



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

ANA LUIZA ONGARO SEIDINGER CONTE

**ESPECTRO TUMORAL E ALTERAÇÕES MOLECULARES
ASSOCIADAS À TUMORIGÊNESE EM PORTADORES DA
MUTAÇÃO *TP53* R337H.**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato (a)
ANA LUIZA ONGARO SEIDINGER CONTE
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título
de Doutor em Genética e Biologia
Molecular, na área de Genética
Animal e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. José Andrés Yunes

Campinas, 2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

C767e

Conte, Ana Luiza Ongaro Seidinger, 1985-
Espectro tumoral e alterações moleculares
associadas à tumorigênese em portadores da mutação
TP53 R337H / Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte. –
Campinas, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: José Andrés Yunes.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Genes p53. 2. Mutação R337H. 3. Neoplasias
do córtex supra-renal. 4. Neoplasias do plexo
coriáceo. 5. Neoplasias da mama. I. Yunes, José
Andrés. II. Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em Inglês: Tumor spectrum and molecular changes associated to tumorigenesis in carriers of TP53 R337H mutation

Palavras-chave em Inglês:

p53 genes

R337H mutation

Adrenal cortex neoplasms

Choroid plexus neoplasms

Breast neoplasms

Área de concentração: Genética Animal e Evolução

Titulação: Doutor em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Andrés Yunes [Orientador]

Carmen Silvia Bertuzzo

Sonir Roberto Rauber Antonini

Marcela de Araújo

Fabio Rossi Torres

Data da defesa: 27-03-2012

Programa de Pós Graduação: Genética e Biologia Molecular

Campinas, 27 de Março de 2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Andrés Yunes (Orientador)



Assinatura

Profa. Dra. Edi Lucia Sartorato

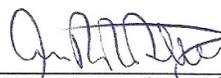
Assinatura

Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo



Assinatura

Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini



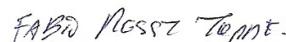
Assinatura

Profa. Dra. Marcela de Araújo



Assinatura

Prof. Dr. Fabio Rossi Torres



Assinatura

Profa. Dra. Maria de Fátima Sonati

Assinatura

Prof. Dr. André Luiz Vettore de Oliveira

Assinatura

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos que têm esperança na cura.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus, que guiou minha vida até aqui.

Agradeço profundamente à minha família, meus pais André e Vera e meu irmão Gustavo por terem sido sempre meu suporte, minha inspiração e terem me apoiado desde sempre nas minhas aspirações.

Agradeço do fundo do meu coração ao Fábio, que me motivou, apoiou, amou e que é mais do que um companheiro de vida, foi meu companheiro de graduação, pós graduação e agora será meu companheiro na mais importante etapa da minha vida.

Agradeço ao Andrés não só pela orientação durante a iniciação científica e no transcorrer deste trabalho, mas também pelas inúmeras oportunidades em que aprendi muito, não só profissional como pessoalmente. Agradeço por ter aberto as portas do laboratório para mim e ter confiado em mim em diversas ocasiões, especialmente na realização do trabalho com a Fernanda.

Agradeço à Dra. Zezé pela prontidão e boa vontade em sempre ajudar, colaborar, discutir e trabalhar junto comigo. Sem seu apoio, a realização deste trabalho não seria possível. Foi um grande prazer contar com sua colaboração e amizade.

Agradeço à Lilian e à Seleny do Laboratório de Citogenética, pois além da amizade, me deram a oportunidade de trabalhar com elas. Agradeço por terem sido tão importantes para a minha formação bem como para a realização desse trabalho.

Agradeço à Juliana por ter me introduzido no estudo dos pacientes com tumor de adrenal e por tudo que me ensinou.

Agradeço a boa vontade e cooperação de todos os pacientes e familiares de pacientes que consentiram em participar deste estudo mesmo quando passavam por momentos tão difíceis.

Agradeço à Fernanda por ter me dado a honra e a oportunidade de ensinar aquilo que eu sabia. Foi muito importante para minha formação e felizmente, resultou em uma amizade mais importante ainda.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Biologia Molecular, que foram tão importantes para mim e para o trabalho. Marcela, Ana Mosca, Amanda, Carlos, Lucas, Cristiane, André, Angelo, Rafael, Mônica, Paty, Pri Zenatti, Carol, Bárbara, Isabel, Pri Mendes, Fer e Carol Arruda, meu muito obrigada por todos os momentos científicos, momentos Márcia e pelas ceias, claro!

Agradeço à área da Oncologia, em especial a Dra. Simone pelas discussões e pelas oportunidades de aprendizado que tive durante estes anos.

Agradeço à equipe de cirurgia em especial ao Dr. Toninho e também a Dra. Izilda da Anatomia Patológica pela imensa colaboração, simpatia e cordialidade.

Agradeço a todos os colegas do Boldrini que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho fosse realizado, em especial a todos do laboratório, principalmente às meninas da recepção e da coleta.

Agradeço à Direção do Centro Infantil Boldrini que consentiu na realização deste estudo.

Agradeço às agências financiadoras CAPES, FAPESP e CNPq pelo auxílio financeiro.

Por fim, mas não menos importante, agradeço a Universidade Estadual de Campinas, que me auxiliou na minha formação como bióloga durante a graduação e agora na pós-graduação.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRACT	3
LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	10
1.0 Revisão Bibliográfica	11
1.1 O câncer	13
1.2 A p53 e o câncer	14
1.3 A mutação R337H do gene <i>TP53</i>	20
1.4 A mutação R337H e o câncer	23
1.5 As isoformas da p53	25
HIPÓTESE DE TRABALHO	27
2.0 Objetivos	29
2.1 Objetivos gerais	31
2.2 Objetivos específicos	31
3.0 Métodos	33
3.1 Sujeitos da pesquisa e aspectos éticos	35
3.2 Análise da presença da mutação <i>TP53</i> -R337H por PCR-RFLP (polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism).....	35
3.3 Nested PCR para análise da presença da mutação R337H	36
3.4 Sequenciamento do exon 10 do gene <i>TP53</i>	37
3.5 Análise da presença da mutação R337H em amostras biológicas pelo método de Real-Time PCR.....	37
3.6 Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) para detecção da expressão de diferentes isoformas da p53.....	38
3.7 Análise do cariótipo dos portadores da <i>TP53</i> -R337H	39
3.8 Hibridização in situ fluorescente (FISH)	40
3.9 Pesquisa da presença do Herpes Vírus Humano – 6 (HHV-6)	42
3.10 Comparative Genomic Hybridization (CGH) Array	42
3.11 Fracionamento das células do sangue periférico	43

3.12 Clonagem do exon 10 do gene <i>TP53</i> em pJET 1.2.....	43
3.13 Isolamento de células individuais para genotipagem do códon 337 do gene <i>TP53</i>	44
3.14 Sequenciamento da região 17p13	45
4.0 Resultados	47
Capítulo 1: Espectro tumoral associado à mutação R337H	49
4.1.1 Association of the highly prevalent <i>TP53</i> R337H mutation with choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil.	51
4.1.2 Expressão das isoformas da p53 e sua associação com a tecido-especificidade da R337H.....	59
Capítulo 2: Alterações genéticas associadas à tumorigênese em portadores da mutação R337H.	63
4.2.1 Sujeitos da pesquisa.....	65
4.2.2 Análise da presença da mutação R337H em pacientes com TCA e seus familiares	65
4.2.3 Análises de cariótipo e FISH do gene <i>TP53</i>	66
4.2.4 Origem das células com deleção do <i>TP53</i> em portadores da R337H.....	75
4.2.5 Alelo perdido com a deleção do <i>TP53</i>	80
4.2.6 Alterações genéticas associadas ao surgimento da deleção do <i>TP53</i>	83
5.0 Discussão	91
6.0 Conclusões	101
7.0 Referências Bibliográficas	105
8.0 Anexos	115
Anexo I	117
Anexo II	119
Anexo III.....	120
Anexo IV.....	122
Anexo V	124

RESUMO

O gene supressor de tumor *TP53* é um dos mais bem caracterizados genes cujo papel na etiologia é conhecido tanto em tumores hereditários como esporádicos. Mutações germinativas neste gene normalmente estão associadas à Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome de predisposição ao câncer cujos portadores apresentam alto risco de desenvolvimento de uma variedade de tumores ao longo da vida. Uma mutação específica deste gene é altamente prevalente na população brasileira, chegando a estar presente em 0.3% da população saudável. Esta mutação, a R337H, não foi descrita como uma mutação associada a um amplo espectro tumoral e, sim, como uma mutação tecido-específica associada somente ao desenvolvimento do tumor do córtex da adrenal (TCA). Entretanto, algumas evidências indicavam que ela poderia contribuir para a etiologia de outros tumores, além do TCA. A R337H foi encontrada em 06 famílias com Síndrome de Li-Fraumeni like e em 2.4% de pacientes diagnosticadas com câncer de mama. Com o objetivo de obter maiores evidências sobre a contribuição da R337H na etiologia de outros tumores além do TCA, investigamos a prevalência desta mutação em 493 pacientes diagnosticados com diferentes tumores pediátricos. Além disto, buscamos investigar alterações cromossômicas que poderiam estar associadas ao processo de tumorigênese em portadores desta mutação. Os resultados mostraram que além do TCA e câncer de mama, a R337H está fortemente associada ao carcinoma de plexo coroide (69%) e ao osteossarcoma (7%) na faixa etária pediátrica. Em nossa instituição, foi observado um aumento da incidência relativa do carcinoma de plexo coroide em relação ao papiloma de plexo coroide. Uma deleção do gene *TP53* em células do sangue periférico sob a forma de um mosaico foi identificada nos pacientes portadores da R337H que desenvolveram o TCA. Os dados mostraram que se trata de uma deleção intersticial do cromossomo 17, a qual especula-se ter ocorrido durante o período embrionário. Os resultados sobre a prevalência desta mutação em diferentes tumores pediátricos poderão contribuir para um adequado aconselhamento genético das famílias em que a R337H está presente. Adicionalmente, o mosaicismo encontrado nos portadores da R337H que desenvolveram o TCA nos permitiu formular uma hipótese sobre a tumorigênese adrenocortical associada à R337H e talvez possa também contribuir para a futura compreensão do comportamento oncogênico desta mutação.

