença de multifocalidade ou bilateralidade do tumor, diagnóstico de um tumor raro ou frequentemente relacionado à predisposição hereditária ou ainda história familiar incluindo vários casos de um mesmo tipo de câncer e/ou casos de diversos tipos de câncer relacionados na família, podemos levantar a suspeita de que este indivíduo apresenta uma alta probabilidade de ser portador de uma VP em gene de predisposição ao câncer (Narod & Offit, 2005; Rebbeck et al., 2002).

1.2 Síndrome de Li-Fraumeni:

A Síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer com padrão de herança autossômico dominante e altamente penetrante (Schneider, Zelle, & Nichols, 1999).

O espectro de tumores que ocorrem na LFS é heterogêneo, incluindo tumores pediátricos e tumores de diagnóstico na vida adulta. A definição do espectro de tumores da LFS foi realizada a partir de observações de famílias com fenótipo sugestivo e posteriormente com VP germinativa identificada em *TP53*. Essas observações resultaram na proposição de critérios específicos para suspeita da síndrome, também chamados de critérios “clássicos”. Eles são definidos pela presença de uma pessoa com sarcoma diagnosticado antes dos 45 anos, que tenha um familiar de 1º grau diagnosticado com qualquer tipo de câncer antes dos 45 anos, e um outro familiar de 1º ou 2º grau diagnosticado com sarcoma em qualquer idade ou qualquer câncer antes dos 45 anos. Desta forma, a LFS foi caracterizada, inicialmente, pela concentração familiar dos tumores centrais da síndrome (“core tumors”): sarcomas de partes moles, sarcomas ósseos, tumores de sistema nervoso central, carcinoma adrenocortical (CAC) e câncer de mama (Li & Fraumeni,

1969; Malkin, 1990).

Em parte das famílias com a síndrome, o padrão de ocorrência de tumores é similar, mas não é inteiramente consistente com os critérios clássicos de LFS, sendo descritos adicionalmente os cânceres gástrico, de colón e reto, pulmão, pâncreas, próstata, rim, testículo, laringe, tireoide, cabeça e pescoço e ovário, além de melanoma (Chompret et al, 2001; Da Silva et al., 2011; Formiga et al., 2017; Gonzalez et al., 2009; Olivier et al., 2003; Ruijs et al., 2010; Schneider et al., 1999; Varley et al., 1999). Nas famílias com o fenótipo similar a LFS, os tumores geralmente ocorrem em idade mais tardia e há menos indivíduos afetados por câncer em comparação com as famílias LFS que preenchem os critérios clássicos, sugerindo penetrância parcial. O reconhecimento de que algumas famílias com VP de *TP53* tinham um fenótipo considerado mais “brando”, motivou a proposição de termo Síndrome Li-Fraumeni-like (LFL), e a partir daí critérios menos restritivos foram propostos por Eeles e Birch para identificação de portadores (Birch et al., 1994; Eeles, 1995). Em 2001, Chompret e colaboradores definiram critérios mais amplos do que os clássicos mas distintos dos critérios de Birch e Eeles para selecionar pacientes com suspeita de LFS, aumentando a sensibilidade para identificação de VP em *TP53* mas reduzindo o valor preditivo positivo do teste genético (Chompret et al, 2001). Os critérios de Chompret foram atualizados no ano de 2015 (Gaëlle Bougeard et al., 2015).

Atualmente, o *The National Comprehensive Cancer Network (NCCN)* recomenda a utilização dos critérios revisados em 2015 de Chompret (Pilarski et al., 2019) para indicar testes genéticos direcionados à investigação de LFS. A **Tabela 1** resume os critérios propostos até o momento para LFS e seus valores preditivos positivos.

Tabela 1. Critérios clínicos associados com a Síndrome de Li-Fraumeni.

Critério	Descrição	Valor Preditivo Positivo	Referência
Clássico	1) Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos); E 2) Familiar de 1o grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos); E 3) Familiar de 1o ou 2o grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.	50-70%	(Li,Fraumeni 1969)
Chompret 2001	1) Sarcoma, SNC, CAC ou câncer de mama antes dos 36 anos E familiar de 1o ou 2o grau com câncer antes dos 46 anos ou familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade; OU 2) Múltiplos tumores, incluindo dois que sejam do tipo sarcoma, CAC, mama ou SNC com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar; OU 3) CAC em qualquer idade independente da história familiar.	20%	(Chompret et al, 2001)
Chompret 2009	1) Paciente índice com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni antes dos 46 anos E familiar de 1o ou 2o grau com câncer típico da Síndrome de Li- Fraumeni antes dos 56 anos (exceto câncer de mama, caso o probando tenha câncer de mama) ou múltiplos tumores; OU 2) Paciente índice com múltiplos tumores, sendo pelo menos dois do espectro da LFS e o primeiro antes dos 46 anos ou CAC em qualquer idade ; OU 3) Câncer de mama antes dos 36 anos sem variante patogênica nos genes <i>BRCA1</i> ou <i>BRCA2</i> .	29%	(Bougeard et al., 2008; Tinat et al., 2009)
Chompret 2015	1) Familiar: Probando com tumor pertencente ao espectro tumoral LFS (por exemplo, câncer de mama pré-menopausa, sarcoma de partes moles, osteossarcoma, tumor do SNC, carcinoma adrenocortical) antes dos 46 anos, E pelo menos um parente de primeiro ou segundo grau com tumor LFS (exceto câncer de mama, se probando apresentar câncer de mama) antes dos 56 anos ou com múltiplos tumores; OU 2) Múltiplos tumores: Probando com múltiplos tumores (exceto múltiplos tumores de mama), dois dos quais pertencem ao espectro do tumor LFS e o primeiro com ocorrência antes dos 46 anos de idade; OU 3) Tumores raros: Probando com carcinoma adrenocortical, tumor do plexo coróide ou rabiomiossarcoma do subtipo anaplásico embrionário, independentemente da história familiar; OU 4) Câncer de Mama em idade jovem: Câncer de mama antes dos 31 anos de idade	18%	(Bougeard et al., 2015)
Eeles	1) Presença de dois familiares de 1o ou 2o grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático); OU 2) Sarcoma em qualquer idade no paciente índice com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): câncer de mama (pacientes com idade inferior à 50 anos) e/ou tumor SNC, leucemia, CAC, melanoma, câncer de próstata e pâncreas (pacientes com idade inferior à 60 anos) ou sarcoma em qualquer idade.	10-50%	(Eeles, 1995)
Birch	Câncer na infância ou sarcoma, SNC ou CAC antes dos 45 anos e familiar de 1o ou 2o grau com câncer típico da síndrome de Li- Fraumeni em qualquer idade e familiar de 1o ou 2o grau com qualquer câncer antes dos 60 anos de idade.	22%	(Birch et al., 1994)

CAC, carcinoma adrenocortical; SNC, sistema nervoso central

Em relação à descrição do fenótipo da LFS, um estudo recente demonstrou a existência de padrões temporais no padrão etário de diagnóstico dos tumores relacionados à síndrome. A primeira fase de desenvolvimento e diagnóstico de tumores, em pacientes de 0 a 15 anos, é caracterizada por quatro tipos tumorais principais (carcinoma adrenocortical, carcinoma de plexo coróide, rabiomiossarcoma e meduloblastoma), que juntos correspondem a 22% de todos os tumores diagnosticados na síndrome. Na fase seguinte, entre os 16 e os 50 anos, são diagnosticados 51% de todos os tumores relacionados à síndrome, sendo o câncer de mama o tumor mais prevalente, acometendo 26,4% dos casos (somente casos descritos em mulheres até o momento). Osteossarcomas, leucemias, astrocitomas, glioblastomas, câncer colorretal e de pulmão, além de diferentes subtipos de sarcomas também são característicos desta fase. A fase mais tardia, após os 51 anos, apresenta um amplo espectro tumoral, embora os tumores de próstata e de pâncreas sejam os mais frequentes (Amadou, 2017; Bougeard et al., 2015).

Em relação à penetrância na LFS, em 2016, uma coorte de 286 indivíduos LFS positivos para VP em *TP53* foi avaliada por Mai e colaboradores. Os portadores de VP germinativas, especialmente mulheres com menos de 31 anos e homens com idade menos de 46 anos, apresentaram um risco estimado de 50% para o desenvolvimento de uma ou mais neoplasias. Em idades mais avançadas (acima de 70 anos para ambos os sexos), o risco se aproximou de 70%, podendo chegar a 100%. Nos indivíduos LFS que tiveram o seu primeiro tumor diagnosticado durante a infância, o risco relativo para o desenvolvimento de um segundo tumor foi de 83 (Mai et al., 2016). Contribuindo para a análise da penetrância,

Amadou e colaboradores (2017) estimaram que os portadores de VP em *TP53* apresentam riscos de 58% e 80% para desenvolver um câncer antes dos 40 ou antes dos 70 anos, respectivamente. Na infância e adolescência, os homens têm um risco maior, predominantemente relacionado a tumores como sarcomas de partes moles e tumores de SNC. Já na fase adulta, a penetrância é maior nas mulheres, devido à alta ocorrência de câncer de mama, principalmente na faixa

etária dos 33 aos 36 anos de idade. A alta variabilidade quanto à penetrância de câncer nesses indivíduos foi relacionada em alguns estudos com o tipo de VP apresentada pelo paciente (Amadou, 2017; Zerdoumi et al., 2013). No entanto, como existe variabilidade fenotípica mesmo dentro de famílias com múltiplos portadores da mesma VP germinativa, foi sugerido que fatores genéticos adicionais influenciam o fenótipo, chamados modificadores de fenótipo, descritos em maior detalhe a seguir.

Por fim, em várias famílias com fenótipo muito sugestivo de LFS não é possível identificar uma VP germinativa de *TP53*, uma situação chamada de “*missing heritability*” (Rana et al., 2019; Southey et al., 2013). Apesar da intensa investigação, até o momento *TP53* é o único gene que foi definitivamente associado à síndrome de LFS.

1.3O gene *TP53* e alterações moleculares relacionadas à Síndrome de Li-Fraumeni e suas variantes:

O gene *TP53* (OMIM 191170) está localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e é composto por 11 éxons, sendo o primeiro não codificante. É um gene supressor tumoral conhecido como “O Guardião do Genoma” devido ao seu papel fundamental em diversos processos celulares (Schneider et al., 1999).

O gene *TP53*, codifica a proteína p53, uma molécula (monômero) composta por 393 aminoácidos. Quatro monômeros se organizam (oligomerizam) inicialmente em dímeros e dois dímeros formam um tetrâmero (dímero de dímeros) (Kitayner et al., 2006). O tetrâmero é um fator de transcrição essencial para diversas funções celulares, ativado em resposta a diferentes formas de estresse celular (ativação oncogênica, dano ao DNA, hipóxia, disfunção metabólica e estresse replicativo) e que desencadeia respostas apropriadas de oposição à consequente iniciação do câncer (Aubrey et al., 2016; Petitjean et al., 2007). Além disso, a proteína p53 está envolvida no controle de diversos processos celulares (**Figura 1**), tais como replicação e reparo ao DNA, parada no ciclo celular, apoptose, autofagia senescência, diferenciação e metabolismo oxidativo (Aubrey et al., 2016; Zilfou & Lowe, 2009).

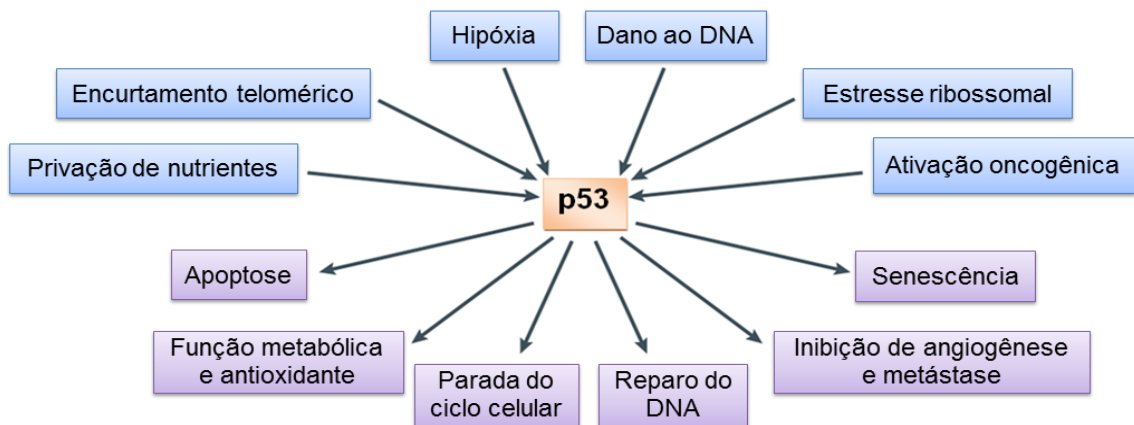


Figura 1. Ativação de p53 por diferentes sinais de estresse celular e suas funções supressoras de tumor. A proteína p53 desempenha o papel de integrar respostas celulares (em roxo) a uma variedade de tipos de estresse (em azul). Modificado de (Vousden & Lane, 2007).

Variantes somáticas de *TP53* são encontradas em mais de 50% dos tumores, e podem ocorrer em praticamente qualquer tipo de tumor sólido (Mai et al., 2016). Mais precisamente, em 1990, um conjunto de VP localizadas em um domínio específico da proteína p53 essencial para que a mesma desempenhe sua função como fator de transcrição (domínio de ligação ao DNA) foram descritas como as causadoras da LFS em pacientes que preenchem os critérios clássicos da doença (Frebouge, et al., 1995; Malkin, 1990). Os domínios funcionais da proteína p53 estão representados na **Figura 2**.