ABSTRACT

The tumor suppressor gene *TP53* is a well characterized gene whose role in the etiology of hereditary and sporadic cancer is well established. Germline mutations in this gene are usually associated with the Li-Fraumeni Syndrome (LFS), a cancer predisposition syndrome in which individuals are at a high risk to develop a wide spectrum of tumors during their lives. A specific mutation of *TP53* gene is highly prevalent among the Brazilian population, reaching 0.3% of healthy individuals. This mutation, R337H, was not described as a mutation associated to a wide spectrum of tumors but as a tissue-specific mutation, predisposing individuals only to adrenocortical tumors (ACT). However, some evidences have indicated that it could contribute to the etiology of other tumors besides ACT. The R337H was found in six families diagnosed with LFS-like and also in 2.4% of patients diagnosed with breast cancer. In order to obtain more evidence regarding the role of R337H in the etiology of tumors besides ACT, we have investigated the prevalence of this mutation among 493 pediatric patients diagnosed with cancer. Moreover, we have looked for chromosomal changes potentially involved in tumorigenic process among R337H carriers. Our results demonstrated that, besides ACT and breast cancer, the R337H mutation is strongly associated to choroid plexus carcinoma (69%) and osteosarcoma (7%) in the pediatric age. At our institution it was observed a raise in the relative incidence of choroid plexus carcinoma to choroid plexus papilloma. It was identified a mosaic of cells presenting *TP53* deletion in peripheral blood of R337H carriers who developed ACT. Our data showed that is an interstitial deletion affecting the short arm of chromosome 17 that may have occurred during the embryonic life. The results regarding the R337H prevalence among different pediatric tumors may potentially contribute to a more accurate genetic counseling of families bearing this mutation. Additionally, the *TP53* deletion found in R337H carriers who developed ACT prompted us to formulate a hypothesis on the adrenocortical tumorigenesis associated to this mutation. Finally, our findings may be useful to better understand the oncogenic behavior of this mutation.

LISTA DE ABREVIATURAS

aCGH - comparative genomic hybridization array

ATM - ataxia telangiectasia mutated

BLAST - Basic Local Alignment Search Tool

BLASTn – nucleotide Basic Local Alignment Search Tool

BRCA – breast cancer gene

CDKN2A - cyclin-dependent kinase inhibitor 2A

cDNA - ácido desoxirribonucleico complementar

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CGH – comparative genomic hybridization

CNV – copy number variations

CO₂ – dióxido de carbon

CPC – carcinoma do plexo coroide

CPP – papiloma do plexo coróide;

DABCO - 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane

DAPI - 4'6-diamidino-2-phenylindole

DNA – ácido desoxirribonucleico

DTT – dithiothreitol

EDTA – ethylenediamine tetraacetic acid

ETS - e-twenty six

FCM – Faculdade de Ciências Médicas

FISH – fluorescent *in situ* hybridization

HhaI - *Haemophilus haemolyticus*

HHV-6 – Human Herpes Virus - 6

IARC – International Agency for Research on Cancer

kb – kilo bases

KCl – cloreto de potássio

kD – kilodalton

LB – Luria-Bertani

LCRs – low copy repeats

LFL – síndrome de Li-Fraumeni like

LLA – leucemia linfóide aguda
LMA – leucemia mielóide aguda
MDM2 - mouse double-minute 2
MRN – complexo proteico Mre11-Rad50-NBS1
NAHR – non allelic homologous recombination
NB – neuroblastoma
NCBI - National Center for Biotechnology Information
pb – pares de bases
PCR – polymerase chain reaction
pH – potencial hidrogeniônico
PTEN - phosphatase and tensin homolog
PVC - cloreto de polivinila
RB1 – retinoblastoma gene
RFLP – restriction fragment length polymorphism
RNA – ácido ribonucleico
RNAm – ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR – reverse transcriptase polymerase chain reaction
S-DHEA – sulfato dehidroepiandrosterona
SDS – sodium dodecyl sulfate
SFB – soro fetal bovino
SLF – síndrome de Li-Fraumeni
SNC – sistema nervoso central
SNP – single nucleotide polymorphism
SSC – saline-sodium citrate buffer
TCA – tumor do córtex da adrenal
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TP53 – tumor supressor protein 53
TPC – tumores do plexo coróide
Tth – *Thermus thermophiles*
UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas
WHO – World Health Organization

WT1 – Wilms tumor 1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Marcas do processo de tumorigênese.....	14
Figura 2: Representação esquemática dos diferentes domínios da proteína p53.	15
Figura 3: Espectro de tumores que os animais portadores de mutações do tipo troca de sentido na p53 desenvolvem, quando comparados aos animais sem p53	18
Figura 4: Esquema do gene <i>TP53</i> e os diferentes domínios, evidenciando a mutação R337H	20
Figura 5: Análise da estrutura quaternária da p53 mutante	21
Figura 6: Distribuição das mutações germinativas do gene <i>TP53</i> de acordo com o códon.	23
Figura 7: Curva de sobrevida livre de eventos de pacientes com TCA de acordo com o estadiamento da doença ao diagnóstico.....	24
Figura 8: Esquema representativo das 09 isoformas da p53, evidenciando o códon de início da tradução e tamanho das proteínas resultantes	26
Figura 9: Esquema de primers utilizados para a detecção das isoformas da p53.....	39
Figura 10: RT-PCR para detecção das isoformas da p53	60
Figura 11: Comparação entre o padrão de resolução das bandas sem adição de brometo de etídeo (A) e com adição de brometo de etídeo (B) na análise do cariótipo.....	67
Figura 12: Cariótipo representativo de um paciente com TCA do sexo feminino.....	68
Figura 13: Representação da sonda LSI p53 (17p13.1) utilizada nos experimentos de FISH.	69
Figura 14: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do <i>TP53</i>	70
Figura 15: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do <i>TP53</i> e estadio da doença.....	71
Figura 16: Análise com a sonda Miller-Dieker LIS (17p13.3) / Smith-Magenis RAI (17p11.2) em células interfásicas do sangue periférico.....	73
Figura 17: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do <i>TP53</i>	74

Figura 18: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do <i>TP53</i>	75
Figura 19: Captura de imagens do FISH do <i>TP53</i> em núcleos interfásicos sem a utilização do filtro para detecção do DAPI.....	76
Figura 20: Representação esquemática da hipótese para explicar a associação entre a presença da deleção do <i>TP53</i> em células do sangue periférico e a ocorrência do TCA em portadores da mutação R337H	77
Figura 21: Representação gráfica da hematopoiese	79
Figura 22: FISH do gene <i>TP53</i> em diferentes linhagens de células do sangue periférico.....	80
Figura 23: Gel de agarose corado com brometo de etídeo representativo da genotipagem das colônias transformadas com o exon 10 de um portador da R337H com deleção do gene <i>TP53</i>	81
Figura 24: Eletroferograma representativo da genotipagem de uma célula em um estado de hemizigose selvagem, heterozigose e hemizigose mutante.....	82
Figura 25: Representação gráfica dos dados obtidos no aCGH.	84
Figura 26: Representação da região de 25.824 pb seqüenciada no portador da mutação R337H.....	87
Figura 27: Eletroferograma representativo de uma região poli-T e uma região poli-A evidenciando a perda da qualidade do seqüenciamento logo após a repetição nucleotídica	87
Figura 28: Eletroferogramas obtidos no seqüenciamento do DNA tumoral de um portador da R337H.....	87
Figura 29: Representação esquemática da alteração de seqüência encontrada no intron 9 do <i>TP53</i>	89
Figura 30: Resultado do alinhamento utilizando o algoritmo BLASTn.....	89
Figura 31: Seqüência esperada ao utilizar o par de oligonucleotídeos iniciadores representado na figura 29	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados obtidos em relação à análise da R337H nos genitores dos pacientes com TCA 27

Tabela 2: Padrão de expressão das isoformas da p53 em tumores associados e não associados à mutação R337H 61

1.0 Revisão Bibliográfica

1.1 O câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*; WHO), o câncer é a principal causa de morte nos países desenvolvidos e a segunda principal causa de morte em países em desenvolvimento (World Health Organization). A *International Agency for Research on Cancer* (IARC) apontou no ano de 2008 a ocorrência de mais de 12 milhões de casos novos de câncer ao redor do mundo. Estima-se que no ano de 2030 o número de mortes em decorrência do câncer chegue a 11 milhões por ano, 44% a mais do que mostram os números atuais (Ferlay *et al.*, 2010).

O termo câncer pode ser considerado um termo genérico que dá nome a uma variedade de doenças de origem genética, que podem apresentar características biológicas distintas e afetar diferentes órgãos (Vogelstein & Kinzler, 2004). Entretanto, o ponto unificador deste grupo variado de doenças é a proliferação celular descontrolada que, em alguns casos, pode resultar na invasão de outros órgãos e tecidos.

O processo de tumorigênese se inicia quando uma célula adquire vantagem seletiva de crescimento quando comparada às células que compõem o tecido à sua volta (Vogelstein & Kinzler, 2004). Esta vantagem seletiva emerge como resultado do acúmulo de alterações em determinados processos celulares, observando-se nestas células a autossuficiência para fatores de crescimento, insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, estímulo à angiogênese e invasão tecidual (Hanahan & Weinberg, 2000). Adicionalmente a estes fatores, recente trabalho de Hanahan e Weinberg propôs que a capacidade de modificar ou reprogramar o metabolismo celular, evadir-se da destruição pelo sistema imunológico, a ocorrência de respostas inflamatórias, a

manutenção do microambiente tumoral e a instabilidade genômica também são consideradas “marcas” da patogênese tumoral (Figura 1) (Hanahan & Weinberg, 2011).

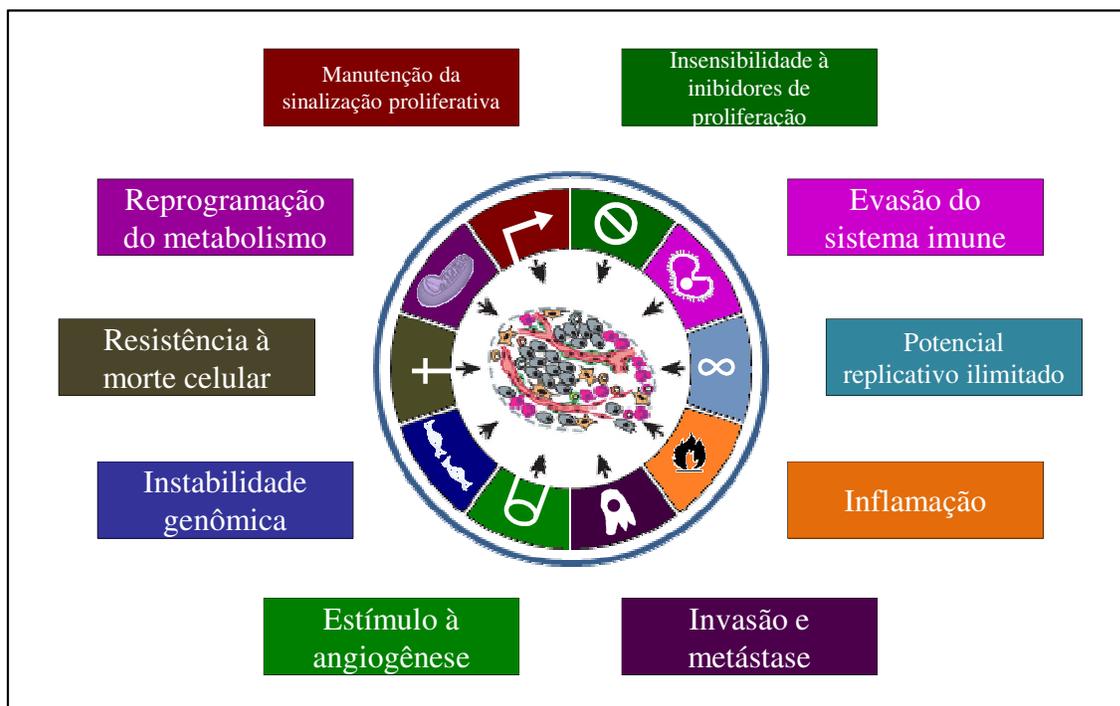


Figura 1: Marcas do processo de tumorigênese. Fonte: modificado de Hanahan & Weinberg, 2011.

1.2 A p53 e o câncer

O gene supressor de tumor *TP53*, descrito pela primeira vez em 1979, é um dos mais bem caracterizados genes cujo papel na etiologia é conhecido tanto em tumores hereditários como esporádicos (Levine & Oren, 2009). A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*, atua como um fator de transcrição na forma de um homotetrâmero, formado a partir de um dímero de dímeros. Cada um dos monômeros apresenta 393 aminoácidos e pode ser estruturalmente dividido em um domínio de ativação transcricional, um domínio SH3, um domínio de ligação ao DNA, um domínio de oligomerização e um domínio regulatório, além dos resíduos de localização nuclear e sinal de exportação (Bode & Dong, 2004) (Figura 2).

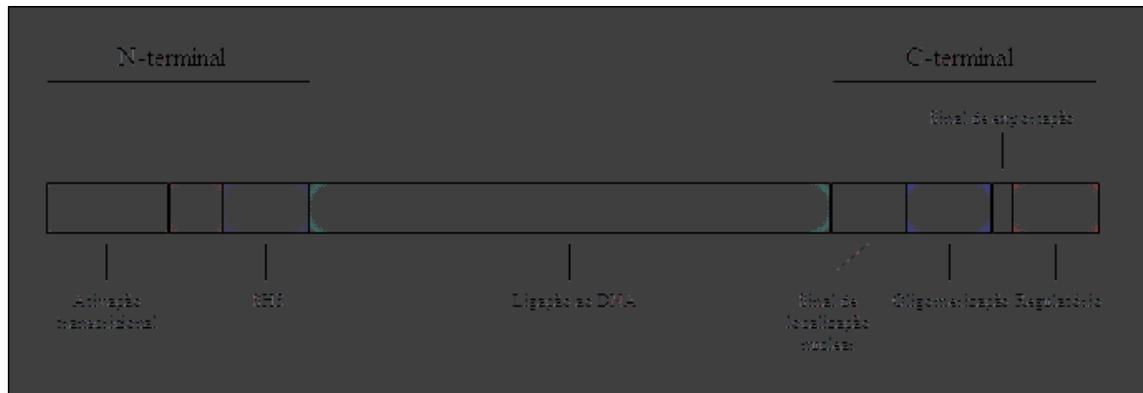


Figura 2: Representação esquemática dos diferentes domínios da proteína p53. O domínio de ativação transcricional compreende os resíduos 1 a 42, SH3 os resíduos 63 a 97, de ligação ao DNA os resíduos 98 a 292, de oligomerização os resíduos 324 a 355 e o domínio regulatório compreende os resíduos 363 a 393.

A proteína p53 selvagem apresenta uma meia-vida curta, de aproximadamente 20 minutos (Levine, 1997), sendo continuamente degradada. Este processo é mediado primariamente pela proteína mouse double-minute 2 (MDM2), que tem como alvo a p53, resultando em sua degradação através de proteólise mediada por ubiquitina (Toledo & Wahl, 2006). Denominada “guardiã do genoma”, em situações de estresse celular a p53 deixa de ser degradada e é estabilizada no núcleo por modificações pós-traducionais, induzindo a transcrição ou repressão de genes-alvo, prevenindo a proliferação de células danificadas (Levine, 1997).

As situações de estresse que podem desencadear a estabilização da p53 incluem o encurtamento dos telômeros, hipóxia, danos ao fuso mitótico, choque térmico, proteínas mal enoveladas, privação nutricional, ativação de oncogenes e danos ao DNA (Levine *et al.*, 2006; Vogelstein *et al.*, 2000).

Uma vez estabilizada, a p53 passa a se ligar a seqüências p53-responsivas no genoma. Estas seqüências são caracterizadas por dois motivos **RRRCWWGYYY**, onde R é uma purina, W é uma adenina ou timina e Y é uma pirimidina. Estes dois motivos podem ser

separados por 0 até 21 pares de bases (el-Deiry *et al.*, 1992). Os produtos dos genes transcritos pela p53 comumente estão envolvidos na parada do ciclo celular, indução da apoptose, reparo do DNA, controle sobre a divisão celular e na retroalimentação positiva ou negativa da própria via (Levine *et al.*, 2006).

Apesar de atuar principalmente como um fator de transcrição nuclear, a p53 também pode exercer seu papel fora do núcleo através de interações proteína-proteína. Por exemplo, ela pode se translocar para a mitocôndria, onde interage diretamente com as proteínas Bcl 2 e Bcl-Xl para induzir a apoptose (Mihara *et al.*, 2003).

Mutações germinativas no gene *TP53* estão comumente associadas à Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), uma síndrome de predisposição familiar ao câncer em que aproximadamente 70% dos homens e 93% das mulheres desenvolverão algum tipo de tumor ao longo de suas vidas (Nagy *et al.*, 2004). Os tipos de tumores mais frequentes descritos nas famílias Li-Fraumeni incluem os sarcomas de partes moles, tumores do sistema nervoso central (SNC), câncer de mama, leucemia, osteossarcoma e tumor do córtex da adrenal (Li *et al.*, 1988). A partir da definição clássica desta síndrome surgiram outros conceitos para definir uma condição clínica similar, mas não idêntica à SLF, denominada Síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL) (Birch *et al.*, 1994).

Independente da predisposição hereditária para o desenvolvimento do câncer, a inativação do gene *TP53* pode ser encontrada em mais da metade de todos os tumores (Nigro *et al.*, 1989, Vogelstein *et al.*, 2000) e em mais de 70% dos casos, esta inativação se deve à mutações do tipo *missense* no gene *TP53* (Hussain & Harris, 1998).

As mutações do tipo troca de sentido da p53 normalmente conferem à proteína mutante uma atividade dominante negativa sobre a proteína selvagem, dado o processo de oligomerização entre os monômeros selvagem e mutante (Milner *et al.*, 1991). Entretanto, o

papel que as mutações da p53 desempenham no câncer parece ser mais impactante do que a simples perda da função de supressão tumoral. Evidências obtidas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo* indicam que, quando mutada, a p53 ganha funções oncogênicas, processo denominado *ganho de função* (Dittmer *et al* 1993; Hsiao *et al* 1994; Shaulsky *et al* 1991; Olive *et al*, 2004).

Um dos principais indícios do ganho de função da p53 mutante de troca de sentido é o espectro de tumores que os animais portadores de mutações na p53 desenvolvem, quando comparados aos animais p53^{-/-} (Olive *et al*, 2004). Camundongos nocaute para a p53 usualmente desenvolvem linfomas e sarcomas, sendo que os carcinomas são bastante raros (Donehower *et al.*, 1992; Jacks *et al.*, 1994; Purdie *et al.*, 1994). Em contrapartida, os camundongos portadores de mutações no domínio de ligação ao DNA da p53 (R270H e R172H), desenvolvem um espectro de tumores mais amplo e mais próximo dos portadores da SLF, incluindo uma variedade de carcinomas, sarcomas de ossos e partes moles, leucemia e tumores do SNC (Figura 3) (Olive *et al*, 2004).

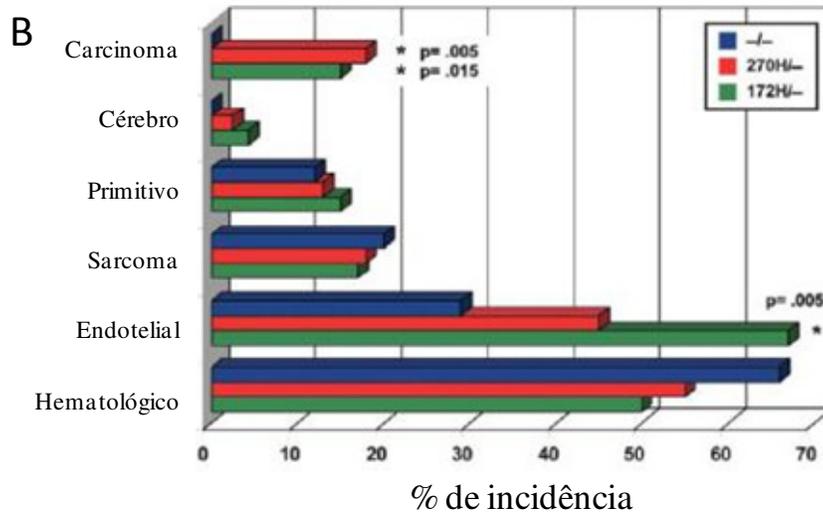
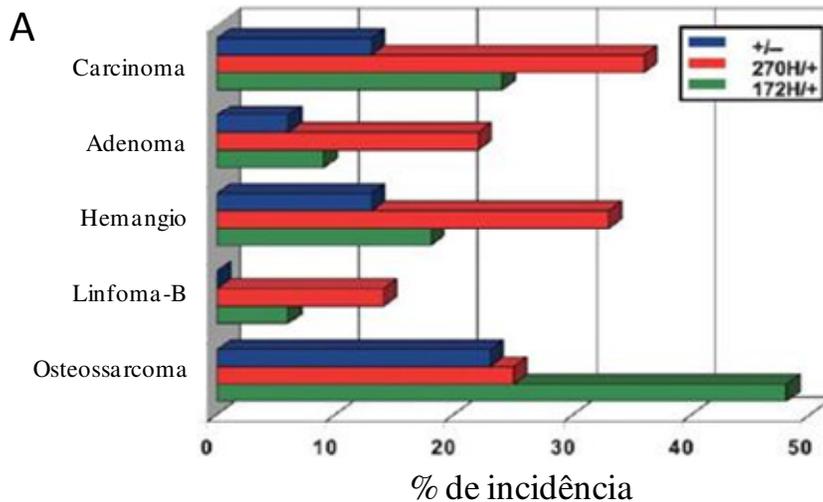


Figura 3: Espectro de tumores que os animais portadores de mutações do tipo troca de sentido na p53 desenvolvem, quando comparados aos animais sem p53 (adaptado de Olive *et al.*, 2004).

Além disto, os achados de Olive e colaboradores indicam que diferentes mutações do *TP53* podem exercer um efeito diferencial sobre a tumorigênese *in vivo*, apesar de as bases moleculares para esta observação não estarem esclarecidas. O que sustenta esta hipótese é que o espectro de tumores em animais $p53^{R270H/+}$ é ligeiramente diferente dos animais $p53^{R172H/+}$ (Figura 3A, 3B) e fibroblastos portando as diferentes mutações apresentam taxa de proliferação celular distinta, revelando uma possível diferença funcional entre as duas proteínas mutantes (Olive *et al.*, 2004).