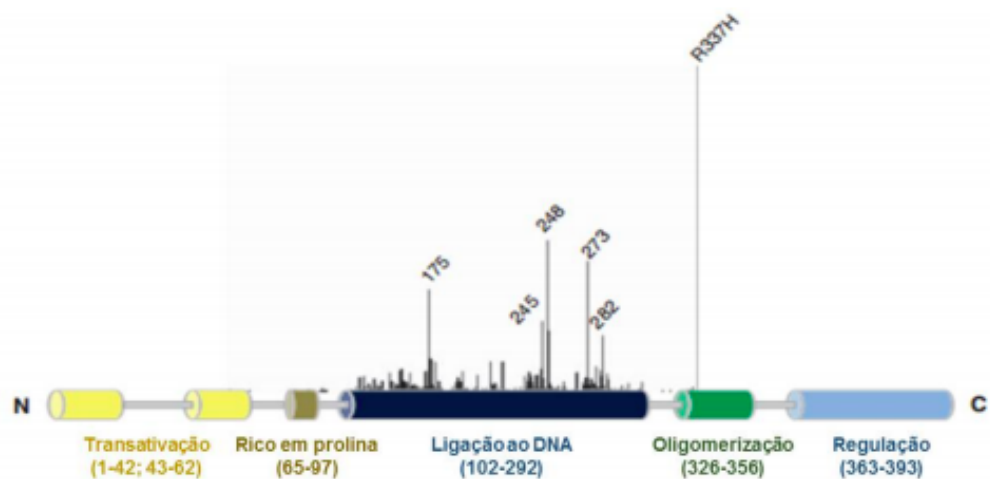


Figura 2. Domínios da proteína p53 e variantes germinativas patogênicas associadas a câncer em humanos. Estão destacadas as variantes germinativas comuns, mais conhecidas como variantes de *hotspots* todas localizadas no domínio de ligação ao DNA com exceção da variante R337H, fundadora brasileira que se localiza no domínio de oligomerização. Adaptado de (M. I. Achatz & Zambetti, 2016)

1.4 Tipos de variantes patogênicas de TP53 e LFS.

Em relação ao tipo de variantes já descritas no gene *TP53* em associação a neoplasias, a maioria são variantes pontuais na sequência codificadora do gene. As variantes germinativas patogênicas, em sua maioria (70%) são de sentido trocado, e cerca de 20% são mutações sem sentido ou em sítios de *splicing* (Amadou, 2017). Acredita-se que até 10% dos casos apresentam ainda deleções completas do gene *TP53*. Estudos de correlação genótipo-fenótipo sugerem que os rearranjos gênicos de *TP53* estão associadas com características mais agressivas relacionadas à manifestação clínica da LFS (Bougeard et al., 2003). Recentemente, Fortuno e colaboradores compararam variantes germinativas de 749 probandos e 276 familiares de 3 bancos de dados e concluíram que indivíduos com variantes em *hotspots* do gene (a maioria localizada no domínio de ligação ao DNA; tanto germinativas quanto somáticas) apresentavam um prognóstico pior (Fortuno et al., 2019). A compilação mais abrangente de variantes de *TP53*, tanto somáticas como germinativas, é o banco de dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) versão R19, atualizado em agosto de 2018 (<http://p53.iarc.fr>).

1.5 Alterações moleculares de TP53 e heterogeneidade fenótipo na LFS.

A extensa variabilidade que ocorre na LFS, tanto na idade ao diagnóstico quanto nos tipos de tumores associados com as mutações germinativas específicas em *TP53*, sugere que fatores genéticos adicionais influenciam o fenótipo. A variabilidade não se resume a diferentes fenótipos observados com diferentes

variantes germinativas mas também se observa em diferentes indivíduos de uma mesma família, que todos têm a mesma variante causadora da LFS. Até o momento, vários modificadores genéticos foram identificados como possíveis determinantes da idade ao diagnóstico do primeiro tumor, bem como da ocorrência de múltiplas malignidades em portadores de VP em *TP53*. Os potenciais modificadores de fenótipo incluem polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) intragênicos, comprimento telomérico, presença de *Copy Number Variations* (CNVs) e questões relacionadas ao metabolismo energético (Kamihara, Rana, & Garber, 2014; McBride et al., 2014).

Estudos preliminares e algumas hipóteses sugerem também que possam existir variantes causais da LFS situadas em regiões comumente negligenciadas na rotina de diagnóstico molecular, como as regiões regulatórias 5'UTR e 3'UTR, ou alterações epigenéticas associadas com o gene *TP53* que possam ter um impacto funcional (Kamihara et al., 2014; Macedo et al., 2016). Por fim, alterações em outros genes reguladores da expressão de *TP53* (p.ex. genes de miRNA) podem ter um impacto na expressão fenotípica de pessoas com LFS.

Em relação aos SNPs anteriormente identificados como modificadores de fenótipo, inicialmente destacaram-se variantes germinativas funcionais situadas no próprio gene *TP53*, como p.Arg72Pro (Dumont et al., 2003) e PIN3 (Olivier et al., 2010). PIN3 consiste em uma duplicação de 16 pares de base no íntron 3 de *TP53*, sendo que presença desse alelo duplicado foi associada com menores níveis de transcrito do gene *TP53*, sugerindo que o mesmo cause uma alteração no processamento do mRNA (Gemignani et al., 2004). Clinicamente, se observou uma diferença importante na idade ao diagnóstico de câncer em portadores e não portadores desse SNP em uma amostra de indivíduos brasileiros heterozigotos para VP germinativas de *TP53* (Marcel et al., 2009). Além de PIN3, o SNP 309 (rs2279744 T>G), localizado no promotor do gene *MDM2* (regulador negativo de p53), também demonstrou apresentar um papel como modificador de fenótipo relacionado à idade ao diagnóstico do primeiro tumor (Bougeard et al., 2006). Mais recentemente, o SNP funcional *MIR605* rs2043556, localizado em um gene codificador de um miRNA que regula a via de p53 (miR-605), foi associado com uma idade ao diagnóstico do primeiro tumor mais precoce em famílias da população

canadense com a forma clássica da síndrome (LFS) apresentando mutações germinativas situadas no domínio de ligação ao DNA de p53 (Id Said & Malkin, 2015).

Apesar desses inúmeros estudos, é importante ressaltar que o entendimento acerca dos modificadores genéticos e ambientais é ainda limitado. O reconhecimento de novos modificadores genéticos poderá facilitar avaliações individualizadas do risco de câncer e, como consequência, poderá ajudar a definir estratégias apropriadas de vigilância e manejo para uso em indivíduos e famílias com VP no gene *TP53* (Bond et al., 2007; McBride et al., 2014; Sagne et al., 2014; A. G. Silva et al., 2014).

1.6 Frequencia populacional de variantes germinativas em *TP53*

Estudos de prevalência populacional estimaram originalmente que as VP germinativas de *TP53* ocorrem na faixa de 1 a cada 5.000 a 1 a cada 20.000 indivíduos (Lalloo et al., 2003; Gonzalez et al., 2009). No entanto, dois estudos recentes de Andrade e colaboradores (2017 e 2019) reavaliaram a prevalência de VP no gene *TP53*. No primeiro estudo, foi analisada a prevalência de VP localizadas nas regiões codificadoras de *TP53* (éxons 2-11) em três grandes bancos de dados populacionais, totalizando 63.983 indivíduos não relacionados. Foram identificadas 34 variantes provavelmente patogênicas no gene em 131 dos 63.983 indivíduos, correspondendo a uma prevalência 10 vezes maior (0,2% ou 1:500) do que aquela anteriormente estimada (Andrade et al., 2017). No segundo estudo, o mesmo grupo de pesquisa analisou todas as variantes genéticas depositadas em um banco de dados que compila informações do sequenciamento completo do genoma de 138.632 indivíduos não relacionados, conhecido como *Genome Aggregation Database* (gnomAD). Dessa vez, 64 VP ou provavelmente patogênicas foram identificadas no gene *TP53* em 399 dos 138.632 indivíduos, sugerindo que a prevalência pode chegar a um portador a cada 348 indivíduos (Kelvin C. de Andrade et al., 2019). Estima-se que a VP R337H esteja presente em 0,3% da população do Sul e Sudeste do Brasil (Palmero et al., 2008; Custodio et al., 2013).

1.7 Frequencia de variantes germinativas em *TP53* em indivíduos com critérios de Chompret para LFS.

No Brasil, o primeiro estudo com um maior número de pacientes apresentando critérios clínicos para a LFS foi o de 2007 de Achatz e colaboradores, no qual 13 dos 45 probandos analisados (28,8%) eram portadores de VP germinativa em *TP53*, mas nem todos tinham os critérios de Chompret, sendo os critérios de Eeles e Birch também considerados no recrutamento de participantes. Porém o estudo foi marcante pois descreveu pela primeira vez frequência aumentada de uma VP específica de *TP53*, identificada como R337H e presente em 6 dos 13 pacientes portadores (46,6%) (Achatz et al., 2007). Desde então, apenas um estudo analisou a prevalência de VP de *TP53* em probandos Chompret no Brasil, mas foram incluídos apenas 17 casos (Andrade et al. 2017).

Em outros países, a taxa de detecção de VP em *TP53* em pacientes com critérios de Chompret foi descrita em algumas séries de caso e os resultados estão resumidos na tabela 2.

Tabela 2. Prevalência de variantes patogênicas de *TP53* em pacientes com critérios para LFS.

Referência	País	Caracterização da amostra e critérios	Prevalência
(Chompret et al, 2001)	França	3/15 probandos / Chompret 2001	20%
(Bougeard et al., 2008)	França	67/232 probandos / Chompret 2001	29%
(Gonzalez et al., 2009)	Estados Unidos	69/195 probandos / Chompret 2001	35%
(Ruijs et al., 2010)	Holanda	22/105 probandos / Chompret 2009	21%
(Bougeard et al., 2015)	França	177/981 probandos / Chompret 2009	18%

1.8A variante germinativa *TP53* R337H no Brasil

A variante de *TP53* c.1010G>A p.(Arg337His), popularmente conhecida como R337H, localizada no éxon 10 (domínio de oligomerização) e ocasiona a substituição de uma arginina por uma histidina no códon 337 da proteína p53. Foi caracterizada como sendo uma variante fundadora frequente no Sul e Sudeste do Brasil (Garritano et al., 2010) e embora tenha sido descrita inicialmente como uma “mutação tecido-específica” relacionada unicamente a carcinoma adrenocortical (CAC), hoje considera-se que ela é uma VP relacionada à ocorrência de múltiplos tumores, em um espectro similar ao da LFS (Varley et al., 1999).

A primeira descrição de R337H em pacientes brasileiros foi em 2001. Ribeiro e colaboradores identificaram a presença dessa VP em 35 de 36 crianças com CAC provenientes de 28 famílias da periferia de Curitiba. Chegaram a descrever a ocorrência de casos de câncer de mama, leucemia e câncer colorretal em familiares de primeiro e segundo grau desses probandos, porém ficou caracterizada a associação entre a variante R337H no gene *TP53* e o alto risco para o desenvolvimento de CAC em crianças da região sul do Brasil (Ribeiro et al., 2001). Muitos anos depois, a análise de R337H foi incluída no protocolo de triagem neonatal do estado do Paraná (Custodio et al., 2013). Em 2007, Achatz e colaboradores demonstraram, pela primeira vez, que indivíduos com a variante R337H também apresentavam alto risco para uma ampla gama de tumores do espectro típico da LFS (Achatz et al., 2007). Desde então, outros estudos foram conduzidos no Brasil, em diversos cenários clínicos, confirmando que portadores da variante R337H apresentam chances maiores de desenvolver outros tumores além de CAC, como Carcinoma de Plexo Coroide (CPC), câncer de mama, sarcomas, câncer de cólon, entre outros (Tabela 3). Mais recentemente, Mastellaro e colaboradores descreveram em portadores da variante R337H um risco cumulativo de desenvolver câncer até os 45 anos de 21% e demonstraram uma

distribuição bimodal dos diagnósticos de câncer nesses pacientes: um primeiro pico de diagnósticos ocorre nos primeiros 10 anos de vida (representado majoritariamente pelo CAC) e um segundo pico de diagnósticos ocorre na quinta década de vida (Mastellaro et al., 2017).

Por algum tempo, a comunidade científica questionou se a variante R337H seria de fato uma VP. Esses questionamentos foram feitos devido à alta frequência e relativa redução de penetrância aparentemente relacionada à variante. Dois estudos realizados há mais de 15 anos tentaram avaliar essa questão. No primeiro estudo, análises bioquímicas e estruturais foram realizadas para avaliar a integridade de p53 na presença da variante R337H. Como resultado, demonstraram que a proteína somente é capaz de formar tetrâmeros em condições específicas de pH (DiGiammarino et al., 2002). A ocorrência de pH intracelular alcalino (acima de 7,0) e/ou temperatura acima de 36,5 graus celsius resultaram na perda da função da p53, de forma pH-dependente (DiGiammarino et al., 2002; Hainaut, 2002). Esta dependência de condições fisiológicas poderia contribuir, pelo menos em parte, para a penetrância incompleta e para os padrões de heterogeneidade tumoral observados em famílias brasileiras portadoras da variante (Guha & Malkin, 2017). Posteriormente a variante R337H foi avaliada em estudo funcional conduzido por Kato e colaboradores (2003). Neste estudo, a alteração *missense* foi considerada patogênica após ensaio de transativação de levedura (Kato et al., 2003). Em um estudo mais recente, Zerdoumi e colaboradores confirmou, em um estudo funcional, que VP em *TP53* afetam a resposta transcricional ao dano da DNA e que a VP R337H representa um impacto menor em relação às VP que se encontram no domínio de ligação do DNA (Zerdoumi et al., 2017).

De fato, análise de heredogramas de pacientes com variantes identificadas em *TP53*, revelam diferenças significativas entre os portadores de variantes no DBD e portadores de R337H (Kratz et al., 2017). Enquanto a penetrância de câncer antes dos 30 anos foi estimada em 50% para os portadores de VP clássicas localizadas no DBD, nos portadores da variante R337H ela foi estimada em 15-20% (Garritano et al., 2010).

1.9 Estudos de prevalência da variante R337H no Brasil

Diversos estudos tentaram definir a prevalência da variante R337H em pacientes brasileiros diagnosticados com câncer. Destacam-se um primeiro estudo realizado no estado de São Paulo em 2001 com crianças diagnosticadas com CAC (R337H foi identificada em 14/18 crianças e 5/37 adultos com CAC esporádico e sem história familiar de câncer) e diversos estudos com pacientes diagnosticadas com câncer de mama (Latronico et al., 2001).

Em famílias com a variante germinativa R337H, tumores de mama representam 30,4% de todos os tumores descritos (Achatz et al., 2007). Um estudo recente, que avaliou mulheres com câncer de mama independente da história familiar, sugere que um diagnóstico de câncer de mama em idade menor que 46 anos seria suficiente para indicar a pesquisa da VP R337H (Hahn et al., 2018). Os estudos Brasileiros que avaliaram prevalência da variante R337H de *TP53* em diferentes cenários clínicos estão resumidos na Tabela 3.