A porcentagem de mutações do tipo *missense* descrita para o gene *TP53* é bem maior do que as descritas para outros genes supressores de tumor e pode indicar uma possível vantagem seletiva associada à tumorigênese nas células portadoras deste tipo de mutação (Hussain & Harris, 1998; Sigal & Rotter, 2000). De fato, as formas mutantes de p53 estão implicadas em grande parte dos eventos que marcam o processo de tumorigênese (Figura 1) (Hanahan e Weinberg, 2011; Solomon *et al.*, 2011). A expressão de p53 mutante em células mieloblásticas murinas além de interferir na apoptose dependente de p53 também resulta na interferência na via de apoptose independente de p53 (Peled *et al.*, 1996). Também foi demonstrado que a p53 mutante acelera a proliferação celular através da cooperação com fatores de transcrição relacionados ao ciclo celular, como ETS, E2F e regulação da transcrição de MYC (Brosh & Rotter, 2009).

Outra marca do processo de tumorigênese em que a p53 mutante pode cooperar é a instabilidade genômica. Song e colaboradores verificaram que a p53 mutante, diferentemente da p53 selvagem, interage com a proteína Mre11, uma das componentes do complexo MRN (Mre11-Rad50-NBS1), envolvido no reconhecimento de quebras de dupla fita do DNA e no recrutamento de proteínas que fazem parte da maquinaria de reparo. Os dados levaram os autores a sugerir um modelo no qual a interação física entre os mutantes da p53 e a Mre11 perturba o recrutamento do complexo de MRN para o local de quebra do DNA, prejudicando a resposta ao dano no DNA mediada por ATM, culminando em defeitos de *checkpoint* do ciclo celular e instabilidade genômica (Song *et al.*, 2007).

Além dos processos citados acima, evidências indicam que as formas mutantes de p53 também estão envolvidas na promoção de invasão tecidual e metastatização, inflamação e manutenção do microambiente tumoral (revisado por Solomon *et al.*, 2011).

1.3 A mutação R337H do gene *TP53*

A mutação R337H do gene *TP53* (Figura 4) foi descrita pela primeira vez em 1999 em um paciente pediátrico com carcinoma do córtex da adrenal. Nesta ocasião, não foi possível identificar se se tratava de uma mutação germinativa ou somática (Varley *et al*, 1999). Em 2001, Ribeiro e colaboradores identificaram uma forte associação entre a R337H germinativa e os tumores do córtex da adrenal (TCA) no sul do Brasil (Ribeiro *et al*, 2001).

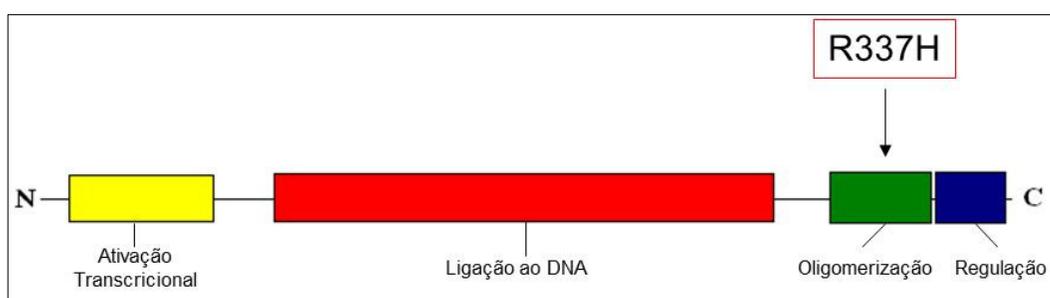


Figura 4: Esquema do gene *TP53* e os diferentes domínios, evidenciando a mutação R337H. Diferentemente da grande maioria das mutações do gene *TP53*, a R337H não se encontra no domínio de ligação ao DNA (exons 5-8), e sim no domínio de tetramerização (exon 10) da proteína.

A hiperexpressão da proteína mutante R337H em fibroblastos murinos imortalizados revelou que a proteína 337H foi capaz de transativar um promotor p53-responsivo, ao contrário da proteína mutante R248W, associada à SLF. Além disso, em células SaOs-2, a proteína mutante 337H foi capaz de suprimir o crescimento das colônias de forma similar à p53 selvagem, o que não ocorreu com a proteína R248W (Ribeiro *et al.*, 2001).

O resíduo 337 da p53 encontra-se no domínio de tetramerização da proteína. Uma molécula de guanidina da arginina neste resíduo (Arg337) participa de uma interação iônica com o grupo carboxila do resíduo Asp352, para a configuração do homodímero da p53. Além disto, a Arg337 também apresenta interações hidrofóbicas com os resíduos 332, 340, 341 e 348 que ajudam na estabilização do tetrâmero (Jeffrey *et al.*, 1995; Mateu & Fersht,

1998). Na faixa de temperatura de 37°C e pH 7.0, cerca de 20% dos tetrâmeros com a mutação 337H estão desnaturados. Na mesma temperatura de 37°C, mas com a mudança do pH para 8.0, cerca de 70% dos tetrâmeros se desnatura, o que não ocorre com o tetrâmero selvagem (Figura 5). Estes dados revelam um efeito deletério da mutação R337H sobre a estrutura da p53 em um cenário pH-dependente (DiGiamarino *et al.*, 2000). Esta desestabilização do tetrâmero provavelmente se deve a desprotonação do resíduo de histidina na posição 337 na faixa de pH mais próxima a 8.0, afetando sua interação com o resíduo 352, prejudicando a estabilização da estrutura quaternária da p53 (Figura 5) (DiGiamarino *et al.*, 2002).

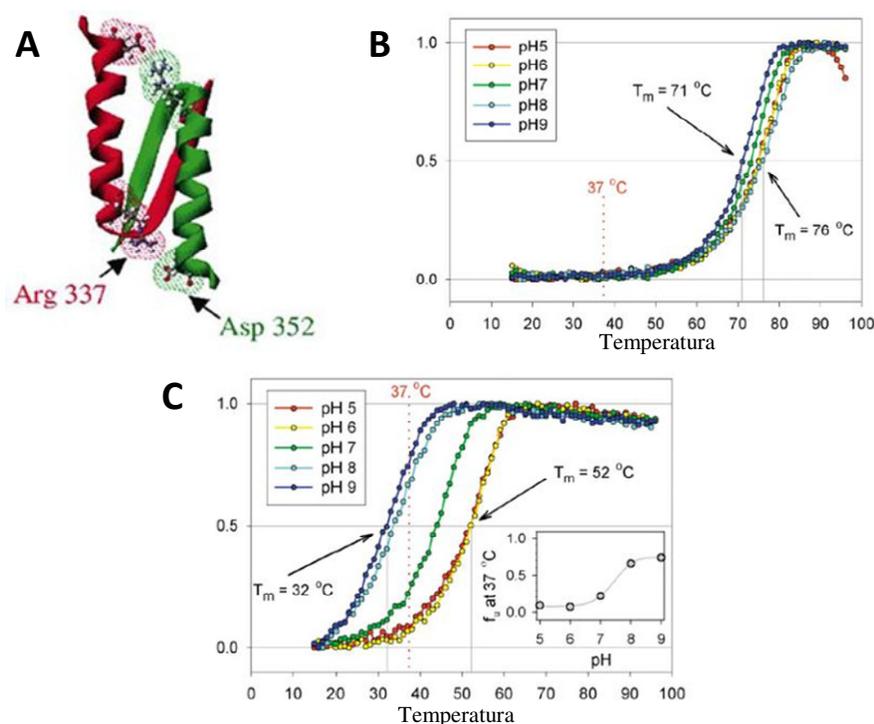


Figura 5: Análise da estrutura quaternária da p53 mutante. A. Cada um dos monômeros da p53 está representado pelas cores verde e vermelho. Estão indicados os resíduos 337 e 352, evidenciando a interação necessária para estabilização do homodímero. B, C. Os gráficos mostram a análise de dicroísmo circular (B) do tetrâmero de p53 selvagem, demonstrando a estabilidade ao longo da mudança de pH e temperatura e (C) do tetrâmero de p53-337H, revelando a desnaturação do mesmo com o aumento progressivo do pH (Fonte: DiGiamarino *et al.*, 2002).

Jordan e colaboradores realizaram um estudo funcional com a proteína R337H baseado em um ensaio de expressão em levedura. Os autores demonstraram que altos níveis de expressão de p53 são necessários para que ocorra a transativação gênica similar à p53 selvagem, enquanto que, em baixos níveis de expressão, a proteína R337H apresenta um fenótipo de transativação defeituoso (Jordan et al., 2010).

Esta mutação não é comumente encontrada nas populações de outros países, e evidências indicam que tenha sido fixada nas regiões Sul e Sudeste do Brasil através de efeito fundador (Pinto *et al.*, 2004; Garritano *et al.*, 2010). Em estudo realizado no estado do Paraná, onde 97% dos pacientes com TCA são portadores da R337H, a frequência desta mutação foi estimada em 0,21% da população saudável (Piovesan *et al.*, 2006). Palmero e colaboradores estimaram a frequência desta mutação na cidade de Porto Alegre (RS) e encontraram uma frequência de 0,3% (Palmero *et al.*, 2008). Considerando estes dados, a frequência deste alelo na população do Sul do Brasil é maior do que qualquer outra mutação do *TP53* associada à SLF (Achatz *et al.*, 2009).

Em estudo realizado no estado de São Paulo, a frequência da mutação R337H em pacientes com TCA pediátrico foi de 77% e em pacientes adultos com TCA foi de 13% (Latronico *et al.*, 2001). Entretanto, a frequência desta mutação na população saudável do estado de São Paulo ainda não é conhecida.

Dados da *International Agency for Research on Cancer (IARC) TP53 Database* indicam que a R337H é a mutação germinativa mais frequente descrita no gene *TP53* (Petitjean *et al.*, 2007 – Database version: R15/November 2010) (Figura 6).

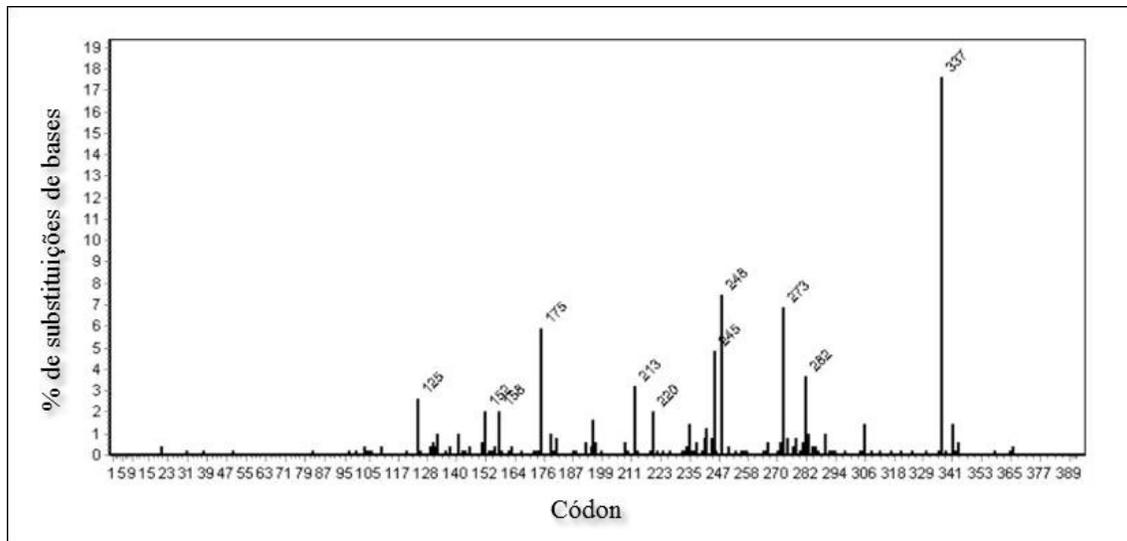


Figura 6: Distribuição das mutações germinativas do gene *TP53* de acordo com o códon (n=494) (Petitjean *et al.*, 2007 – Database version: R15/November 2010).

1.4 A mutação R337H e o câncer

O TCA é uma neoplasia rara, cuja incidência anual estimada é de cerca de 0,3 casos / milhão de indivíduos abaixo dos 15 anos de idade (Young *et al.*, 1986; Stiller, 1994). Entretanto, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a incidência do TCA pediátrico é cerca de 10 a 15 vezes maior do que a observada em outras partes do mundo (Sandrini *et al.*, 1997), fato ligado à presença da mutação R337H. A penetrância estimada para o TCA em portadores desta mutação é de cerca de 10% (Figueiredo *et al.*, 2006).

O TCA é um tumor agressivo que acomete indivíduos de ambos os sexos, mas na maioria das séries publicadas há uma proporção maior de indivíduos do sexo feminino. Existe uma distribuição bimodal, ocorrendo um pico de incidência até os 5 anos de idade e outro após a quarta década de vida (Latronico & Chrousos 1997). As manifestações sintomáticas do TCA normalmente estão relacionadas ao excesso de produção dos hormônios adrenocorticais, sendo que os pacientes frequentemente apresentam quadros de virilização, Síndrome de Cushing e hipertensão (Lefevre *et al.*, 1984).

O estadiamento do tumor ao diagnóstico é baseado no peso do tumor e na presença de metástases. Tumores menores que 100 g com ausência de metástases são classificados como estadio I. Tumores maiores que 100 g com ausência de metástases são classificados como estadio II. Tumores que sofrem ruptura durante o procedimento cirúrgico ou apresentam metástase local são classificados como estadio III. Tumores com presença de metástase à distância (ex. pulmão, veia cava) são classificados como estadio IV (COG – ARAR 0332).

Como os protocolos quimioterápicos para o tratamento do TCA são pouco eficientes, o diagnóstico precoce e a ressecção cirúrgica são os fatores mais importantes para a cura do paciente com TCA (Zancanella, 2006). Os pacientes diagnosticados com TCA estadio I e II são submetidos somente à ressecção cirúrgica. Nestes casos, o prognóstico é bem melhor do que nos estádios III e IV da doença, em que os pacientes são submetidos à quimioterapia além da cirurgia (Figura 7).

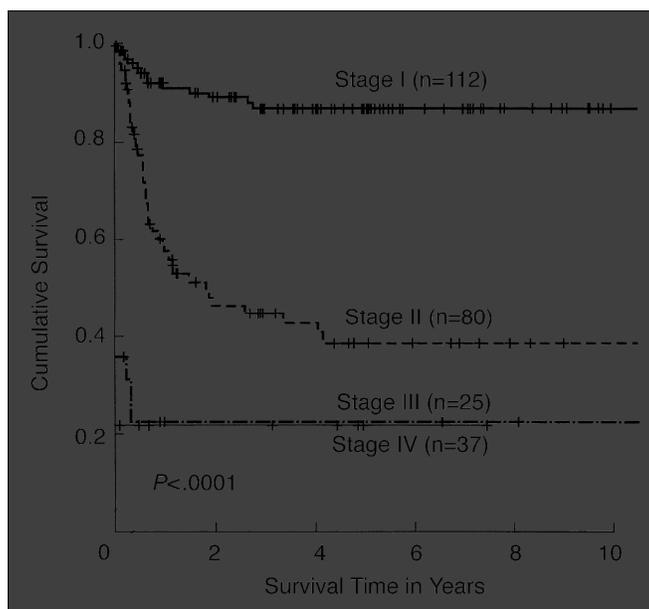


Figura 7: Curva de sobrevivência livre de eventos de pacientes com TCA (n=254) de acordo com o estadiamento da doença ao diagnóstico (Michalkiewicz *et al.*, 2004).

Inicialmente descrita como tecido-específica, o papel da R337H na etiologia de outros tumores além do TCA vem sendo investigado. Em 2006, Achatz e colaboradores identificaram a R337H em 06 famílias brasileiras com características da síndrome de Li-Fraumeni-like (Achatz *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria das famílias de portadores da R337H com TCA não apresentam um histórico familiar de câncer compatível com as síndromes clássicas de predisposição ao câncer associadas a mutações do p53, como a SLF e LFL (Ribeiro *et al.*, 2001; Latronico *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2006).

Apesar do grande número de trabalhos que versam sobre mutações do gene *TP53*, a mutação R337H apresenta particularidades que fazem dela uma questão ainda em aberto. Um dos fatores que a torna biologicamente distinta das demais mutações de p53 é seu aparente efeito “brando” sobre a função da proteína (Ribeiro *et al.*, 2001). Outro ponto inconclusivo é no que diz respeito à predisposição a múltiplos cânceres. Como a maioria das famílias de portadores da R337H não apresenta um histórico familiar de câncer compatível com as síndromes de predisposição ao câncer associadas a mutações do p53 (Ribeiro *et al.*, 2001; Latronico *et al.*, 2001; Figueiredo *et al.*, 2006), o espectro de neoplasias a que esta mutação predispõe era objeto de debate no ano de início desta tese.

1.5 As isoformas da p53

Sabe-se que a p53 apresenta pelo menos 09 isoformas diferentes da proteína, decorrentes de splicing e promotores alternativos (Figura 8). A região C-terminal da proteína pode se apresentar de três formas diferentes: p53, p53 β e p53 γ , sendo que as duas últimas perdem o domínio de tetramerização. Na região N-terminal, além da proteína completa, outras duas formas podem ser originadas: Δ 40p53, resultante de um *splicing* alternativo no intron 2 e a Δ 133p53, proteína truncada que se inicia no códon 133, decorrente do promotor alternativo presente no intron 4. Com isto, as 09 isoformas da p53

conhecidas até o momento são: p53, p53 β , p53 γ , Δ 40p53, Δ 40p53 β , Δ 40p53 γ , Δ 133p53, Δ 133p53 β e Δ 133p53 γ (Bourdon *et al.*, 2005).

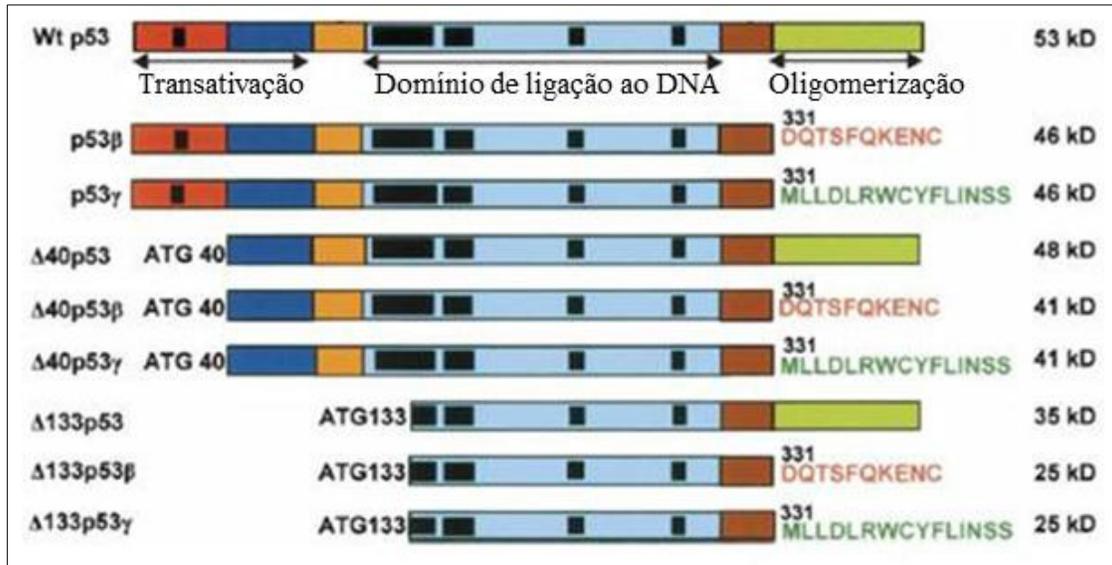


Figura 8: Esquema representativo das 09 isoformas da p53, evidenciando o códon de início da tradução e tamanho das proteínas resultantes (kD – kilodalton). Wt p53 = p53 completa (Adaptado de Bourdon *et al.*, 2005).

O padrão de expressão das isoformas da p53 é tecido específico e, ainda, pode ser diferente quando se compara um mesmo tecido normal com um tumoral. Além disto, em um ensaio de apoptose, verificou-se que as isoformas Δ 133p53 e p53 β agem de forma dominante negativa em relação à isoforma completa da proteína (Bourdon *et al.*, 2005). Estes dados nos levaram a postular a hipótese de que o padrão de expressão das isoformas da p53 poderia influenciar a suscetibilidade de alguns tecidos à presença da R337H e resultar na ocorrência de câncer apenas em um determinado conjunto de tecidos.

HIPÓTESE DE TRABALHO

Num primeiro momento, os objetivos desta tese se delinearão na tentativa de obter maiores evidências sobre o espectro de tumores que a R337H predispõe e sobre a herança desta mutação. Em estudo preliminar com 35 famílias de portadores da mutação R337H realizado durante a iniciação científica da aluna, observou-se que em 24 famílias a ‘transmissora’ da mutação era a mãe, enquanto que em 11 eram os pais. Surpreendentemente, porém, quando o portador da mutação era o pai, a R337H foi aparentemente segregada com uma frequência maior do que a esperada para os padrões mendelianos. A Tabela 1 mostra o número de filhos portadores da R337H de acordo com o genitor portador da mutação.

Tabela 1: Resultados obtidos em relação à análise da R337H nos genitores dos pacientes com TCA.