Tabela 3. Estudos de prevalência da variante R337H no Brasil

Referência	Caracterização da Amostra	Local (Estado)	Prevalência (%)
(Ribeiro et al., 2001)	35 de 36 pacientes com CAC	PR	97
(Achatz et al., 2007)	6 de 45 pacientes com critérios para LFS	SP, RJ, RS	13,3
(Palmero et al., 2008)	2 de 750 pacientes sem câncer e não selecionadas para história familiar atendidas em um centro de referência	RS	0,3
(Assumpção et al., 2008)	3 de 123 mulheres com câncer de mama não selecionadas para história familiar 0 de 223 controles	SP	2,4
(Gomes et al., 2012)	2 de 390 mulheres com câncer de mama não selecionadas para história familiar	RJ	0,5

0 de 324 controles

(Custodio et al., 2013)	461 de 171,649 bebês em rastreamento neonatal	PR	0,27
(Giacomazzi et al., 2013)	11 de 292 pacientes com tumores pediátricos não selecionados para história familiar 0 de 65 controles sem câncer	RS	3,8
(Giacomazzi et al., 2013)	8 de 141 mulheres com tumores Phyllodes de mama	RS	5,4
(Giacomazzi et al., 2014)	Grupo 1) 2 de 59 mulheres com câncer de mama sem critérios para LFS Grupo 2) 70 de 815 mulheres com câncer de mama não selecionadas para história familiar	RS	1) 3,4 2) 8,6
(Cury et al., 2014)	2 de 28 pacientes com diagnósticos de câncer de mama que preenchem critérios para predisposição hereditária para câncer de mama e ovário e 0 de 120 controles	SP	7,1
(Felix et al., 2014)	1 de 106 pacientes com diagnóstico de câncer de mama e/ou ovário que preenchem critérios para predisposição hereditária para câncer de mama e ovário	BA	0,94
(Andrade et al., 2014)	42 de 348 famílias em seguimento em ambulatório de alto risco para câncer (com ou sem critérios específicos para LFS)	SP	12,06
(Caminha et al., 2015)	75 de 34.344 amostra em rastreamento neonatal	SP	0,21
(Schayek et al., 2016)	0 de 513 pacientes sem câncer e 103 pacientes com diagnóstico de câncer de ovário não selecionados para história familiar	MG	0
(Andrade et al., 2017)	1 de 39 pacientes com critérios para LFS com critérios diversos para LFS (Chompret 2015, Eeles, Birch e clássico)	RJ	2,5
(Mastellaro et al., 2018)	76 de 84 pacientes com CAC	SP	90,4
(Hahn et al., 2018)	Grupo 1) 1 de 315 pacientes com câncer de mama não selecionadas por idade ou história familiar	RS	0,3 2,5

Grupo 2) 6 de 239 pacientes com câncer de mama <46 anos e sem critérios de Chompret

(Cipriano et al., 2019)	1 de 32 pacientes com ou sem câncer que preenchem critérios para predisposição hereditária para câncer de mama e ovário e não para LFS	MG	2,3
(Ferreira et al., 2019)	40 de 121 pacientes com CAC	SP	33

CAC, Carcinoma adrenocortical; LFS, Síndrome de Li-Fraumeni

1.10 Painéis multigênicos e a Síndrome de Li-Fraumeni

Com o advento de novas tecnologias de sequenciamento aplicadas para diversas doenças humanas, a utilização de painéis multigênicos para avaliar síndromes de predisposição hereditária ao câncer vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Não raramente uma família preenche critérios clínicos para mais de uma síndrome de predisposição ao câncer, e por haver a disponibilidade de testes mais amplos a um custo acessível, estudos apontam para uma preferência dos médicos pela indicação de painéis maiores (O’Leary et al., 2017). Uma outra explicação plausível para essa mudança na prática é o fato de que em alguns países os seguros de saúde pagam um determinado exame apenas uma vez para cada segurado. Qualquer que seja o motivo para solicitação de painéis multigênicos, essa prática pode, com relativa frequência, revelar a presença de uma síndrome para a qual não havia uma suspeita prévia (Hall et al., 2009). A confirmação de causalidade da variante encontrada para originar o fenótipo pode, no entanto, ser mais difícil. Por exemplo, há alguns anos foram relatadas VP no gene *CHEK2* em até 9% de famílias com histórico clínico de LFS e negativas para VP em *TP53* (Ruijs et al., 2009). Em um estudo de 2018, portadores de VP em *TP53* (avaliados por *Next-Generation Sequencing* – NGS com painel multigênico) tiveram uma frequência menor de diagnósticos de câncer na infância e de tumores “core” da LFS. Como esperado, estes pacientes nem sempre preenchem os

critérios clínicos para suspeita de LFS, sendo em muitos a identificação da VP considerada “incidental”. As novas abordagens de propor testes genéticos sem uma hipótese *a priori* e envolvendo a análise de um grande número de genes exigirão modificações nos paradigmas de aconselhamento genético (Rana et al., 2019 and 2018). Em termos de prevalência de VP nas análises com painéis multigênicos, dois estudos diferentes prevalências de VP em *TP53* bem distintas: 1,8% (35.000 mulheres com câncer de mama) e 0,04% (95.561 mulheres com história pessoal ou familiar sugestiva para câncer de mama ou ovário hereditários) (Kurian, 2017; Buys et al., 2017). É importante salientar que os testes com painéis de genes variam em número de genes incluídos e também na sensibilidade e especificidade de detecção das variantes.

Outra preocupação que surge com a realização de painéis multigênicos em larga escala é sobre a interpretação errônea de expansões clonais aberrantes (*aberrant clonal expansions*, ACEs) como sendo variantes patogênicas do *TP53*. Em uma série de 114.630 testes de painéis multigênicos, 353 resultados apresentavam uma VP em *TP53* e análise mais detalhada gene-específica evidenciou que 20% dos sequenciamentos continham anormalidades adicionais que foram caracterizadas como ACEs em 91% com exames complementares/ortogonais, sendo a maioria decorrente de clones hematopoiéticos. Os indivíduos com ACEs eram mais velhos (50 versus 37.7 anos, $p=0,02$) e mais frequentemente diagnosticados por painéis (66/285; 23,2%) ao invés de teste gene-específico (6/68; 8.8%). A realização de testes complementares é fundamental para confirmar o status de VP para LFS antes do manejo do indivíduo, principalmente quando o probando não apresenta fenótipo de LFS (Weitzel et al., 2018).

Por fim, a utilização de painéis multigênicos está relacionada à detecção de um número maior de variantes de significado incerto (VUS, do inglês *variants of uncertain significance*). As VUS são variantes cuja patogenicidade ainda é desconhecida, devido à ausência de informações genéticas e clínicas suficientes para determinar sua associação causal com a doença. A maior parte das VUS são pequenas inserções e deleções que não alteram o quadro de leitura (*in-frame*), variantes de sentido trocado (missense) ou silenciosas, ou ainda alterações em

íntrons e regiões potencialmente regulatórias (Carvalho et al., 2007; Slavin et al., 2015). Diversos estudos mostram que a frequência das VUS é proporcional ao tamanho do painel sequenciado, o que poderia ser considerado uma desvantagem importante da utilização dos painéis multigênicos (Lincoln et al., 2015; O’Leary et al., 2017). A adequada avaliação da patogenicidade de uma VUS envolve diversas abordagens, incluindo análise da prevalência populacional, análises de dados computacionais (preditores de efeito da variante), análises de segregação, de dados clínicos e de resultados de ensaios funcionais (Richards et al., 2015).

Nesse contexto, é importante ressaltar que o aconselhamento genético é uma etapa fundamental no diagnóstico de síndromes de predisposição hereditária ao câncer (Weitzel et al., 2011). De maneira geral, a identificação de uma VUS em *TP53* é uma questão que desafia diariamente os profissionais de saúde que realizam aconselhamento genético, uma vez que não há protocolo de ação clínica estabelecido para portadores de VUS e que a identificação de uma VUS causa confusão e ansiedade tanto nos pacientes como na equipe assistencial (Weitzel et al., 2011).

Uma importante contribuição para melhorar o entendimento das VUS é o compartilhamento dos resultados de sequenciamentos em bancos de dados públicos. Como resultado dos esforços coletivos, espera-se que a incidência de VUS diminua nos próximos anos. Além disso, é essencial uma revisão periódica das VUS identificadas em *TP53*, sendo esse um dos objetivos principais aqui abordados (**Artigo 2**, página 63) comunicando ao paciente qualquer nova definição que seja encontrada .

1.11 Recomendações de seguimento e manejo clínico para pacientes com LFS:

No ano de 2004, em Toronto, foi criado um protocolo de rastreamento de neoplasias e manejo para pacientes com a LFS. O protocolo inclui exame físico frequente, exames de rastreamento abrangentes (laboratoriais e de imagem incluindo ressonância magnética de SNC, das mamas e do corpo todo) e, adicionalmente, indica a discussão de condutas de manejo redutoras de risco como mastectomia bilateral (McBride et al., 2014). Em 2011, Villani e colaboradores

demonstraram que os portadores de variantes patogênicas em *TP53* se beneficiam enormemente desse protocolo, mostrando com um número pequeno de pacientes a importância de se sedimentar o uso da ressonância magnética de corpo inteiro (RMCI) e de documentar o impacto do protocolo de rastreamento em pacientes com a síndrome (Villani et al., 2011). Coletivamente, esta abordagem tem um impacto significativo na sobrevida global, em comparação com os pacientes que não são submetidos a este seguimento diferenciado (Anupindi et al., 2015; Asdahl et al., 2017; Ballinger et al., 2017). A detecção precoce do tumor permitiu abordagens localizadas e definitivas que diminuíram ou até evitaram a exposição a tratamentos sistêmicos ou a tratamentos com radiação. Curvas de sobrevida mostram uma diferença significativa entre dois grupos de pacientes tratados prospectivamente na mesma época (Villani et al., 2016). No Brasil, Paixão e colaboradores avaliaram 59 pacientes (88% portadores da VP R337H) após 2 etapas de rastreamento com RMCI em 12 meses encontrando 3 novos tumores confirmados por estudo histopatológico (2 desses portadores da VP R337H), sugerindo que a RMCI seja realizada como parte do rastreamento de tumores, inclusive em portadores da VP R337H (Paixão et al., 2018).

Atualmente, as recomendações do NCCN são baseadas no Protocolo de Toronto e incluem, além das recomendações de rastreamento com exames, evitar exposição desnecessária à radiação e radioterapia (Heymann et al., 2010; Pilarski et al., 2019). Por ser um seguimento complexo, os pacientes necessitam que suas condutas e rastreamentos sejam realizados em um centro especializado (Kratz et al., 2017; Pilarski et al., 2019). As recomendações do protocolo estão descritas abaixo na Tabela 4 .

Tabela 4. Protocolo de seguimento para pacientes com VP no gene *TP53* (LFS).

Protocolo Infância (0 a 18 anos)	Protocolo Adultos (acima de 18 anos)
<p>Geral:</p> <ul style="list-style-type: none"> Exame físico completo a cada 3 a 4 meses (atenção especial para pressão arterial, ganho rápido de peso e altura, virilização e aparência cushingoide). 	<p>Geral:</p> <ul style="list-style-type: none"> Exame físico completo a cada 6 meses Avaliação completa imediata se houver qualquer suspeita clínica

-
- Avaliação completa imediata se houver qualquer suspeita clínica

Carcinoma adrenocortical:

- Ecografia abdominal e pélvica a cada 3 a 4 meses
- Análise sérica de testosterona total, sulfato de dehidroepiandrosterona e androstenediona (caso ecografia não atinja qualidade adequada)

Tumor de Sistema nervoso central:

- Ressonância Magnética do Encéfalo anual (primeira com contraste e seguimento pode ser sem contraste)

Sarcoma ósseo e de partes moles:

- Ressonância Magnética de Corpo Inteiro anual

- Ressonância magnética das mamas anual (a partir dos 20 até os 75 anos)
- Considerar mastectomia bilateral redutora de risco

Câncer de Mama:

- Auto-exame mamas (a partir dos 18 anos)
- Exame clínico das mamas semestralmente (a partir dos 20 anos)

Tumor de sistema nervoso central:

- Ressonância Magnética do Encéfalo anual (primeira com contraste e seguimento pode ser sem contraste)

Sarcoma ósseo e de partes moles:

- Ressonância Magnética de Corpo Inteiro anual
- Ecografia de abdome e pelve anual

Tumor Gastrointestinal:

- Endoscopia e Colonoscopia a cada 2 a 5 anos (a partir dos 25 anos)

Melanoma:

- Dermatoscopia anual

Adaptado de Kratz et al., 2017

No contexto da Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), os benefícios da identificação de portadores de VP em *TP53* são bem estabelecidos. Apesar da importância do diagnóstico molecular de indivíduos em risco para a síndrome, o acesso a esses testes ainda é muito limitado no Brasil, e não está disponível no Sistema Único de Saúde (SUS). Ademais, um número limitado de estudos de caracterização de alterações germinativas em *TP53* associadas com a LFS, em pacientes que preenchiam critérios específicos, foi conduzido no Brasil até o momento .

Em paralelo a estas dificuldades, em especial no SUS, a oferta de testes genéticos e a disponibilidade de painéis multigênicos na saúde suplementar ou atendimentos privados crescem gradativamente e conseqüentemente, se observa detecção crescente de VP e também de VUS em *TP53*, sejam probandos com ou sem suspeita prévia de LFS.

Sendo assim, torna-se relevante a realização de estudos adicionais que visem identificar as VP em *TP53* em pacientes com fenótipo altamente sugestivo da síndrome, bem como reavaliar a patogenicidade de VUS reportadas previamente em testes genéticos. Essa reanálise consiste em agregar informações atualizadas ao estudo dessas variantes específicas, tais como análises de segregação e acesso a dados clínicos dos portadores e de seus familiares, busca na literatura por ensaios funcionais publicados recentemente, definição do conjunto de algoritmos *in silico* que fornecem a melhor “predição” do potencial patogênico das variantes germinativas identificadas em um determinado gene, entre outros aspectos. Estudos com ambas finalidades poderão ajudar na identificação de grupos de pacientes de maior risco para câncer que se beneficiariam com programas de prevenção e detecção precoce de neoplasias.

Objetivo geral






Caracterizar o perfil clínico e as alterações moleculares em indivíduos que preenchem critérios clínicos para Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil.

Objetivos específicos

- 1) Caracterizar as principais manifestações clínicas observadas em pacientes que preencham critérios clínicos de Chompret (versão revisada de 2015) para a síndrome de Li-fraumeni em famílias do sul e sudeste do Brasil;
- 2) Determinar a prevalência de variantes patogênicas germinativas localizadas nas regiões codificantes (éxons 2-11) do gene *TP53* nesse mesmo grupo de pacientes;
- 3) Determinar a frequência de variantes de significado incerto (VUS) no gene *TP53* identificadas em pacientes não-selecionados por suspeita clínica de LFS submetidos anteriormente a testes genéticos abrangentes (painéis multigênicos incluindo análise de *TP53*) ou restritivos (sequenciamento completo apenas de *TP53*);
- 4) Caracterizar as VUS identificadas, buscando melhor definir sua patogenicidade e o seguimento adequado para cada família portadora.

Clinical and molecular characterization of patients fulfilling
Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome in Southern Brazil

PLoS One 2021 Sep 16;16(9):e0251639. doi: 10.1371/journal.pone.0251639.

Camila Matzenbacher Bittar^{1,2}, Yasminne Marinho de Araújo Rocha², Igor Araujo
Vieira^{1,2}, Clévia Rosset^{1,2}, Tiago Finger Andreis^{1,2}, Ivaine Tais Sauthier Sartor³, Osvaldo
Artigalás³, Cristina B. O. Netto⁴, Barbara Alemar^{1,2}, Gabriel S. Macedo², Patricia Ashton-
Prolla^{1,2,4}*

1 Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

3 Hospital Moinhos de Vento (HMV), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

4 Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil

 These authors contributed equally to this work.