	Filhos Positivos	Filhos Negativos	Total de filhos
Pais Portadores	18	4	22
Mães Portadoras	35	23	58

Alterações cromossômicas como translocações e rearranjos estruturais estão normalmente relacionados a desvios na segregação de cromossomos e alelos (Gropp & Winking 1981; Aranha & Martin-DeLeon 1991); nestes casos, a segregação difere da proporção Mendeliana esperada de 1:1. Na ocasião do início deste trabalho, não haviam sido realizados estudos de cariótipo dos portadores da R337H. Portanto, a realização de análises citogenéticas e hibridização *in situ* (FISH) do *TP53* em células do sangue periférico dos portadores da mutação poderia nos dar evidências sobre a ocorrência de alterações estruturais cromossômicas que poderiam estar relacionadas a este aparente padrão não mendeliano de herança.

Com o andamento do trabalho de tese pudemos observar, de fato, a presença de alterações cromossômicas nos portadores desta mutação. Dada a forte associação entre esta alteração cromossômica e a ocorrência do TCA, foram investigadas as possíveis causas desta alteração, bem como suas implicações para a carcinogênese.

Finalmente, levantou-se a hipótese de que a R337H poderia exercer um efeito diferenciado sobre as diferentes isoformas da p53.

2.0 Objetivos

2.1 Objetivos gerais:

- 2.1.1 Investigar o espectro de tumores que a mutação R337H pode estar associada;
- 2.1.2 Estudar alterações genéticas que cooperem com a mutação R337H na carcinogênese;

2.2 Objetivos específicos:

- 2.2.1 Investigar a presença da mutação R337H em pacientes pediátricos diagnosticados com tumores do córtex da adrenal, leucemia linfóide aguda, leucemia mieloide aguda, linfoma, rhabdomyosarcoma, sarcoma de Ewing, osteossarcoma e tumores do SNC;
- 2.2.2 Correlacionar a presença da mutação R337H com as características clínicas dos pacientes, a saber, idade ao diagnóstico, apresentação clínica da doença e seguimento do paciente;
- 2.2.3 Correlacionar o padrão de expressão das isoformas da proteína p53 com a ocorrência de câncer associada à R337H;
- 2.2.4 Investigar alterações cromossômicas numéricas e estruturais nos portadores da mutação R337H através de análises citogenéticas;
- 2.2.5 Caracterizar as alterações genéticas eventualmente encontradas nos portadores da mutação R337H;

3.0 Métodos

3.1 Sujeitos da pesquisa e aspectos éticos

Desde 1982 até dezembro de 2011 foram recebidos no Centro Infantil Boldrini 113 pacientes diagnosticados com tumor do córtex da adrenal. Os pacientes ou responsáveis pelos mesmos foram convidados a participar do estudo para identificação da mutação R337H. Do total de pacientes, foi possível obter amostra de 84 deles para o teste da mutação *TP53-R337H*. Adicionalmente, os familiares dos pacientes com TCA foram convidados a participar do estudo, autorizando a coleta de sangue e pesquisa da mutação. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas (FCM/UNICAMP) (Anexos I e II).

As amostras de sangue periférico utilizadas nas análises de cariótipo e FISH foram obtidas na ocasião da visita do paciente ao hospital para a realização de consultas e exames de rotina. Todos os pacientes e/ou responsáveis que aceitaram participar deste estudo assinaram Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo III) para coleta de material e realização da pesquisa da mutação R337H, análises de cariótipo e FISH. Familiares saudáveis portadores da mutação também foram convidados a participar do estudo para análise de cariótipo e FISH e, igualmente assinaram o TCLE (Anexo IV).

3.2 Análise da presença da mutação *TP53-R337H* por PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*).

O DNA de células do sangue periférico foi obtido utilizando-se o kit para extração de DNA Wizard® Genomic (Promega) ou o kit illustra™ blood GenomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare), seguindo as instruções dos fabricantes. O DNA das células tumorais foi extraído através do método fenol:clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989). Após a obtenção do DNA, foram utilizados 0.2 µM dos oligonucleotídeos iniciadores de sequência 5'-CTG

AGG CAC AAG AAT CA-3' e 5'-TCC TAT GGC TTT CCA ACC-3' (Ribeiro *et al.*, 2001) para amplificação do exon 10 do gene *TP53*. A amplificação deste exon consistiu de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 60°C e extensão a 72°C, utilizando-se 1U da enzima *Tth* DNA polimerase (Biotools). O produto da reação de PCR foi digerido com 5U da enzima *HhaI* (Fermentas) durante 16 horas a 37°C. A presença da mutação R337H resulta na perda do sítio de restrição da enzima *HhaI* dentro do amplicon; portanto, os padrões de bandas esperados quando o produto da digestão é resolvido em gel de agarose 2% são: fragmentos de 293 pb e 154 pb em células homozigotas normais, fragmentos de 447 pb, 293 pb e 154 pb em células heterozigotas para a R337H e uma banda de 447 pb em células homozigotas para a R337H.

3.3 Nested PCR para análise da presença da mutação R337H

Nos casos em que foi realizada genotipagem do codon 337 do *TP53* em células individuais, foi realizado Nested PCR para alcançar uma sensibilidade maior na genotipagem. Após o isolamento das células individuais como descrito no item 3.13, o DNA obtido foi utilizado para realizar a primeira reação de PCR. Nesta reação, foram utilizados 0.2 µM dos oligonucleotídeos iniciadores 5'-CTGAGGCACAAGAATCA-3' e 5' -GAAGACTAAAAAATGTCTGTGCAG- 3'. No nested PCR, oligonucleotídeos iniciadores 5' -TAAAAGTCAGCTGTATAGGTA CTTG- 3' e 5'-TCCTATGGCTTTCCAACC-3' foram utilizados. O produto do primeiro PCR foi utilizado como molde para esta segunda amplificação.

Para ambas as reações de PCR, o ciclo de amplificação consistiu de 30 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 60°C e extensão a 72°C, utilizando-se 1U da enzima *Tth* DNA polimerase (Biotools). O produto do nested PCR foi submetido a uma eletroforese em

gel de agarose 2%, corado com brometo de etídeo e visualizado utilizando-se uma fonte de luz ultravioleta. Nos casos em que houve amplificação, o produto do PCR foi sequenciado.

3.4 Sequenciamento do exon 10 do gene *TP53*

O sequenciamento do exon 10 do *TP53* foi realizado a partir do produto obtido na reação de nested PCR descrito no item 3.3. Os produtos foram sequenciados utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e 5 pmol do oligonucleotídeo iniciador 5' –TAAAAGTCAGCTGTATAGGTA CTTG– 3', em seqüenciador automático ABI PRISM 310 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram comparadas à seqüência de referência do gene com o auxílio da ferramenta BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, National Center for Biotechnology Information - NCBI).

3.5 Análise da presença da mutação R337H em amostras biológicas pelo método de Real-Time PCR

Em alguns casos, o indivíduo a ser testado para a presença da mutação R337H não pôde comparecer ao hospital para coleta de sangue. Nestes casos, o material a ser analisado foi obtido a partir de saliva, utilizando-se o kit Oragene® DNA sample collection kit (Genotek) ou a partir de sangue periférico estabilizado em cartões Whatman FTA® Card. A obtenção do DNA a partir de saliva se deu seguindo as instruções do fabricante do kit Oragene®. No caso do sangue em cartão FTA, um disco de 3 mm contendo o sangue do paciente foi lavado em H₂O MilliQ (Millipore) e em seguida aquecido a 99°C durante 10 minutos em uma solução 5% de Chelex® 100. Esta solução foi utilizada diretamente nas aplicações para análise da mutação R337H.

Nos casos citados acima, a metodologia de PCR em tempo real utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores 5'-CCTCCTCTGTTGCTGCAGATC-3' e 5'-CCTCATTGAGCTCTCGGAACAT-3' e sondas VIC-CGTGAGCGCTTCGAG e FAM-CGTGAGCACTTCGAG mostrou-se mais adequada para a análise, visto que apresenta uma maior sensibilidade para o teste. O método é baseado na utilização de duas sondas para genotipagem do códon 337 do *TP53*. A sonda contendo o alelo selvagem G (sublinhado na sequência da sonda correspondente) é marcada com o fluoróforo VIC e a sonda contendo o alelo mutante A (sublinhado na sequência da sonda correspondente) é marcada com o fluoróforo FAM. Para a análise, o equipamento de PCR em tempo real lê a fluorescência emitida ao longo da amplificação do produto, permitindo a genotipagem das amostras de interesse.

Foram utilizados em cada reação de genotipagem da R337H o Taqman® Universal PCR Master Mix (1x) (Life Technologies™), 0.9 µM dos oligonucleotídeos iniciadores, 0.2 µM de cada uma das sondas (Life Technologies™) e a amostra de DNA obtido dos pacientes. Os ciclos de amplificação no equipamento de PCR em tempo real Step One™ Real Time PCR system (Life Technologies™) consistiram de desnaturação inicial durante 10 minutos a 95°C e 40 ciclos de desnaturação a 95°C durante 15 segundos, seguida do anelamento e extensão a 60°C durante 1 minuto.

3.6 *Reverse transcriptase polymerase chain reaction* (RT-PCR) para detecção da expressão de diferentes isoformas da p53

O RNA total dos tecidos analisados foi extraído utilizando-se o método do TRIzol® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, o material foi macerado e o reagente TRIzol® adicionado. Em seguida, 200 µL de clorofórmio foi adicionado e, após

centrifugação, a fase aquosa contendo o RNA foi retirada. O RNA foi precipitado adicionando-se 0.5 mL de isopropanol, lavado com 75% de etanol e quantificado a 260 nm no espectrofotômetro. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA (kit ImProm, Promega). Para verificar a qualidade do cDNA, foram amplificados quatro genes constitutivos, segundo método de Lion e Kidd (1998) ou o gene da β -globina. Um conjunto de nove oligonucleotídeos iniciadores foi obtido para investigar a expressão das isoformas p53, p53 β , p53 γ , Δ 133p53, Δ 133p53 β e Δ 133p53 γ , de acordo como descrito por Boldrup *et al.*, 2007 (Figura 9).

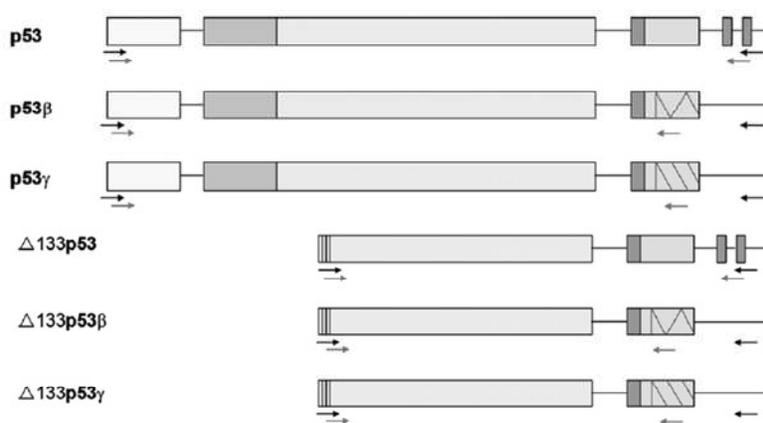


Figura 9: Esquema de primers utilizados para a detecção das isoformas da p53. A detecção das isoformas da p53 consistiu de um ciclo de PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores representados por setas pretas e uma reação de Nested PCR utilizando-se os oligonucleotídeos iniciadores representados por setas cinzas (Boldrup *et al.*, 2007).

3.7 Análise do cariótipo dos portadores da *TP53-R337H*

As análises de cariótipo e FISH foram realizadas em colaboração com a citogeneticista Lilian Zambaldi do Laboratório de Citogenética do Centro Infantil Boldrini.

A coleta do sangue submetido à análise do cariótipo foi efetuada utilizando-se seringas heparinizadas. Após a coleta, as células de 1 mL de sangue periférico de pacientes com a mutação R337H foram cultivadas em garrafas de 25 cm³ em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) (20%) e 2% de fitohemaglutinina (Cultilab®) a 37°C em ambiente com 5% CO₂ / 95% umidade. Após 48 horas de cultivo,

foi adicionado à cultura 7,5 µg / mL de brometo de etídio e, após 30 minutos, foi adicionado à cultura 100 µL de colchicina [16 µg / mL]. Após incubação de 1 hora a 37°C, as células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos e o meio sobrenadante descartado. Neste ponto, é iniciado o processo de hipotonia progressiva com 5 adições consecutivas de 1 ml de KCl 0,075 M com incubação de 10 minutos a 37°C cada. O processo de hipotonia é interrompido através da adição de fixador de Carnoy (metanol:ácido acético 3:1). Após a interrupção da hipotonia, são realizadas pelo menos 4 lavagens com fixador de Carnoy. Ao final das lavagens, as células foram resuspensas em volume adequado deste fixador, dependendo da quantidade de células hipotonizadas.

A suspensão contendo as células hipotonizadas foi pingada nas lâminas previamente limpas. Após breve secagem, as lâminas foram flambadas em chama de bico de Bunsen e, em seguida, lavadas em água corrente para retirar o excesso de ácido acético.

Para a realização do bandamento G, as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina 2,5% e em seguida em tampão fosfato (0,02M pH 6,8). As lâminas foram coradas com corante de Wright por 5 minutos e lavadas em água corrente para retirada do excesso de corante. A análise de pelo menos 20 metáfases foi realizada em microscópio óptico, utilizando-se a lente objetiva de 100 x em óleo de imersão, com o auxílio do software Cytovision – Applied Imaging.

3.8 Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Para a realização da hibridização *in situ* fluorescente, as células de 1 mL de sangue periférico dos pacientes com TCA foram hipotonizadas com 10 mL de KCl 0,075 M a 37°C durante 30 minutos. A hipotonia foi interrompida através da adição de fixador de Carnoy e as células foram centrifugadas a 2000 rpm durante 10 minutos. Após lavagem com fixador

de Carnoy, as células foram resuspensas em volume adequado de fixador, em decorrência do tamanho do pellet de células hipotonizadas.

A suspensão contendo as células hipotonizadas foi pingada em lâminas previamente limpas. Após a secagem ao ar, as lâminas foram tratadas em 2 x SSC (0,03 M citrato de sódio; 0,3 M cloreto de sódio; pH 7,0) durante 5 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as lâminas foram desidratadas em etanol 70%, 85% e 100% gelado e, em seguida tratadas em solução de formamida 70% em 2 x SSC durante 5 minutos a 73°C.

A preparação das sondas utilizadas – LSI p53 (17p13.1) Spectrum Orange Probe (Vysis / Abbott Molecular) e Miller-Dieker LIS (17p13.3) / Smith-Magenis RAI (17p11.2) (Kreatech Diagnostics) foi realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Sobre a lâmina previamente desnaturada, foi colocada a sonda também desnaturada. Em seguida, a lâmina foi coberta com lamínula de 22 mm x 22 mm e selada com cola de PVC. A hibridização ocorreu a 37°C em câmara úmida durante 16 horas, no escuro. Após a hibridização, as lâminas foram lavadas em 0,4 x SSC a 73°C durante 2 minutos e, em seguida, em solução 2 x SSC / 0,05% Tween 20 em temperatura ambiente durante aproximadamente 10 segundos. As lâminas foram secas ao ar. Foram adicionados 10 µL de solução DAPI / DABCO sobre as lâminas que, em seguida, foram cobertas com lamínula 22 mm x 40 mm e incubadas por 10 minutos a 4°C. Seguiu-se com a análise em microscópio de fluorescência com filtros específicos para os comprimentos de onda de cada sonda utilizada. Foram contados 200 núcleos utilizando-se a objetiva de 100 x em óleo de imersão. Considerando as análises dos indivíduos controle e parâmetros da literatura (Rudenko *et al.*, 2008), o valor de referência de normalidade para estes experimentos foi <5%.

3.9 Pesquisa da presença do Herpes Vírus Humano – 6 (HHV-6)

Após a obtenção do DNA dos pacientes como descrito no item 3.2, foi realizada uma reação de amplificação por PCR utilizando-se 0,2 µM de oligonucleotídeos iniciadores com seqüência 5'-ATTGTGATGTACGTGGCCGTCTC-3' e 5'-GATCCATGGTCGTCTTTCCACG-3'. Em seguida foi realizado um *nested* PCR utilizando-se oligonucleotídeos iniciadores com seqüência 5'-GCGGTCAACGTGCCGCTATCTAT -3' e 5'-GACATTTATAAGGGACCCGTTTCG-3' (Hall *et al.*, 1994) para detecção da presença de DNA do Herpes Vírus Humano – 6 (HHV-6). O produto obtido após o nested PCR (151 pb) foi separado em gel de agarose corado com brometo de etídeo e visualizado com o auxílio de uma fonte de luz ultravioleta.

3.10 Comparative Genomic Hybridization (CGH) Array

O DNA de três pacientes do sexo masculino diagnosticados com TCA, portadores da mutação R337H e da deleção do gene *TP53* e uma mistura de DNAs de 06 homens sem câncer, sem mutação e sem deleção, da mesma região geográfica dos pacientes, foi enviado à Roche NimbleGen Inc para realização do CGH *array* HG18 CHR17 FT. O DNA das amostras teste foram marcados com Cy3 e o DNA da amostra de referência marcado Cy5. Os DNAs marcados foram hibridizados no *chip* HG18 CHR17 FT que contém 385.000 probes específicos para o cromossomo 17. Após a hibridização dos DNAs e o escaneamento do *chip*, é possível comparar a amostra teste (paciente) com a amostra de referência (mistura de DNAs de doadores normais). A análise dos resultados permite inferir, através da intensidade de sinal captada em cada comprimento de onda, se há ganho ou perda de material genético na amostra teste, quando comparada ao DNA de referência.

3.11 Fracionamento das células do sangue periférico

2 mL de sangue periférico foram coletados utilizando-se uma seringa heparinizada. As células mononucleares foram separadas das células polimorfonucleares e eritrócitos através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences). As células polimorfonucleares foram fixadas em fixador de Carnoy e as células mononucleares foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab®) + 10% SFB (Cultilab®) e 0.2% Penicilina/Estreptomicina (Cultilab®) durante 24h em ambiente úmido a 37°C, 5% CO₂. Após o cultivo, os monócitos se tornam aderentes ao substrato e os linfócitos permanecem em suspensão, permitindo a separação destes dois tipos celulares. Após o fracionamento das células do sangue periférico em linfócitos, monócitos e granulócitos, foi realizado o FISH do *TP53* como descrito no item 3.8.

3.12 Clonagem do exon 10 do gene *TP53* em pJET 1.2

Para inserção do fragmento de DNA contendo a região do exon 10 do *TP53* em vetor de clonagem, foi utilizado o CloneJET™ PCR Cloning Kit (Fermentas), seguindo as instruções do fabricante. Brevemente, foi realizada uma reação de PCR com 25 ciclos utilizando-se os mesmos oligonucleotídeos iniciadores descritos no item 3.2. O produto de PCR foi quantificado e ligado ao vetor em uma proporção inserto:vetor 3:1. A reação de ligação se deu durante 30 minutos à temperatura ambiente, utilizando-se 5U da enzima T4 DNA ligase. A reação de ligação foi utilizada para transformar bactérias da linhagem DH5α, as quais foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) acrescido de 100µg/mL de ampicilina. Somente as células que haviam sido transformadas estariam aptas a crescer no meio de cultivo, devido à marca de resistência à ampicilina contida no plasmídeo. Após o crescimento, as células foram plaqueadas em meio LB-ágar acrescido de 100µg/mL de

ampicilina, seguido de incubação a 37°C durante 16 horas. Após o crescimento, as colônias foram isoladas e genotipadas para a presença da R337H como descrito no item 3.2.

3.13 Isolamento de células individuais para genotipagem do códon 337 do gene *TP53*

Com o objetivo de identificar qual foi o alelo perdido com a deleção do gene *TP53* em células do sangue periférico de portadores da R337H, isolamos as células dos pacientes com deleção para posterior genotipagem individual de cada uma das células. Após a coleta do sangue periférico do paciente em anticoagulante EDTA, as células mononucleares foram separadas das células polimorfonucleares e eritrócitos através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (GE Healthcare Life Sciences). As células mononucleares foram resuspensas em uma concentração de 10^4 células / mL em tampão SSC 1x. Um volume de aproximadamente 0.2 μ L foi pingado consecutivamente em uma lâmina previamente limpa com o auxílio de um pipetador manual. A lâmina foi visualizada em microscópio óptico e caso a gota analisada contivesse apenas uma célula à análise óptica, a mesma era imediatamente diluída em maior volume de SSC e recuperada com o auxílio do pipetador manual para ser submetida à genotipagem da mutação R337H.

Após o isolamento das células, o DNA das mesmas foi purificado por 45 minutos a 37°C em uma solução contendo 5 mM Tris-HCl (pH7.5), 40 mM DTT, 3.4 μ M SDS e 50 μ g / mL de proteinase K. Após a incubação, a mistura foi incubada a 95°C por 3 minutos para inativação da proteinase K. Esta mistura foi utilizada diretamente nas aplicações para análise da mutação R337H.

3.14 Sequenciamento da região 17p13

Com o objetivo de seqüenciar a região correspondente ao gene *TP53* em indivíduos portadores da mutação R337H, foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Anexo V) utilizando-se o software Primer Premier 5 (Premier Biosoft) para amplificar uma região correspondente a 25.824 pb do cromossomo 17. As reações de PCR foram padronizadas para cada par de oligonucleotídeo. Os ciclos de amplificação também foram padronizados para cada par de oligonucleotídeos, sendo que as temperaturas de anelamento variaram de 55°C a 61°C e as condições de extensão consistiram de temperatura de 68°C ou 72°C durante 2 minutos e 30 segundos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram separados em gel de agarose corado com brometo de etídeo e, em caso de múltiplas bandas, os produtos foram purificados a partir das bandas excisadas do gel. Os produtos purificados foram seqüenciados em seqüenciador automático ABI PRISM 3700 (Applied Biosystems) utilizando-se o kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems). As seqüências obtidas foram comparadas à seqüência de referência com o auxílio do software Mutation Explorer e a ferramenta BLAST - NCBI.