‡ These authors also contributed equally to this work.

* E-mail: pprolla@gmail.com

Abstract

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome caused by pathogenic germline variants in the *TP53* gene, characterized by a predisposition to the development of a broad spectrum of tumors at an early age. The core tumors related to LFS are bone and soft tissue sarcomas, premenopausal breast cancer, brain tumors, adrenocortical carcinomas (ACC), and leukemias. The revised Chompret criteria has been widely used to establish clinical suspicion and support *TP53* germline variant testing and LFS diagnosis. Information on *TP53* germline pathogenic variant (PV) prevalence when using Chompret criteria in South America and especially in Brazil is scarce. Therefore, the aim of this study was to characterize patients that fulfilled these specific criteria in southern Brazil, a region known for its high population frequency of a founder *TP53* variant c.1010G>A (p.Arg337His), as known as R337H. *TP53* germline testing of 191 cancer-affected and independent probands with LFS phenotype identified a heterozygous pathogenic/likely pathogenic variant in 26 (13.6%) probands, both in the DNA binding domain (group A) and in the oligomerization domain (group B) of the gene. Of the 26 carriers, 18 (69.23%) were R337H heterozygotes. Median age at diagnosis of the first tumor in groups A and B differed significantly in this cohort: 22 and 2 years, respectively ($P= 0.009$). The present study shows the clinical heterogeneity of LFS, highlights particularities of the R337H variant and underscores the need for larger collaborative studies to better define LFS prevalence, clinical spectrum and penetrance of different germline *TP53* pathogenic variants.

Introduction

Li-Fraumeni (LFS) syndrome is an autosomal dominant cancer predisposition disorder mainly caused by pathogenic and likely pathogenic germline variants (PV) in the *TP53* tumor suppressor gene encoding the p53 protein. Although any tumor can be identified in LFS carriers, “core” tumors of the syndrome have been reported and include premenopausal breast cancer, bone and soft-tissue sarcoma, brain cancer, leukemia and adrenocortical carcinoma (ACC). Carriers of

germline *TP53* PV have a variable lifetime risk of developing cancer, and phenotype may vary from fully penetrant LFS to cancer-free over a lifetime. Nevertheless, about 50% of carriers develop at least one malignancy by age 30, especially those with *TP53* DNA-binding domain (DBD) variants, also called “classic” variants, which represent approximately 86% of the *TP53* pathogenic variants associated with the LFS phenotype in most countries [1-3].

Population prevalence studies have estimated that germline *TP53* PV occur at a frequency of 1 in 5,000 to 1 in 20,000 individuals [4]. In more recent studies, prevalence of *TP53* PV heterozygotes was proposed to reach 0.2% in Europeans [5, 6]. In addition, a germline *TP53* founder PV, c.1010G>A (p.Arg337His), widely referred as R337H, has been reported in Southern Brazil at a frequency of 1 in approximately 300 newborns [7-9], but tumor penetrance appears to be lower than that observed in carriers of DNA-binding domain (DBD) PV [10-13]. The arginine residue at codon 337 is involved in the protein oligomerization and functional data have shown that its replacement with histidine disrupts the tetramer form, making the domain unable to fully oligomerize in conditions of slightly elevated pH [14]. Although it was initially described as a “tissue-specific sequence variant” related only to ACC, today it is considered to be a PV related to the occurrence of multiple tumors, in a spectrum similar to that of LFS [15, 16]. Recent findings from a mouse model provided *in vivo* evidence that the R337H PV decreased p53 transactivation potential and renders mice susceptible to carcinogen-induced liver tumorigenesis [17].

Clinical criteria to define diagnosis of LFS were established based on the first study by Li and Fraumeni [18]. Approximately 70% to 80% of patients who fulfill classical criteria will have a germline PV in *TP53* [16, 19] When a broader LFS tumor spectrum was considered, a number of different sets of criteria started to be used to identify LFS patients, including the Chompret criteria and other criteria for Li-Fraumeni Like Syndrome (LFL) [19-21]. Importantly, diagnostic criteria defined by Chompret have increased the sensitivity of *TP53* germline PV detection by including patients with the core LFS tumors even without a family history. The revised Chompret criteria [21-23] had a PV detection rate of 18% and, when incorporated as part of *TP53* testing criteria along

with classic LFS criteria, have been shown to improve the diagnostic sensitivity to 95% (Classic and Chompret criteria together) [2]. Therefore, the National Comprehensive Cancer Network (NCCN) and several other guidelines recommend using both the Classic LFS and the revised Chompret criteria to indicate germline *TP53* genetic testing [24].

So far, only a few studies showed the prevalence of germline *TP53* PV in individuals from Southern Brazil, in which the prevalence of 28,8% and 11,4% were found in a case series of 45 and 70 probands fulfilling any LFS criteria [25, 26]. In the present study, we aimed to characterize the clinical and molecular profile in a series of LFS patients fulfilling the 2015 revised Chompret criteria and recruited from cancer risk evaluation clinics in southern Brazil. These results can help to better define the LFS prevalence in Southern Brazil and also points out to differences in the clinical spectrum among carriers of distinct PV in *TP53*.

Materials and methods

Patients and ethical aspects

From July 2015 to January 2019, 211 independent cancer-affected patients from unique families with a suggestive clinical phenotype of LFS were identified at a public hospital and private cancer risk evaluation clinics in Southern Brazil. Of these, 191 were residents of the Southern region of Brazil, met the 2015 revised Chompret criteria and were included in the present study. The majority of patients, 148 patients were from a reference public hospital (Hospital de Clínicas de Porto Alegre), seen at the institutional's outpatient cancer genetics clinic (108) and pediatric cancer ward (40). The additional 43 probands were identified in 4 private cancer genetics clinics in the same city. **S1 Fig** is a Consort Diagram that depicts the recruitment and testing process, while the **S1 Table** lists 2015 revised Chompret criteria. The study was approved by the Institutional Review Board. All participants underwent pre- and post-test genetic counseling, provided informed written or verbal consent for the study. When verbal consent was obtained, it was registered on participant clinical

chart. Parents signed the consent for participants that were minors. Personal clinical history, self-reported family history and previous testing results were collected from patient interviews or medical records.

Molecular analysis

Of the 191 patients participating in this study, 43 had previously undergone multi-gene panel testing (MGPT) including *TP53* sequence variant and rearrangement testing using Next-Generation Sequencing (NGS, retrospectively tested), 99 patients had undergone previous analysis of the *TP53* coding region by Sanger sequencing and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) (also retrospectively tested), and 49 patients were offered molecular testing in the institutional research laboratory at recruitment (prospectively tested). *TP53* genotyping in the latter was performed employing two methodologies: (1) NGS in peripheral blood samples using the Ion AmpliSeq™ Panel *TP53* kit (Thermo Fisher Scientific) and Ion GeneStudio S5 system (Ion Torrent Systems Inc, Gilford, NH); and (2) MLPA using the SALSA MLPA P056 kit (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands), followed by capillary gel electrophoresis with the Applied Biosystem 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and analyses of the copy number variations conducted in the Coffalyser.Net software (MRC-Holland®) [27].

Statistical analysis

Tumor spectrum and clinical characteristics of carriers of DBD variants (group A) and R337H variant (group B) were compared. Data normality assumptions were verified on the age of group A and B and Mann-Whitney-Wilcoxon test was performed. To measure the association among the groups, gender, type of cancer and multiple tumors we used Pearson's Chi-Squared test or Fisher's exact test. Odds ratio with 95% confidence intervals were also calculated. To compare the pathogenic variant detection rate in this study and the rate found in Bougeard et al in 2015 [2], we used Pearson's Chi-Squared test with Yates continuity correction. We also divided our probands in

three groups (hotspot DBD variant carriers; R337H carriers and DBD non hotspot variant carriers) and Kruskal-Wallis test followed by Benjamini-Hochberg correction for multiple comparisons was performed. All data analyses were performed in R 3.4.2 statistical software.

Results

Germline PV *TP53* were identified in twenty-six (13.6%) of the 191 probands included in the study. One of the carriers was homozygote and the other 25 carriers of germline PV were heterozygotes. 18 (69.2%) harboured the Brazilian founder R337H variant and 8 probands (30.8%) had a PV in the *TP53* DBD. MLPA analysis identified no *TP53* deletions and/or duplications in this series. **Fig 1** shows the location of each pathogenic alteration detected in the gene and **Table 1** summarizes the clinical and molecular results of all PV-positive probands (**S2 Table** exhibits the characterization of all probands analyzed). **Fig 2** depicts the NGS results encompassing the entire *TP53* coding region from two probands.

Fig 1. Location of the *TP53* pathogenic variants detected in the *p53* protein functional domains. Green dots represent the variants identified in the present study. P53_TAD, transactivation domain; P53_DBD, DNA binding domain; P53_oligomer, oligomerization domain.

Fig 2. Representative next-generation sequencing results encompassing the *TP53* entire coding region (minimum coverage of 100X by amplicon) from two probands fulfilling the 2015 revised Chompret criteria for Li-Fraumeni syndrome. (A) Carrier of a germline pathogenic variant (PV) located in the p53 DNA binding domain (DBD); and (B) carrier of the Brazilian founder R337H PV located in the p53 oligomerization domain. Description of *TP53* sequence variants is provided according to updated Human Genome Variation Society (HGVS) recommendations. Human *TP53* sequence corresponding to the NM_000546.5 was used as a wild-type reference. Right panels show wild-type and variant allele counts, which were consistent with the expected germline occurrence of these genetic alterations (around 50% of reads for each allele). Note that both alleles were analyzed

from antisense strand due to the *TP53* gene orientation. Chr17, position or genomic coordinate at chromosome 17 (GRCh37/hg19 human genome assembly).

Table 1. Clinical and molecular characterization of all LFS probands harboring germline *TP53* pathogenic variants (PV) identified in this study.

Proband ID / Gender	Age at 1 st cancer diagnosis (years)	Proband's type of cancer	Age at diagnosis, other tumors (years)	2015 Version Chompret Criterion(s)	Recruitment	Genetic Testing	chr17 position on Assembly GRCh37 (dbSNP rs ID)	<i>TP53</i> variant HGVS c.	<i>TP53</i> variant HGVS p.
166 / F	32	Breast	Breast (38)	Familial	PC	Sanger + MLPA	rs28934874	c. 451C>T	p.(Pro151Ser)
167 / F	30	Breast (bilateral)	Thyroid (37)	Familial, EOBC	PUB	Sanger + MLPA	rs1057517983	c.731G>A	p.(Gly244Asp)
168 / F	11	CNS	NA	Familial	PUB	Sanger + MLPA	rs28934575	c.733G>A	p.(Gly245Ser)
169 / F	12	OS	Breast (21), Breast (22), STS(24)	MT, EOBC	PC	MGPT	rs28934575	c.733G>A	p.(Gly245Ser)
170 / F	25	Breast	NA	EOBC	PC	MGPT	rs11540652	c.743G>A	p.(Arg248Gln)
171 / M	44	ACC	NA	RT	PUB	NGS + MLPA	rs121912652	c.772G>A	p.(Glu258Lys)
172 / F	19	OS	Breast (29), STS (38)	Familial, MT, EOBT	PUB	Sanger + MLPA	rs28934576	c.818G>A	p.(Arg273His)
173 / F	5	CNS (CPC)	NA	RT	PC	MGPT	rs28934574	c.844C>T	p.(Arg282Trp)
174 / F	0 (6 mo)	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
175 / F	0 (4 mo)	ACC	NA	Familial, RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
176 / F	0 (8 mo)	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
177 / F	1	ACC	NA	Familial, RT	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
178 / M	1	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
179 / M	2	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
180 / M	2	ACC	NA	RT	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
181 / F	3	ACC	NA	RT	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
182 / F	3	ACC	NA	RT	PUB	NGS + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
183 / F	5	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
184 / F	11	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
185 / M	17	ACC	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
186 / F	23	Breast	NA	Familial, EOBC	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
187 / F	57	Breast	NA	Familial	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
188 / F	49	Breast (bilateral)	NA	Familial	PUB	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
189 / M	1	CNS (CPC)	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
190 / M	1	CNS (CPC)	NA	RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)
191 / F	1	ACC	NA	Familial, RT	PED	Sanger + MLPA	rs121912664	c.1010G>A	p.(Arg337His)*

ACC, Adrenocortical Carcinoma; CNS, Central Nervous System; CPC, Choroid Plexus Carcinoma; EOBC, Early Onset Breast Cancer; MGPT, Multigene Panel Testing; MT, Multiple Tumors; MO, months old; OS, Osteosarcoma; RT, Rare Tumors, STS, Soft tissue sarcoma; NA, not applicable; PUB, high-risk public clinic; PC, high-risk private clinic; PED, pediatric tumors database; NGS, Next-generation Sequencing; MLPA, Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification; WT, wild-type genotype; * homozygous for the R337H variant.

Important differences were observed when comparing the tumor spectrum and clinical characteristics of carriers of DBD variants (group A) and R337H variant (group B) (Table 2). The median age at first cancer diagnosis was 22 years in group A and 2 years in group B ($P = 0.009$; Mann-Whitney-Wilcoxon test). Fifteen patients (83.3%) in group B and only 3 (37.5%) in group A developed a tumor before age 18 years. Most of the tumors (13, 72.22%) observed in group B were ACC (all under 18 years), and only one ACC (12.5%) was observed in group A (diagnosed at age 44 years). Finally, multiple primary tumors were observed only among patients from group A, including 4 (50%) patients. Interestingly, one proband had been diagnosed with 4 primary tumors: osteosarcoma, bilateral breast cancer and soft tissue sarcoma; all before age 25 years. The tumor spectrum of the PV carriers is depicted in Fig 3 and shows evident differences between groups (DBD variant and R337H carriers), especially regarding ACC.

Fig 3. Graphic showing the differences between the tumor spectrum observed in carriers of the DBD variants, R337H variant and R337H homozygous proband. ACC, adrenocortical carcinoma; CNS, central nervous system; CPC, choroid plexus carcinoma; DBD, DNA binding domain; OS, osteosarcoma.

Table 2. Distribution of tumor types in all LFS PV-positive patients (n = 26).

Tumor types diagnosed in PV carriers	Number of tumors per PV group (A/B)	OR (95% CI), p value	Number of patients per group (A/B)	% PV carriers per group (A/B)	Age at diagnosis (range when >1) in each group (A/B)
Adrenocortical Carcinoma	1 / 13	16.0 (1.5 – 875.8), 0.009	1 / 13	12.5 / 72.2	44 / 0 to 17
Breast	8 / 4	0.18 (0.03 – 1.0), 0.03	5 / 3	62.5 / 16.6	21 to 38 / 23 to 57
CNS	2 / 2	0.39 (0.02 – 6.53), 0.56	2 / 2	25 / 11.1	5 to 11 / 1
Osteosarcoma	3 / NA	-	2 / NA	25 / NI	12 to 38 / NA
Thyroid	1 / NA	-	1 / NA	12.5 / NI	37 / NA

DBD, pathogenic variants located in the DNA-binding domain; CNS, Central Nervous System tumors; NA, not applicable; NI, not identified.

As observed in **Table 3**, a significant association was found in the comparative analyses including type of cancer and multiple tumors. A higher prevalence of ACC was observed in group B when compared to group A patients ($P = 0.043$; Chi-squared test) and the presence of multiple tumors was most frequent in group A ($P = 0.005$, Fisher exact test). Additionally, we classified the DBD variants in two groups, namely: group A non-hotspot PV, which comprised of p.(Pro151Ser), p.(Gly244Asp) and p.(Glu258Lis) variants; and group A hotspot PV (p.(Gly245Ser), p.(Arg248Gln), p.(Arg273His), p.(Arg282Trp)). When comparing the median age at first diagnosis of cancer in patients from group A non-hotspot PV, group A hotspot PV, and group B (R337H variants) we

observed a significant difference ($P = 0.021$), being 31.8, 12.1 and 2.35 years respectively. The post-hoc analysis pointed out that age at first diagnosis was different between group B and A non-hotspot PV (data not shown).

Table 3. Association of gender, age at first tumor diagnosis, tumor type and development of multiple tumors among carriers of different groups of germline PV *TP53* (groups A and B).

	Group of pathogenic germline variants (PV)		
	A (n=8)	B (n=18)	<i>P</i> value
Gender			
Female	7	12	0.375*
Male	1	6	
Age at first cancer diagnosis, median (IQR)	22 (11.7 – 30.5)	2.0 (1.0 – 9.5)	0.009**
Tumor types			
ACC	1	13	0.043†
Breast	2	2	
Breast bilateral	1	1	
CNS	1	0	
CNS (CPC)	1	2	
OS	2	0	
Multiple tumors			
Yes	4	0	0.005*
No	4	18	

† Pearson Chi-squared test.

* Fisher exact test.

** Mann-Whitney-Wilcoxon test.

ACC, adrenocortical carcinoma; OS, osteosarcoma; CNS, central nervous system; CPC, choroid plexus carcinoma.

Discussion

LFS is considered a rare cancer predisposition disorder worldwide. In Southern Brazil, due to presence of a germline founder pathogenic variant in the *TP53* oligomerization domain (R337H), it is estimated that 0,3% of the general population carries this variant [12]. Despite significant heterozygote frequency at the population level, little information is available on the prevalence of germline *TP53* PV among individuals with a suggestive phenotype, i.e. fulfilling revised Chompret criteria. This information is important to guide health care policies for cancer prevention and treatment in the region. Identifying LFS patients is important to determine adequate clinical surveillance and follow up, not only in the proband but in his/her relatives, since detection of a carrier provides the opportunity for cascade testing and, if additional carriers are identified in the family, they can be referred to appropriate genetic counseling and specific high risk screening protocols [28]. Villani and colleagues (2016) demonstrated that carriers of pathogenic *TP53* variants benefit enormously from an enhanced surveillance protocol, including frequent physical examination plus targeted biochemical monitoring and periodic imaging screens (ultrasounds, brain magnetic resonance images, and rapid whole body MRI scans) [28]. Collectively, this approach has a significant impact in overall survival, compared to patients that do not undergo enhanced surveillance. In Brazil, although patients with health insurance have access to genetic testing if they fulfill the revised Chompret criteria, those that rely solely on the public health care system (about 70% of the population) must pay out of pocket to have this information, since genetic testing for cancer predisposition is not yet paid in the public setting.

In this cohort, tumoral spectrum in R337H carriers was similar to that already described in literature, especially when compared to previous studies performed in other Brazilian Centers. However, in the present study a strikingly higher prevalence of ACC was observed in R337H carriers when compared to carriers of DBD variants ($P= 0.043$; chi-squared test). From this observation we can conclude that in the series presented here, ACC was the most prevalent tumor observed in association with R337H whereas the previous Brazilian study described breast cancer as the most frequent tumor (30%) [25].

Regarding PV detection rate for the 2015 Chompret Criteria identified here (13,6%), this rate is similar to the 18% described by Bougeard *et al.* in 2015 in France ($P = 0.2482$; chi-squared test with Yates correction), but it is mainly due to the presence of the R337H variant [2]. Of note, in the previous study by Andrade *et al.* (2017) of Brazilian patients from the Southeastern region, PV detection rate in 17 probands with the 2015 Chompret Criteria was much higher, 35% [26]. These differences between the studies from Southern and Southeastern Brazil may reflect regional genetic modifiers of the phenotype (i.e. additional genetic risk factors), regional environmental factors or different recruitment strategies in each study.

Regarding genotype-phenotype correlations, it is well known that DBD hotspot variants with reported dominant negative effects, such as p.(Gly245Ser), p.(Arg248Gln), p.(Arg273His) and p.(Arg282Trp) are associated with earlier onset cancers and stronger family history of tumors within the LFS spectrum [29]. On the other hand, several previous studies from Brazilian cohorts have suggested that R337H is a PV with lower prevalence associated with cancer diagnoses at older ages, although a bimodal distribution of age at cancer diagnosis has also been suggested [30, 31]. Contrary to the expected phenotype, probands with the R337H variant in this study had earlier age at first tumor diagnosis when compared with carriers of DBD variants. To analyze this data in more detail, we divided our probands in three groups according to type of PV (non-hotspot DBD, hotspot DBD and R337H) and observed that median age at first tumor diagnosis among groups with the lowest mean age identified among R337H carriers.

The results of the present study are relevant for two main reasons. First, they underscore the importance of considering that significant regional differences may occur and that criteria established for one population may not have the same performance in another population. Considering that the population of Southern Brazil is mostly of European ancestry, one would expect to see a prevalence of germline *TP53* PV variants similar to that observed in Europeans. A high frequency of R337H among probands with a phenotype suggesting LFS had been previously reported by Achatz *et al.* (2007) (46,1% of those with coding region *TP53* variants), but these authors did not restrict their

recruitment to patients fulfilling Chompret criteria [25]. Second, results from the present analysis, in which overall *TP53* germline PV detection rate in Chompret criteria fulfilling probands was lower than expected from previous studies, may suggest that a different set of pathogenic variants, not yet mapped (i.e. located in intronic or regulatory regions of *TP53*) may be associated with the LFS phenotype in this particular region. It is also possible that PV in other, yet unidentified genes are associated with the LFS phenotype, accounting for the “missing heritability” of more than 85% observed here [32, 33]. An important limitation of the present study, that must be accounted for when analyzing the results is this study, is that a significant proportion of data on genetic testing were obtained retrospectively and with different variant detection strategies. Thus, further analyses on a prospectively recruited cohort of probands fulfilling Chompret criteria and then, clinical assessment of families carrying either DBD PV or R337H will be important to confirm these findings. Expanding this study in the region will be essential to instrument policy makers in establishing cancer screening protocols for these individuals.

Conclusions

The current study shows the impressive clinical heterogeneity of LFS, highlights particularities of the founder *TP53* pathogenic variant R337H and points to the need for larger and collaborative studies to better define LFS prevalence, clinical spectrum and penetrance of different types of PVs in the Brazilian population.

Acknowledgments

We would like to thank Gustavo Stumpf da Silva and Patricia Santos-Silva for their valuable contributions and technical support.

References

1. Bougeard G, Sesbo, È R, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Tinat J, et al. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. *J Med Genet.* 45. England 2008. p. 535-8.
2. Bougeard G, Renaux-Petel M, Flaman JM, Charbonnier C, Fermey P, Belotti M, et al. Revisiting Li-Fraumeni Syndrome From TP53 Mutation Carriers. *J Clin Oncol.* 2015;33(21):2345-52.
3. Fischer NW, Prodeus A, Tran J, Malkin D, GariÉpy J. Association Between the Oligomeric Status of p53 and Clinical Outcomes in Li-Fraumeni Syndrome. *J Natl Cancer Inst.* 2018;110(12):1418-21.
4. Laloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'Dair L, Pharoah P, et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet.* 2003;361(9363):1101-2.
5. Buys SS, Sandbach JF, Gammon A, Patel G, Kidd J, Brown KL, et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer.* 2017;123(10):1721-30.
6. Fortuno C, James PA, Spurdle AB. Current review of TP53 pathogenic germline variants in breast cancer patients outside Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat.* 2018;39(12):1764-73.
7. Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol.* 2009;10(9):920-5.
8. Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol.* 2013;31(20):2619-26.
9. Seidinger AL, Caminha IP, Mastellaro MJ, Gabetta CS, Nowill AE, Pinheiro VRP, et al. TP53 p.Arg337His geographic distribution correlates with adrenocortical tumor occurrence. *Mol Genet Genomic Med.* 2020;8(9):e1168.
10. 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(16):9330-5.
11. Giacomazzi J, Selistre S, Duarte J, Ribeiro JP, Vieira PJ, de Souza Macedo G, et al. TP53 p.R337H is a conditional cancer-predisposing mutation: further evidence from a homozygous patient. *BMC Cancer.* 2013;13:187.
12. Palmero EI, Schuler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, 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(1):21-5.
13. Rana HQ, Clifford J, Hoang L, LaDuca H, Black MH, Li S, et al. Genotype-phenotype associations among panel-based TP53+ subjects. *Genet Med.* 2019;21(11):2478-84.
14. DiGiammarino 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(1):12-6.
15. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LL. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res.* 2005;37(4):231-5.
16. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet.* 1999;65(4):995-1006.
17. Park JH, Li J, Starost MF, Liu C, Zhuang J, Chen J, et al. Mouse Homolog of the Human TP53 R337H Mutation Reveals Its Role in Tumorigenesis. *Cancer Res.* 2018;78(18):5375-83.

18. Li FP, Fraumeni JF, Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71(4):747-52.
19. 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(20):6643-50.
20. 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(5):1298-304.
21. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugieres L, Pages S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 2001;38(1):43-7.
22. Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, et al. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol.* 2009;27(8):1250-6.
23. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 27. United States 2009. p. e108-9; author reply e10.
24. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Farmer M, Friedman S, et al. NCCN Guidelines Insights: Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian, Version 3.2019.
25. Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett.* 2007;245(1-2):96-102.
26. Andrade RC, Dos Santos AC, de Aguirre Neto JC, Nevado J, Lapunzina P, Vargas FR. TP53 and CDKN1A mutation analysis in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes. *Fam Cancer.* 2017;16(2):243-8.
27. Leroy B, Ballinger ML, Baran-Marszak F, Bond GL, Braithwaite A, Concini N, et al. Recommended Guidelines for Validation, Quality Control, and Reporting of TP53 Variants in Clinical Practice. *Cancer Res.* 2017;77(6):1250-60.
28. Villani A, Shore A, Wasserman JD, Stephens D, Kim RH, Druker H, et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11 year follow-up of a prospective observational study. *Lancet Oncol.* 2016;17(9):1295-305.
29. Fortunato C, Pesaran T, Dolinsky J, Yussuf A, McGoldrick K, Kho PF, et al. p53 major hotspot variants are associated with poorer prognostic features in hereditary cancer patients. *Cancer Genet.* 2019;235-236:21-7.
30. Zerdoumi Y, Lanos R, Raad S, Flaman JM, Bougeard G, Frebourg T, et al. Germline TP53 mutations result into a constitutive defect of p53 DNA binding and transcriptional response to DNA damage. *Hum Mol Genet.* 2017;26(14):2591-602.
31. Mastellaro MJ, Seidinger AL, Kang G, Abraham R, Miranda ECM, Pounds SB, et al. Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer.* 2017;123(16):3150-8.
32. Complexo, Southey MC, Park DJ, Nguyen-Dumont T, Campbell I, Thompson E, et al. COMPLEXO: identifying the missing heritability of breast cancer via next generation collaboration. *Breast Cancer Res.* 152013. p. 402.
33. Pinto EM, Figueiredo BC, Chen W, Galvao HCR, Formiga MN, Fragoso M, et al. XAF1 as a modifier of p53 function and cancer susceptibility. *Sci Adv.* 2020;6(26):eaba3231.

Supporting information

S1 Fig. Consort Diagram representing the patient recruitment and genetic testing process employed in the current study.

S1 Table. 2015 revised Chompret criteria for LFS and *TP53* gene testing.

S2 Table. Clinical and molecular characterization of all probands (n=191) included in the study.

Manuscrito publicado na *Familial Cancer*

doi: 10.1007/s10689-019-00140-w.

SHORT COMMUNICATION

***TP53* variants of uncertain significance: increasing challenges in variant interpretation and genetic counseling**

Camila Matzenbacher Bittar^{a,b,*}, Igor Araujo Vieira^{a,b,*}, Cristina Silva Sabato^c, Tiago Finger Andreis^{a,b}, Bárbara Alemar^{a,b}, Osvaldo A rtigalás^d, Henrique de Campos Reis Galvão^c, Gabriel S. Macedo^{a,b}, Edenir Inez Palmero^{c,e,#}, Patricia Ashton-Prolla^{a,b,f,#,**}

^a Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Bento Gonçalves, 9500 - Prédio 43323M, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91501-970, Brazil;

^b Laboratório de Medicina Genômica, Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil;

^c Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Viléla, 1331 - Dr. Paulo Prata, Barretos, São Paulo 14784-400, Brazil;

^d Hospital Moinhos de Vento (HMV), Rua Ramiro Barcelos, 910, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 91790-560, Brazil;

^e Barretos School of Health Sciences, Dr. Paulo Prata – FACISB, Barretos, São Paulo 14784-400, Brazil;

^f Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Rua Ramiro Barcelos, 2350, Porto Alegre, Rio Grande do Sul 90035-903, Brazil.

*Camila M. Bittar and Igor A. Vieira have contributed equally to this work and should be considered co-first authors.

#Edenir I. Palmero and Patricia Ashton-Prolla should be considered joint senior authors.

****Corresponding author: Patricia Ashton-Prolla**

E-mail address: pprolla@gmail.com

Telephone number: + 55 51 3359-8011 / Fax + 55 51 3359-8010

Abstract

Li-Fraumeni syndrome (LFS) and Li-Fraumeni Like (LFL) are autosomal dominant cancer predisposition syndromes caused by pathogenic germline variants in the *TP53* gene. Recent studies have shown that the incorporation of next-generation sequencing by using multigene panels in clinical practice has resulted in the frequent identification of variants of uncertain significance (VUS). Given that there is no established medical management for VUS carriers, the identification of these variants may cause confusion and anxiety for both patients and practitioners. Herein, we aimed to verify VUS frequency and review VUS classification and interpretation in 1,844 patients submitted for comprehensive germline *TP53* testing independent of clinical criteria. Variant characterization was done assessing clinical information whenever available, variant frequency in population databases, pathogenicity predictions using *in silico* tools and previous functional studies. All variants were classified based on the guidelines proposed by the American College of Medical Genetics and Genomics (2015) and by the Sherlock framework (2017). Of the twelve VUS (0.65%) identified in *TP53*, two were classified as likely pathogenic and two were classified as likely benign after re-evaluation, potentially resulting in significant management modification for the proband and relatives. This report cases highlights the challenges and impact of *TP53* variant interpretation especially when there is no clear LFS/LFL phenotype.

Keywords: Li-Fraumeni Syndrome, *TP53* gene, variants of uncertain significance, genetic counseling.

A importância da análise molecular na linhagem germinativa (fração leucocitária do sangue periférico) em pacientes e famílias com suspeita clínica de LFS é indiscutível, haja vista os benefícios do manejo específico e adequado de indivíduos portadores de variante patogênica em *TP53*, além da oportunidade de ser realizado aconselhamento genético para familiares em risco. No Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste a LFS é possivelmente mais frequente do que em outros lugares do mundo devido à presença de uma variante patogênica fundadora, R337H. Infelizmente, o sistema público de saúde no Brasil ainda não disponibiliza o teste para avaliar a presença de variantes de *TP53* (nem mesmo da variante fundadora) aos seus usuários.

O objetivo da primeira parte desta tese (objetivos 1 e 2) foi caracterizar os probandos com suspeita clínica de LFS recrutados em centros de referência, os quais atendem pacientes com alto risco para predisposição hereditária na região sul do Brasil. Os resultados desta análise mostram a heterogeneidade clínica da LFS, evidenciam o perfil fenotípico dos portadores da variante fundadora R337H na amostra estudada, apontando para a necessidade de estudos maiores e cada vez mais colaborativos com outros centros para melhor definir a prevalência da LFS, o espectro clínico e a penetrância dos diferentes tipos de variantes patogênicas em *TP53* presentes na nossa população.

Uma outra contribuição importante do trabalho foi mostrar a taxa de detecção de variantes de *TP53* e o seu tipo entre probandos que tenham critérios de Chompret revisados (2015), uma informação que se tinha disponível apenas a partir de estudos menores anteriores. A utilização desses critérios na clínica é de grande utilidade, permitindo identificar pacientes e familiares com alto risco para desenvolvimento de vários tipos de tumores em idade precoce. Em nosso estudo, que analisa uma população que tem origem predominantemente europeia, apesar de encontramos uma taxa de detecção de variante semelhante à já descrita em outros estudos Europeus, encontramos uma frequência mais alta da variante

R337H, conforme esperado (Bougeard et al., 2015; Paskulin et al., 2015).

Em comparação com estudo Brasileiro previamente realizado, a taxa de detecção encontrada aqui foi menor. Isso poderia ser explicado, em parte, ao fato de que usamos apenas os critérios de Chompret para recrutamento de probandos, quando o estudo anterior usou também outros critérios. Ademais, especulamos que possam existir um conjunto de variantes funcionais e potencialmente patogênicas ainda não mapeadas que estejam localizadas em regiões intrônicas ou regulatórias (5'UTR e 3'UTR) de *TP53*, ou ainda alterações epigenéticas (hipermetilação de regiões promotoras) associadas ao gene *TP53* que tenham um papel funcional e que sejam de fato as alterações moleculares causais. O estudo complementar e busca por essas variantes é fundamental para tentar explicar o fenótipo clínico sugestivo de LFS observado na grande parcela restante (85.4%) de pacientes Chompret na qual não encontramos uma variante patogênica. Uma evidência prévia da importância de estudar regiões intrônicas de *TP53* é a descrição de splicing alternativo criando exons adicionais que podem ter variantes de sequência potencialmente funcionais. A região do íntron 9 de *TP53* pode sofrer splicing alternativo e assim serem criados dois éxons alternativos (éxons 9 β e 9 γ), cada um codificando uma isoforma diferente de p53 (p53 β e p53 γ) com atividades transcricionais diferentes daquelas observadas na proteína completa (Surget et al., 2013). As sequências correspondentes a esses éxons alternativos tem sido excluídas da maioria dos estudos que utilizam sequenciamento de Sanger e mesmo NGS para avaliar a variabilidade genética no gene *TP53*. No entanto, quando essas regiões são consideradas e analisadas em novos protocolos de NGS são observadas variantes nesses éxons alternativos e em sítios adjacentes com significado clínico desconhecido mas potencialmente patogênicas (revisado em (Leroy et al., 2017). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também contribuiu para identificação de variantes potencialmente funcionais em regiões regulatórias, descrevendo evidências preliminares da associação da variante rs78378222 (3'UTR de *TP53*) com o fenótipo da LFS. No estudo do nosso grupo, essa variante foi detectada em uma alta frequência em pacientes com fenótipo clínico da síndrome e sem VP identificadas em regiões codificadoras do gene. Essa é uma variante funcional rara que muda a sequência do sinal de poliadenilação de *TP53*,

ocasionando redução nos níveis do transcrito e conseqüentemente da proteína p53 (Macedo et al., 2016). Sendo assim, mais estudos avaliando essas regiões gênicas não-codificantes de *TP53* em coortes maiores de pacientes LFS são necessários para confirmar a hipótese de que elas poderiam explicar uma parcela da “herdabilidade perdida” relacionada à síndrome.

O objetivo da segunda parte desta tese (objetivos 3 e 4) consistiu em utilizar diferentes metodologias baseadas em bancos de dados e ferramentas computacionais para reanalisar o potencial patogênico de VUS em *TP53* encontradas em testes genéticos realizados em contextos clínicos que nem sempre tinham a LFS como objetivo central de investigação. Através dessa estratégia, foi possível demonstrar a importância da reinterpretação detalhada acerca da patogenicidade de VUS anteriormente reportadas, a fim de definir a estratégia mais adequada de aconselhamento genético e de indicação de manejo para o paciente e seus familiares. De fato, um dos maiores desafios atuais do diagnóstico molecular é o impacto clínico (monitoramento e manejo terapêutico) decorrente de uma interpretação equivocada da patogenicidade de variantes genéticas, especialmente em relação às VUS, as quais potencialmente causam ansiedade e outras conseqüências psicológicas para os pacientes portadores, bem como são importantes fatores de confusão para o médico geneticista. Esses aspectos justificam a necessidade de uma reavaliação das VUS com certa periodicidade, a medida que novos estudos funcionais e dados clínicos são disponibilizados na literatura. Em um estudo recente, um grande conjunto de VUS detectadas em genes associados com síndromes de câncer hereditário foram reanalisadas de maneira retrospectiva, a partir da compilação de resultados de 1.103 testes genéticos solicitados nesse contexto clínico (Macklin et al., 2018). Curiosamente, a maioria das VUS foram reclassificadas como variantes provavelmente benignas, sendo discutida a importância da comunicação entre os profissionais de laboratório, especialmente os biólogos moleculares, e os clínicos. Nesse contexto, os dados resultantes do nosso estudo de VUS exemplificam como essa problemática poderia ser encarada na prática clínica especificamente em relação ao gene *TP53* e os casos de LFS. De maneira similar aos achados de Macklin e colaboradores (2018), uma parcela importante das VUS em *TP53* aqui reportadas tiveram uma nova

classificação sugerida como variantes provavelmente benignas ou benignas (5/12, 41,7%).

Discutimos a escolha do sistema de classificação de variantes pelos profissionais que realizam aconselhamento genético, destacando que o ACMG (2015) (Richards et al., 2015) utiliza 28 critérios para interpretação das variantes, enquanto o Sherloc (2017) (Nykamp et al., 2017) se baseia em um refinamento desses critérios, utilizando 108 descrições detalhadas de tipos de evidência acerca do potencial patogênico e benigno, sendo um sistema de classificação em que resultados de estudos funcionais se sobrepõem aos achados dos preditores, se tornando em um sistema mais conservador do que a ACMG, porém mais detalhado e transparente.

Conclusões de acordo com os objetivos específicos:

- 1) Caracterizamos as principais manifestações clínicas observadas em pacientes que preenchem critérios clínicos de Chompret (2015). Encontramos uma diferença clínica entre os pacientes com VP consideradas clássica e os pacientes com a VP R337H.
- 2) Determinamos a prevalência de variantes patogênicas germinativas localizadas nas regiões codificantes (éxons 2-11) do gene *TP53* nesses pacientes como sendo 13,6%.
- 3) Determinamos a frequência de variantes de significado incerto (VUS) no gene *TP53* identificadas em pacientes não-selecionados por suspeita clínica de LFS como sendo 0,65%.
- 4) Caracterizamos as VUS identificadas, contribuindo para melhor definir sua patogenicidade e o seguimento mais adequado para cada família portadora.

Como maior contribuição desta tese, destaco a disponibilização do teste genético com aconselhamento genético especializado a pacientes do SUS e a atualização do perfil clínico e molecular dos pacientes com critérios de Chompret para LFS na região sul do Brasil. Contribuímos para que um número expressivo de famílias tivessem oportunidade de receber resultados do teste molecular e aconselhamento genético apropriado, auxiliando no manejo e seguimento mais próximos do ideal mesmo em um cenário de muitas limitações, que é o da saúde pública brasileira. Além disso, ao demonstrarmos que a idade média dos portadores

da VP R337H é significativamente menor do que os portadores das mutações clássicas, reforçamos que o perfil fenotípico dos pacientes apresenta particularidades as quais poderão ser até mesmo regionais, e que é preciso analisar cuidadosamente a penetrância dessa variante em diferentes regiões brasileiras.

Os resultados deste trabalho trazem uma importante contribuição ao panorama da LFS no Brasil. No entanto, muitas questões ainda permanecem sem resposta, e abrem perspectivas para novas linhas de investigação. Entre as possibilidades, destacamos:

- a) Criação de uma base de dados de abrangência nacional, destinada à compilação de informações sobre variantes germinativas no gene *TP53*, facilitando a identificação de variantes recorrentes e a correlação genótipo-fenótipo;
- b) Desenvolvimento de uma estratégia multidisciplinar de diagnóstico e seguimento de pacientes com LFS;
- c) Elaboração de um protocolo laboratorial sistemático para elucidação da patogenicidade das VUS, incluindo abordagens *in silico* e ensaios funcionais (*in vivo* e *in vitro*);
- d) Análise molecular (painel NGS) das regiões intrônicas e regulatórias (UTRs) do gene *TP53* nas amostras dos 165 probandos que preenchem critérios de Chompret revisados em 2015 que foram negativos para a presença de VP nas regiões codificantes (**Artigo 1**), visando a identificação de variantes possivelmente causais explicando o fenótipo clínico desse grupo de pacientes;
- e) Avaliação dos níveis de metilação global (metiloma) em amostras de DNA genômico do mesmo grupo de casos especificado na perspectiva anterior (coorte de probandos que preenchem os critérios revisados de Chompret sem VP identificadas nas regiões codificantes de *TP53*), utilizando um

delineamento experimental análogo àquele descrito no estudo conduzido por Samuel e colaboradores (2016) (Samuel *et al.*, 2016).

- Achatz, M. I. W., Olivier, M., Calvez, F. Le, Martel-Planche, G., Lopes, A., Rossi, B. M., ... Hainaut, P. (2007). The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.12.039>
- Achatz, M. I., & Zambetti, G. P. (2016). The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026195>
- Allison Kurian. (2017). Breast and Ovarian Cancer Penetrance Estimates Derived From Germline Multiple-Gene Sequencing Results in Women. *JCO*.
- Amadou, et al. (2017). Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Current Opinion in Oncology*. <https://doi.org/10.1097/CCO.0000000000000423>
- Andrade, Kelvin C, Santiago, K. M., Fortes, F. P., Mambelli, L. I., Nóbrega, A. F., & Achatz, M. I. (2014). *Early-onset breast cancer patients in the South and Southeast of Brazil should be tested for the TP53 p.R337H mutation*. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2014-0343>
- Andrade, R. C., dos Santos, A. C. E., de Aguirre Neto, J. C., Nevado, J., Lapunzina, P., & Vargas, F. R. (2017). TP53 and CDKN1A mutation analysis in families with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni like syndromes. *Familial Cancer*, 16(2), 243–248. <https://doi.org/10.1007/s10689-016-9935-z>
- Anupindi, S. A., Bedoya, M. A., Lindell, R. B., Rambhatla, S. J., Zelle, K., Nichols, K. E., & Chauvin, N. A. (2015). Diagnostic performance of whole-body MRI as a tool for cancer screening in children with genetic cancer-predisposing conditions. *American Journal of Roentgenology*, 205(2), 400–408. <https://doi.org/10.2214/AJR.14.13663>
- Asdahl, P. H., Ojha, R. P., & Hasle, H. (2017, December 1). Cancer Screening in Li-Fraumeni Syndrome. *JAMA Oncology*, Vol. 3, pp. 1645–1646.

- <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.2459>
- Assumpção, J. G., Seidinger, A. L., Mastellaro, M. J., Ribeiro, R. C., Zambetti, G. P., Ganti, R., ... Yunes, J. A. (2008). Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer*, 8(8).
<https://doi.org/10.1186/1471-2407-8-357>
- Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016, May 1). Tumor-suppressor functions of the TP53 pathway. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, Vol. 6. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026062>
- Ballinger, M. L., Best, A., Mai, P. L., Khincha, P. P., Loud, J. T., Peters, J. A., ... Savage, S. A. (2017). Baseline Surveillance in Li-Fraumeni Syndrome Using Whole-Body Magnetic Resonance Imaging. *JAMA Oncology*, 3(12), 1634.
<https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2017.1968>
- Birch, J. M., Hartley, A. L., Tricker, K. J., Prosser, J., Condie, A., Kelsey, A. M., ... Crowther, D. (1994). Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Research*, 54(5), 1298–1304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8118819>
- Bond, G. L., & Levine, A. J. (2007, February 26). A single nucleotide polymorphism in the p53 pathway interacts with gender, environmental stresses and tumor genetics to influence cancer in humans. *Oncogene*, Vol. 26, pp. 1317–1323. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210199>
- Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Tournier, I., Vasseur, S., Martin, C., Brugieres, L., ... Frebourg, T. (2006). Impact of the MDM2 SNP309 and p53 Arg72Pro polymorphism on age of tumour onset in Li-Fraumeni syndrome. *Journal of Medical Genetics*, 43(6), 531–533.
<https://doi.org/10.1136/jmg.2005.037952>
- Bougeard, G., Sesboüé, R., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Tinat, J., ... Noguès, C. (2008). Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: An update from the French LFS families. *Journal of Medical Genetics*, 45(8), 535–538. <https://doi.org/10.1136/jmg.2008.057570>
- Bougeard, Gaëlle, Brugières, L., Chompret, A., Gesta, P., Charbonnier, F., Valent, A., ... Frébourg, T. (2003). Screening for TP53 rearrangements in families with the Li-Fraumeni syndrome reveals a complete deletion of the TP53 gene.

- Oncogene*, 22(6), 840–846. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206155>
- Bougeard, Gaëlle, Renaux-Petel, M., Flaman, J. M., Charbonnier, C., Fermey, P., Belotti, M., ... Frebourg, T. (2015). Revisiting Li-Fraumeni syndrome from TP53 mutation carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 33(21), 2345–2352. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.59.5728>
- Buyss, S. S., Sandbach, J. F., Gammon, A., Patel, G., Kidd, J., Brown, K. L., ... Daly, M. B. (2017). A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.30498>
- Caminha et al. (2015). *Prevalence of germline TP53 p.R337H mutation at metropolitan area of Campinas and surrounding cities*. Retrieved from <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/316893>
- Carvalho, M. A., Couch, F. J., & Monteiro, A. N. A. (2007). Functional assays for BRCA1 and BRCA2. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, Vol. 39, pp. 298–310. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.08.002>
- Chompret et al. (2001). Criteria for P53 Germline Mutation. *J Med Genet*, 38, 43–47.
- Cipriano, N. M., de Brito, A. M., de Oliveira, E. S., de Faria, F. C., Lemos, S., Rodrigues, A. N., ... dos Santos, L. L. (2019). Mutation screening of TP53, CHEK2 and BRCA genes in patients at high risk for hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) in Brazil. *Breast Cancer*, 26(3), 397–405. <https://doi.org/10.1007/s12282-018-00938-z>
- Cury, N. M., Ferraz, V. E., & Silva Jr, W. A. (2014). TP53 p.R337H prevalence in a series of Brazilian hereditary breast cancer families. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 12, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-12-8>
- Custodio, G., Parise, G. A., Filho, N. K., Komechen, H., Sabbaga, C. C., Rosati, R., ... Figueiredo, B. C. (2013). Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Oncology*, 31(20), 2619–2626. <https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711>
- Da Silva, E. M., Achatz, M. I. W., Martel-Planche, G., Montagnini, A. L., Olivier, M., Prolla, P. A., ... Soares, F. A. (2011). TP53 mutation p.R337H in gastric

- cancer tissues of a 12-year-old male child - evidence for chimerism involving a common mutant founder haplotype: case report. *BMC Cancer*, 11, 449. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-11-449>
- de Andrade, Kelvin C., Frone, M. N., Wegman-Ostrosky, T., Khincha, P. P., Kim, J., Amadou, A., ... Achatz, M. I. (2019). Variable population prevalence estimates of germline TP53 variants: A gnomAD-based analysis. *Human Mutation*, 40(1), 97–105. <https://doi.org/10.1002/humu.23673>
- de Andrade, Kelvin César, Mirabello, L., Stewart, D. R., Karlins, E., Koster, R., Wang, M., ... Achatz, M. I. (2017). Higher-than-expected population prevalence of potentially pathogenic germline TP53 variants in individuals unselected for cancer history. *Human Mutation*, 38(12), 1723–1730. <https://doi.org/10.1002/humu.23320>
- de la Chapelle, A; Petomäki, P. (1998). The genetics of hereditary common cancers. *Curr Opin Genet Dev*, 8, 298–303.
- DiGiammarino, E. L., Lee, A. S., Cadwell, C., Zhang, W., Bothner, B., Ribeiro, R. C., ... Kriwacki, R. W. (2002). A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nature Structural Biology*, 9(1), 12–16. <https://doi.org/10.1038/nsb730>
- Dumont, P; Leu, JI; Della Pietra, AC; George, DL; Murphy, M. (2003). The codon 72 polymorphic variants of p53 have markedly different apoptotic potential. *Nat Genet*, 33, 357–365.
- Eeles, R. (1995). Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.*, 25.
- Felix, G. E., Abe-Sandes, C., Machado-Lopes, T. M., Bomfim, T. F., Santa, R., Guindalini, C., ... Abe-Sandes, K. (2014). Germline mutations in BRCA1, BRCA2, CHEK2 and TP53 in patients at high-risk for HBOC: characterizing a Northeast Brazilian Population. *Human Genome Variation*, 112. <https://doi.org/10.1038/hgv.2014.12>
- Ferreira, CG; Rocha, J. (2010). *Oncologia Molecular*. editora Atheneu.
- Ferreira, A. M., Brondani, V. B., Helena, V. P., Charchar, H. L. S., Zerbini, M. C. N., Leite, L. A. S., ... Fragoso, M. C. B. V. (2019). Clinical spectrum of Li-Fraumeni syndrome/Li-Fraumeni-like syndrome in Brazilian individuals with the TP53 p.R337H mutation. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular*

- Biology*, 190, 250–255. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.04.011>
- Formiga, N., César de Andrade, K., Paulo Kowalski, L., & Isabel Achatz, M. (2017). *Frequency of Thyroid Carcinoma in Brazilian TP53 p.R337H Carriers With Li Fraumeni Syndrome*. <https://doi.org/10.1001/jamaoncol.2016.6389>
- Fortuno, C., Pesaran, T., Dolinsky, J., Yussuf, A., McGoldrick, K., Kho, P. F., ... Spurdle, A. B. (2019). p53 major hotspot variants are associated with poorer prognostic features in hereditary cancer patients. *Cancer Genetics*, 235–236, 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2019.05.002>
- Frebourg, T., Barbier, N., Yan, Y.-X., Garber, J. E., Dreyfus, M., Fraumeni, J., ... Friend, S. H. (1995). Germ-Line p53 Mutations in 15 Families with Li-Fraumeni Syndrome. In *Am. J. Hum. Genet* (Vol. 56).
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E. I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Calvez-Kelm, F. Le, ... Achatz, M. I. W. (2010). Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: Evidence for a founder effect. *Human Mutation*. <https://doi.org/10.1002/humu.21151>
- Gemignani, F., Moreno, V., Landi, S., Moullan, N., Chabrier, A., Gutiérrez-Enríquez, S., ... Canzian, F. (2004). A TP53 polymorphism is associated with increased risk of colorectal cancer and with reduced levels of TP53 mRNA. *Oncogene*, 23(10), 1954–1956. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1207305>
- Giacomazzi, J., Koehler-Santos, P., Palmero, E. I., Graudenz, M. S., Rivero, L. F., Lima, E., ... Ashton-Prolla, P. (2013). A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. *Virchows Archiv*. <https://doi.org/10.1007/s00428-013-1439-8>
- Giacomazzi, J., Selistre, S. G., Rossi, C., Alemar, B., Santos-Silva, P., Pereira, F. S., ... Ashton-Prolla, P. (2013). Li-Fraumeni and Li-Fraumeni - Like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.28346>
- Gomes, M. C., Kotsopoulos, J., Leão De Almeida, G., Costa, M. M., Vieira, R., De, F., ... Narod, S. A. (2012). The R337H mutation in TP53 and breast cancer in Brazil. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, 10, 3. <https://doi.org/10.1186/1897-4287-10-3>

- Gonzalez, K. D., Noltner, K. A., Buzin, C. H., Gu, D., Wen-Fong, C. Y., Nguyen, V. Q., ... Weitzel, J. N. (2009). Beyond li fraumeni syndrome: Clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8), 1250–1256. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.16.6959>
- Guha, T., & Malkin, D. (2017). Inherited TP53 mutations and the Li-fraumeni syndrome. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 7(4). <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a026187>
- Hahn, E. C., Bittar, C. M., Vianna, F. S. L., Netto, C. B. O., Biazús, J. V., Cericatto, R., ... Ashton-Prolla, P. (2018). TP53 p.Arg337His germline mutation prevalence in Southern Brazil: Further evidence for mutation testing in young breast cancer patients. *PLoS ONE*, 13(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0209934>
- Hainaut. (2002). Tumor-specific mutations in p53: the acid test. *Nature Medicine*.
- Hall, M. J., Reid, J. E., Burbidge, L. A., Pruss, D., Deffenbaugh, A. M., Frye, C., ... Noll, W. W. (2009). BRCA1 and BRCA2 mutations in women of different ethnicities undergoing testing for hereditary breast-ovarian cancer. *Cancer*, 115(10), 2222–2233. <https://doi.org/10.1002/cncr.24200>
- Heymann, S., Delalogue, S., Rahal, A., Caron, O., Frebourg, T., Barreau, L., ... Bourgier, C. (2010). Radio-induced malignancies after breast cancer postoperative radiotherapy in patients with Li-Fraumeni syndrome. *Radiation Oncology*, 5(1). <https://doi.org/10.1186/1748-717X-5-104>
- Hodgson, S. (2008). Mechanisms of inherited cancer susceptibility. *Journal of Zhejiang University SCIENCE B*, 9(1), 1–4. <https://doi.org/10.1631/jzus.b073001>
- Id Said, B., & Malkin, D. (2015). A functional variant in miR-605 modifies the age of onset in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics*, 208(1–2), 47–51. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.12.003>
- Kamihara, J., Rana, H. Q., & Garber, J. E. (2014). Germline TP53 mutations and the changing landscape of Li-Fraumeni syndrome. *Human Mutation*, Vol. 35. <https://doi.org/10.1002/humu.22559>
- Kato, S., Han, S.-Y., Liu, W., Otsuka, K., Shibata, H., Kanamaru, R., & Ishioka, C. (2003). Understanding the function–structure and function–mutation

- relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8424–8429. <https://doi.org/10.1073/pnas.1431692100>
- Kitayner, M., Rozenberg, H., Kessler, N., Rabinovich, D., Shaulov, L., Haran, T. E., & Shakked, Z. (2006). Structural Basis of DNA Recognition by p53 Tetramers. *Molecular Cell*, 22(6), 741–753. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.05.015>
- Kratz, C. P., Achatz, M. I., Brugieres, L., Frebourg, T., Garber, J. E., Greer, M. L. C., ... Malkin, D. (2017). Cancer screening recommendations for individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Clinical Cancer Research*, 23(11), e38–e45. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-17-0408>
- Laloo, F., Varley, J., Ellis, D., Moran, A., O'Dair, L., Pharoah, P., ... Mathew, C. (2003). Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. *Lancet*, 361(9363), 1101–1102. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)12856-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)12856-5)
- Latronico, A. C., Pinto, E. M., Domenice, S., Candida Barisson, M., Fragoso, V., Matsunaga Martin, R., ... Mendonca, B. B. (2001). An Inherited Mutation Outside the Highly Conserved DNA-Binding Domain of the p53 Tumor Suppressor Protein in Children and Adults with Sporadic Adrenocortical Tumors. In *J Clin Endocrinol Metab* (Vol. 86).
- Leroy, B., Ballinger, M. L., Baran-Marszak, F., Bond, G. L., Braithwaite, A., Concin, N., ... Soussi, T. (2017). Recommended guidelines for validation, quality control, and reporting of TP53 variants in clinical practice. *Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2179>
- Li, F. P., & Fraumeni, J. F. (1969). Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Annals of Internal Medicine*, 71(4), 747–752. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5360287>
- Lincoln, S. E., Kobayashi, Y., Anderson, M. J., Yang, S., Desmond, A. J., Mills, M. A., ... Ellisen, L. W. (2015). A systematic comparison of traditional and multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer genes in more than 1000 patients. *Journal of Molecular Diagnostics*, 17(5), 533–544. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2015.04.009>

- Macedo, G. S., Araujo Vieira, I., Brandalize, A. P., Giacomazzi, J., Inez Palmero, E., Volc, S., ... Ashton-Prolla, P. (2016). Rare germline variant (rs78378222) in the TP53 3' UTR: Evidence for a new mechanism of cancer predisposition in Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genetics*, 209(3), 97–106. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.12.012>
- Macedo, G. S., Vieira, I. A., Vianna, F. S. L., Alemar, B., Giacomazzi, J., Brandalize, A. P. C., ... Ashton-Prolla, P. (2018). p53 signaling pathway polymorphisms, cancer risk and tumor phenotype in TP53 R337H mutation carriers. *Familial Cancer*, 17(2), 269–274. <https://doi.org/10.1007/s10689-017-0028-4>
- Macklin, S., Durand, N., Atwal, P., & Hines, S. (2018). Observed frequency and challenges of variant reclassification in a hereditary cancer clinic. *Genetics in Medicine*, 20(3), 346–350. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.207>
- Mai, P. L., Best, A. F., Peters, J. A., DeCastro, R. M., Khincha, P. P., Loud, J. T., ... Savage, S. A. (2016). Risks of first and subsequent cancers among TP53 mutation carriers in the National Cancer Institute Li-Fraumeni syndrome cohort. *Cancer*, 122(23), 3673–3681. <https://doi.org/10.1002/cncr.30248>
- Malkin, D. et al. (1990). Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and Other Neoplasms. *Science*.
- Marcel, V., Palmero, E. I., Falagan-Lotsch, P., Martel-Planche, G., Ashton-Prolla, P., Olivier, M., ... Achatz, M. I. (2009). TP53 PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.066704>
- Mastellaro, M. J., Ribeiro, R. C., Oliveira-Filho, A. G., Seidinger, A. L., Cardinali, I. A., Miranda, E. C. M., ... Barros-Filho, A. A. (2018). Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. *Jornal de Pediatria*, 94(4), 432–439. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2017.06.009>
- Mastellaro, M. J., Seidinger, A. L., Kang, G., Abrahão, R., Miranda, E. C. M., Pounds, S. B., ... Ribeiro, R. C. (2017). Contribution of the TP53 R337H mutation to the cancer burden in southern Brazil: Insights from the study of 55 families of children with adrenocortical tumors. *Cancer*, 123(16), 3150–3158.

- <https://doi.org/10.1002/cncr.30703>
- McBride, K. A., Ballinger, M. L., Killick, E., Kirk, J., Tattersall, M. H. N., Eeles, R. A., ... Mitchell, G. (2014). Li-Fraumeni syndrome: Cancer risk assessment and clinical management. *Nature Reviews Clinical Oncology*, *11*(5), 260–271. <https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2014.41>
- Narod, S. A., & Offit, K. (2005). Prevention and management of hereditary breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, Vol. 23, pp. 1656–1663. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.10.035>
- Nykamp, K., Anderson, M., Powers, M., Garcia, J., Herrera, B., Ho, Y. Y., ... Topper, S. (2017). Sherlock: A comprehensive refinement of the ACMG-AMP variant classification criteria. *Genetics in Medicine*, *19*(10), 1105–1117. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.37>
- O'Leary, E., Iacoboni, D., Holle, J., Michalski, S. T., Esplin, E. D., Yang, S., & Ouyang, K. (2017). Expanded Gene Panel Use for Women With Breast Cancer: Identification and Intervention Beyond Breast Cancer Risk. *Annals of Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1245/s10434-017-5963-7>
- Olivier, M., Goldgar, D. E., Sodha, N., Ohgaki, H., Kleihues, P., Hainaut, P., & Eeles, R. A. (2003). Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Research*, *63*(20), 6643–6650. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14583457>
- Olivier, M., Hollstein, M., & Hainaut, P. (2010). TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, Vol. 2.
- Paixão, D., Guimarães, M. D., De Andrade, K. C., Nóbrega, A. F., Chojniak, R., & Achatz, M. I. (2018). Whole-body magnetic resonance imaging of Li-Fraumeni syndrome patients: Observations from a two rounds screening of Brazilian patients. *Cancer Imaging*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s40644-018-0162-8>
- Paskulin, D. D., Giacomazzi, J., Achatz, M. I., Costa, S., Reis, R. M., Hainaut, P., ... Prolla, P. A. (2015). Ancestry of the brazilian TP53 c.1010G>A (p. Arg337His, R337H) Founder mutation: clues from haplotyping of short tandem repeats on chromosome 17p. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143262>

- Petitjean, A., Achatz, M. I. W., Borresen-Dale, A. L., Hainaut, P., & Olivier, M. (2007). TP53 mutations in human cancers: Functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. *Oncogene*, *26*(15), 2157–2165. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210302>
- Pilarski, R., Berry, M. P., Jude, S., Buys, S. S., Friedman, S., Garber, J. E., ... Dwyer, M. (2019). *FORCE: Facing Our Risk of Cancer Empowered NCCN Guidelines Version 3.2019 Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast and Ovarian*.
- Rana, H. Q., Clifford, J., Hoang, L., Laduca, H., Black, M. H., Li, S., ... Garber, J. E. (2019). Genotype-phenotype associations among panel-based TP53+ subjects. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/s41436-019>
- Rana, H. Q., Gelman, R., LaDuca, H., McFarland, R., Dalton, E., Thompson, J., ... Garber, J. E. (2018). Differences in TP53 mutation carrier phenotypes emerge from panel-based testing. *Journal of the National Cancer Institute*, *110*(8), 863–870. <https://doi.org/10.1093/jnci/djy001>
- Rebbeck, T. R., Lynch, H. T., Neuhausen, S. L., Narod, S. A., van't Veer, L., Garber, J. E., ... Weber, B. L. (2002). Prophylactic Oophorectomy in Carriers of BRCA1 or BRCA2 Mutations. *New England Journal of Medicine*, *346*(21), 1616–1622. <https://doi.org/10.1056/nejmoa012158>
- Ribeiro, R. C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G. P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A. R., ... Sandrini, R. (2001). An Inherited p53 Mutation That Contributes in a Tissue-Specific Manner to Pediatric. *Source*, *98*(16), 9330–9335. <https://doi.org/10.1073/pnas>
- Richards, S., Aziz, N., Bale, S., Bick, D., Das, S., Gastier-Foster, J., ... Rehm, H. L. (2015). Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genetics in Medicine*. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Ruijs, M. W. G., Broeks, A., Menko, F. H., Ausems, M. G. E. M., Wagner, A., Oldenburg, R., ... Verhoef, S. (2009). The contribution of CHEK2 to the TP53-negative Li-Fraumeni phenotype. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*, *7*(1). <https://doi.org/10.1186/1897-4287-7-4>

- Ruijs, M. W. G., Verhoef, S., Rookus, M. A., Pruntel, R., Van Der Hout, A. H., Hogervorst, F. B. L., ... Van 'T Veer, L. J. (2010). TP53 germline mutation testing in 180 families suspected of Li-Fraumeni syndrome: Mutation detection rate and relative frequency of cancers in different familial phenotypes. *Journal of Medical Genetics*. <https://doi.org/10.1136/jmg.2009.073429>
- Sagne, C., Marcel, V., Bota, M., Martel-Planche, G., Nobrega, A., Palmero, E. I., ... Achatz, M. I. (2014). Age at cancer onset in germline TP53 mutation carriers: Association with polymorphisms in predicted G-quadruplex structures. *Carcinogenesis*, 35(4), 807–815. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgt381>
- Samuel, N., Wilson, G., Lemire, M., Said, B. I., Lou, Y., Li, W., ... Malkin, D. (2016). Genome-wide DNA methylation analysis reveals epigenetic dysregulation of MicroRNA-34A in TP53-associated cancer susceptibility. *Journal of Clinical Oncology*, 34(30), 3697–3704. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.67.6940>
- Schayek, H., De Marco, L., Starinsky-Elbaz, S., Rossette, M., Laitman, Y., Bastos-Rodrigues, L., ... Friedman, E. (2016). The rate of recurrent BRCA1, BRCA2, and TP53 mutations in the general population, and unselected ovarian cancer cases, in Belo Horizonte, Brazil. *Cancer Genetics*. <https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2015.11.003>
- Schneider, K., Zelle, K., & Nichols, K. E. (1999). *Li-Fraumeni Syndrome*.
- Silva, A. G., Krepischi, A. C. V., Pearson, P. L., Hainaut, P., Rosenberg, C., & Achatz, M. I. (2014). The profile and contribution of rare germline copy number variants to cancer risk in Li-Fraumeni patients negative for TP53 mutations. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(1). <https://doi.org/10.1186/1750-1172-9-63>
- Slavin, T. P., Niell-Swiler, M., Solomon, I., Nehoray, B., Rybak, C., Blazer, K. R., & Weitzel, J. N. (2015). Corrigendum: Clinical Application of Multigene Panels: Challenges of Next-Generation Counseling and Cancer Risk Management. *Frontiers in Oncology*, 5. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00271>
- Southey, M. C., Park, D. J., Nguyen-Dumont, T., Campbell, I., Thompson, E.,

- Trainer, A. H., ... Goldgar, D. E. (2013, June 21). COMPLEXO: Identifying the missing heritability of breast cancer via next generation collaboration. *Breast Cancer Research*, Vol. 15. <https://doi.org/10.1186/bcr3434>
- Surget, S., Khoury, M. P., & Bourdon, J. C. (2013, December 19). Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: A clinical perspective. *OncoTargets and Therapy*, Vol. 7, pp. 57–67. <https://doi.org/10.2147/OTT.S53876>
- Tinat, J., Bougeard, G., Baert-Desurmont, S., Vasseur, S., Martin, C., Bouvignies, E., ... Frébourg, T. (2009). 2009 Version of the Chompret Criteria for Li Fraumeni Syndrome. *Journal of Clinical Oncology*, 27(26), 108–109. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.7967>
- Tucker, T., & Friedman JM. (2002). Pathogenesis of hereditary tumors: beyond the “two-hit” hypothesis. *Clinical Genetics*, 62, 345–347.
- Varley, J. M., McGown, G., Thorncroft, M., James, L. A., Margison, G. P., Forster, G., ... Birch, J. M. (1999). Are There Low-Penetrance TP53 Alleles? Evidence from Childhood Adrenocortical Tumors. *The American Journal of Human Genetics*, 65(4), 995–1006. <https://doi.org/10.1086/302575>
- Villani, A., Shore, A., Wasserman, J. D., Stephens, D., Kim, R. H., Druker, H., ... Malkin, D. (2016). Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11 year follow-up of a prospective observational study. *The Lancet Oncology*, 17(9), 1295–1305. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30249-2](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30249-2)
- Villani, A., Tabori, U., Schiff, J., Shlien, A., Beyene, J., Druker, H., ... Finlay, J. (2011). Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. *Www.TheLancet.Com/Oncology*, 12, 559–567. <https://doi.org/10.1016/S1470>
- Vousden, K. H., & Lane, D. P. (2007, April 7). p53 in health and disease. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, Vol. 8, pp. 275–283. <https://doi.org/10.1038/nrm2147>
- Weitzel, J. N., Blazer, K. R., MacDonald, D. J., Culver, J. O., & Offit, K. (2011). Genetics, genomics, and cancer risk assessment. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.3322/caac.20128>

- Weitzel, J. N., Chao, E. C., Nehoray, B., Van Tongeren, L. R., LaDuca, H., Blazer, K. R., ... Jaspersen, K. (2018). Somatic TP53 variants frequently confound germ-line testing results. *Genetics in Medicine, 20*(8), 809–816. <https://doi.org/10.1038/gim.2017.196>
- Zerdoumi, Y., Aury-Landas, J., Bonaïti-Pellié, C., Derambure, C., Sesboüé, R., Renaux-Petel, M., ... Flaman, J. M. (2013). Drastic Effect of Germline TP53 Missense Mutations in Li-Fraumeni Patients. *Human Mutation, 34*(3), 453–461. <https://doi.org/10.1002/humu.22254>
- Zerdoumi, Y., Lanos, R., Raad, S., Flaman, J. M., Bougeard, G., Frebourg, T., & Tournier, I. (2017). Germline TP53 mutations result into a constitutive defect of p53 DNA binding and transcriptional response to DNA damage. *Human Molecular Genetics, 26*(14), 2591–2602. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx106>
- Zilfou, J. T., & Lowe, S. W. (2009). Tumor suppressive functions of p53. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, Vol. 1*.

Capítulo IX – Produção Científica Adicional no Período:

1) Análise de penetrância da VP R337H e criação de banco de portadores nacional:

O conhecimento acerca da penetrância e contribuição da VP R337H na LFS no Brasil é essencial para auxiliar na definição de medidas de rastreamento e detecção precoce de câncer nestes indivíduos e para as análises de custo-efetividade destas, incluindo a avaliação da factibilidade de incluir rastreamento molecular desta variante específica na triagem neonatal ao nível nacional. Pensando em contribuir para essa gigante tarefa e iniciar a coleta de dados que poderá viabilizar estas ações, propusemos um banco de dados abrangente de pacientes com a VP R337H e seus familiares. Até o momento, foram incluídas 96 famílias do HCPA e do Hospital do câncer de Barretos totalizando 3052 indivíduos tabulados e 402 pacientes testados, sendo que 57,5% das famílias preenchem os critérios de Chompret. Idealmente, essa base de dados poderia ser utilizada para inclusão de probandos adicionais, com a participação de um número maior de centros recrutadores, em todas as regiões do país. A expansão do número de indivíduos incluídos seria particularmente importante para as análises de penetrância, baseadas em heredogramas, e para verificar se há diferenças nos perfis clínico e molecular nas diferentes regiões do Brasil. Esta base de dados poderia ser utilizada como ferramenta para construção de uma base de dados nacional, organizada pela Rede Brasileira de Câncer Hereditário.

2) Artigos publicados em colaboração com outros centros e pesquisadores no período do doutoramento:

PLoS One. 2018 Dec 31;13(12):e0209934. doi: 10.1371/ journal.pone.0209934. eCollection 2018. **TP53 p.Arg337His germline mutation prevalence in Southern Brazil: Further evidence for mutation testing in young breast cancer patients.**

Hahn EC, **Bittar CM**, Vianna FSL, Netto CBO, Biazús JV, Cericatto R, Cavalheiro JA, de Melo MP, Menke CH, Rabin E, Leistner-Segal S, Ashton-Prolla P.

Cancer Genet. 2018 Dec;228-229:93-97. doi:10.1016/j.cancergen.2018.09.001. Epub 2018 Oct 6. **Screening and characterization of BRCA2 c.156_157insAlu in Brazil: Results from 1380 individuals from the South and Southeast.**

Felicio PS, Alemar B, Coelho AS, Berardinelli GN, Melendez ME, Lengert AVH, Miche Lli RD, Reis RM, Fernandes GC, Ewald IP, **Bittar CM**, Netto CBO, Artigalas O, Peixoto A, Pinheiro M, Teixeira MR, Vargas FR, Dos Santos ACE, Moreira MAM, Ashton-Prolla P, Palmero EI.

Sci Rep. 2018 Jun 15;8(1):9188. doi: 10.1038/s41598-018-27315-2. **The germline mutational landscape of BRCA1 and BRCA2 in Brazil.**

Palmero EI, Carraro DM, Alemar B, Moreira MAM, Ribeiro-Dos-Santos Â, Abe-Sandes K, Galvão HCR, Reis RM, de Pádua Souza C, Campacci N, Achatz MI, Brianese RC, da Cruz Formiga MN, Makdissi FB, Vargas FR, Evangelista Dos Santos AC, Seuanez HN, Lobo de Souza KR, Netto CBO, Santos-Silva P, da Silva GS, Burbano RMR, Santos S, Assumpção PP, Bernardes IMM, Machado-Lopes TMB, Bomfim TF, Toralles MBP, Nascimento I, Garicochea B, Simon SD, Noronha S, de Lima FT, Chami AM, **Bittar CM**, Bines J, Artigalas O, Esteves-Diz MDP, Lajus TBP, Gifoni ACLVC, Guindalini RSC, Cintra TS, Schwartz IVD4., Bernardi P, Miguel D, Nogueira STDS, Herzog J, Weitzel JN, Ashton-Prolla P

Cancer Genet. 2016 Sep;209(9):417-422. doi: 10.1016/j.cancergen.2016.06.008. Epub 2016 Jun 20. **Prevalence of Hispanic BRCA1 and BRCA2 mutations among hereditary breast and ovarian cancer patients from Brazil reveals differences among Latin American populations.**

Aleamar B, Herzog J, Brinckmann Oliveira Netto , Artigalás O, Schwartz IVD, **Matzenbacher Bittar C**, Ashton-Prolla P, Weitzel JN.

PLoS One. 2018 May 11;13(5):e0197529. doi: 10.1371/journal.pone.0197529. eCollection 2018. This corrects the article DOI: 10.1371/journal.pone.0187630. **BRCA1 and BRCA2 mutational profile and prevalence in hereditary breast and ovarian cancer (HBOC) probands from Southern Brazil: Are international testing criteria appropriate for this specific population?**

Aleamar B, Gregório C, Herzog J, **Matzenbacher Bittar C**, Brinckmann Oliveira Netto C, Artigalás O, Schwartz IVD, Coffa J, Alves Camey S, Weitzel J, Ashton-Prolla P.

UFRGS - HOSPITAL DE
CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE
DA UNIVERSIDADE FEDERAL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

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

Pesquisador: PATRICIA ASHTON PROLLA

Área Temática: Genética Humana:

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

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

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

Versão: 6

CAAE: 20167913.6.2001.5327

Instituição Proponente: Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Patrocinador Principal: Bedside-to-Bench Program

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.454.318

Apresentação do Projeto:

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer autossômica dominante altamente penetrante, e associada a um grande espectro de tipos tumorais que ocorrem em uma idade muito mais precoce do que o esperado na população geral. Apesar deste conhecimento, rastreamento e tratamento ideais não estão inteiramente determinados e o nosso entendimento acerca dos modificadores genéticos e/ou ambientais dos diferentes tipos de câncer ou da idade ao diagnóstico de câncer na LFS é bastante limitado. Desta maneira, o objetivo principal do estudo é caracterizar clinicamente indivíduos com LFS e LFL, examinando se fatores de risco (exposições ambientais, estado nutricional e atividade física) podem estar associados com a ocorrência de câncer.