4.0 Resultados

Capítulo 1

Espectro tumoral associado à mutação R337H.

Association of the Highly Prevalent *TP53* R337H Mutation With Pediatric Choroid Plexus Carcinoma and Osteosarcoma in Southeast Brazil

Ana Luiza Seidinger, BSc¹; Maria José Mastellaro, MD²; Fernanda Paschoal Fortes, BSc¹; Juliana Godoy Assumpção, PhD¹; Izilda Aparecida Cardinalli, PhD³; Mônica Aparecida Ganazza, MSc¹; Raul Correa Ribeiro, MD⁴; Sílvia Regina Brandalise, PhD^{2,5}; Simone dos Santos Aguiar, PhD²; and José Andrés Yunes, PhD¹

BACKGROUND: The inherited, low-penetrance arginine-to-histidine substitution at codon 337 (R337H) of the tumor protein 53 gene (*TP53*) is clustered in southeast Brazil (estimated frequency, 0.3%). Although its tumorigenic effect initially appeared to be tissue-specific, recent evidence suggests its association with a broader range of tumors. Therefore, the authors of this report investigated the spectrum of pediatric malignancies associated with the *TP53* R337H mutation at a single referral institution in southeast Brazil. **METHODS:** Genomic DNA samples from 493 children with malignancies were screened for the R337H mutation. Available tumor samples from carriers were investigated for loss of heterozygosity (LOH) and nuclear p53 accumulation. Clinical data were obtained from medical records. **RESULTS:** Sixty-five of 70 patients (93%) with adrenocortical tumors (ACTs), 9 of 13 patients (69%) with choroid plexus carcinoma (CPC), and 3 of 41 patients (7.3%) with osteosarcoma carried the mutation. The proportion of CPC to choroid plexus papilloma (CPP) was much higher than that reported elsewhere. Osteosarcoma in carriers had a significantly poorer outcome ($P = .02$). The mutation was not identified in patients who had acute lymphoblastic leukemia (ALL) ($n = 187$), recurrent ALL ($n = 49$), acute myeloid leukemia ($n = 44$), lymphoma ($n = 30$), non-CPC central nervous system tumors ($n = 26$), Ewing sarcoma ($n = 25$), or rhabdomyosarcoma ($n = 8$). Among the tumors that were available for analysis, LOH with retention of the mutant allele was confirmed in 21 of 21 ACTs, in 2 of 2 CPCs, and in 2 of 3 osteosarcomas that were positive for R337H. CPCs and osteosarcomas that were positive for R337H had marked nuclear accumulation of p53. **CONCLUSIONS:** The current findings demonstrated compellingly that the *TP53* R337H mutation is associated not only with ACT but also with CPC and, to a lesser extent, with osteosarcoma, both of which are core-component tumors of the Li-Fraumeni syndrome. *Cancer* 2011;117:2228–35. © 2010 American Cancer Society.

KEYWORDS: *TP53*, R337H, adrenocortical tumors, choroid plexus carcinoma, osteosarcoma.

The inherited germline arginine-to-histidine substitution at codon 337 (R337H) mutation of the tumor protein 53 gene (*TP53*) is unusually common in southeast Brazil, occurring in an estimated 0.3% of the population,¹ and its frequency is higher than that predicted for other *TP53* germline mutations.² Germline mutations in the *TP53* gene usually are associated with Li-Fraumeni syndrome (LFS) and with LFS-like syndrome (LFLS),^{3,4} which predispose carriers to a broad spectrum of early onset tumors,^{4,5} including pediatric soft tissue and bone sarcomas, central nervous system (CNS) tumors, leukemia, and adrenocortical tumors (ACTs).^{4,5} The vast majority of *TP53* germline mutations that have a known association with LFS and LFLS span sequences that encode the DNA-binding domain of the protein.^{3,4} Other

Corresponding author: José Andrés Yunes, PhD, Centro Infantil Boldrini, R. Dr. Gabriel Porto, 1270, CEP 13083-210, Campinas, SP, Brazil; Fax: (011) 55-19-32893571; andres@boldrini.org.br

¹Molecular Biology Laboratory, Boldrini Children's Center, Campinas, Sao Paulo, Brazil; ²Department of Oncology, Boldrini Children's Center, Campinas, Sao Paulo, Brazil; ³Anatomical Pathology Laboratory, Boldrini Children's Center, Campinas, Sao Paulo, Brazil; ⁴International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee; ⁵Pediatric Hematology and Oncology, State University of Campinas, Campinas, Brazil

We thank Sharon Naron for expert editorial review.

DOI: 10.1002/cncr.25826, **Received:** October 5, 2010; **Revised:** November 8, 2010; **Accepted:** November 9, 2010, **Published online** December 29, 2010 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

TP53 mutations, including the R337H mutation, also have been implicated in tumorigenesis,^{6,7} although the spectrum of tumors associated with these mutations is not well established.

The *TP53* R337H mutation was discovered originally among children with ACT in southern Brazil, where the incidence of ACT is high.⁶ Although it was believed initially that the mutation selectively promoted pediatric ACT,^{6,8,9} our recent study suggested its involvement in the pathogenesis of breast cancer.¹⁰ Moreover, Achatz et al¹¹ identified R337H carriers among individuals from LFS/LFLS families. It is noteworthy that the cancer history of most R337H-positive families does not meet the criteria for LFS/LFLS,⁶ suggesting that the R337H mutation may be associated with a unique spectrum of tumors. Therefore, we investigated the frequency of the *TP53* R337H mutation in different pediatric tumors at a pediatric cancer center serving southeast Brazil.

MATERIALS AND METHODS

Treating Institution and Patient Population

The Boldrini Children's Center (Boldrini), a referral center for childhood hematologic and oncologic diseases, is located in Campinas, Brazil, in the southeastern state of Sao Paulo. Approximately 95% of its patients are referred from the states of Sao Paulo (86.3%) and Minas Gerais (8.5%). It is known that Sao Paulo and the neighboring state of Parana are within the *TP53* R337H mutation cluster. During the period 2002 through 2009, an average of 268 children with newly diagnosed malignancies were admitted to Boldrini annually, including an annual average of 93 patients with leukemia (lymphoblastic and myeloid), 34 patients with lymphoma, 38 patients with brain tumors (2.6 choroid plexus tumor), 15 patients with Wilms tumor, 10 patients with neuroblastoma, 10 patients with soft tissue sarcoma, 10 patients with osteosarcoma, 5 patients with ACT, and 53 patients with other malignancies. Since 2002, all tumor diagnoses at Boldrini have been reviewed histologically for accuracy by 1 of the authors (I.A.C.). Demographic data were obtained from patients' medical records. This study was approved by the Ethical Research Committee of the Faculty of Medical Sciences at the State University of Campinas. That committee waived the signature of informed consent, because this research was conducted using retrospective samples from the tumor bank. The genetic testing of patients' relatives was performed after the families had been informed about the test and had signed the informed consent.

Tumors and Samples

Peripheral blood mononuclear cells (MNCs) and/or tumor samples (bone marrow MNCs, tumor sections, and biopsy specimens) were used for genomic DNA testing.

Adrenocortical tumors

Since 2006, all children at Boldrini with newly diagnosed ACT have been tested for the *TP53* R337H mutation. Testing also has been offered to patients with ACT on active follow-up, and available samples from patients with ACT who have died or lost to follow-up have been evaluated retrospectively. Genomic DNA samples from 70 of 102 patients who had ACT diagnosed at Boldrini between 1982 and 2009 were available for testing.

Central nervous system tumors

Genomic DNA samples from 25 patients with CNS tumors were tested for the *TP53* R337H mutation. These patients were selected only on the basis of availability of frozen tumor samples. After finding that only children with choroid plexus carcinoma (CPC) carried the R337H mutation, we tested samples from an additional 14 patients with choroid plexus tumors (CPT), 9 of whom had CPC and 5 of whom had choroid plexus papilloma (CPP).

Other tumors

Tumor samples other than ACT and CNS tumors that were tested for the R337H mutation included diagnostic bone marrow MNCs from 187 patients with acute lymphoblastic leukemia (ALL) who were enrolled consecutively on the Brazilian ALL protocol GBTLI-99,¹² 49 patients with relapsed ALL, and 44 patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia; diagnostic lymph node biopsy samples from 30 patients who were diagnosed consecutively with lymphoma (Hodgkin lymphoma, = 20; non-Hodgkin lymphoma, n = 10); peripheral blood MNCs from 41 patients who were diagnosed consecutively with osteosarcoma; and tumor biopsy specimens from 25 patients with Ewing sarcoma and 8 patients with rhabdomyosarcoma.

DNA Analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood MNCs (n = 120) or from samples of tumor or leukemia (n = 399) by using standard phenol-chloroform extraction.¹³ In some patients, both tumor tissue and MNCs were available. *TP53* exon 10 was amplified by using primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions

described previously.⁹ The PCR product was digested with *Hha*I (Fermentas Inc., Glen Burnie, Md). This restriction enzyme yields 2 fragments (293 base pairs [bp] and 154 bp) of the wild-type amplicon but only 1 fragment when the R337H mutation is present (the mutation eliminates the restriction site within the amplicon) (Fig. 1A,B). Exon 10 of mutation-positive samples was sequenced by using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif) in an ABI PRISM 3700 automated sequencer (Applied Biosystems) to confirm the guanine-to-adenine transition at the second base of codon 337 (Fig. 1C).

Immunohistochemistry

After dewaxing and rehydration, 5- μ m-thick CPC and osteosarcoma tumor sections were treated with 3% H₂O₂ to reduce endogenous peroxidase activity and then underwent wet heat-mediated antigen retrieval with TRIS-ethylene diamine tetraacetic acid, pH 8.9. The sections were incubated for 1 hour at 37°C with mouse monoclonal anti-p53 antibody (clone DO-7; Dako A/S, Glostrup, Denmark) diluted 1:300. This antibody is specific for an N-terminal epitope and reacts with both wild-type and mutant human p53 proteins. Colon adenocarcinoma sections were stained in parallel as positive controls. For the analysis of INI1 (SWI/SNF-related, matrix associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1 or *SMARCB1*), sections were incubated as described above with the mouse monoclonal anti-INI1 antibody (clone 3E10; ABD Serotec, Raleigh, NC) diluted 1:100. The results were observed by using the standard avidin-biotin complex method with the Dako LSAB+ System horseradish peroxidase kit.

Statistical Analysis

Age at tumor diagnosis was compared between patients with *TP53* R337H mutation-positive and mutation-negative tumors using the Mann-Whitney test. Nominal variables were compared by using the chi-square test (the Fisher test was used when the expected number in a cell was <10). The criterion for statistical significance was $\alpha = .05$. Statistical analyses were conducted with GraphPad Prism software (GraphPad Software Inc., San Diego, Calif).

RESULTS

Adrenocortical Tumors

Like in other pediatric oncology units^{6,8,9} within the *TP53* R337H cluster region, most of our patients with

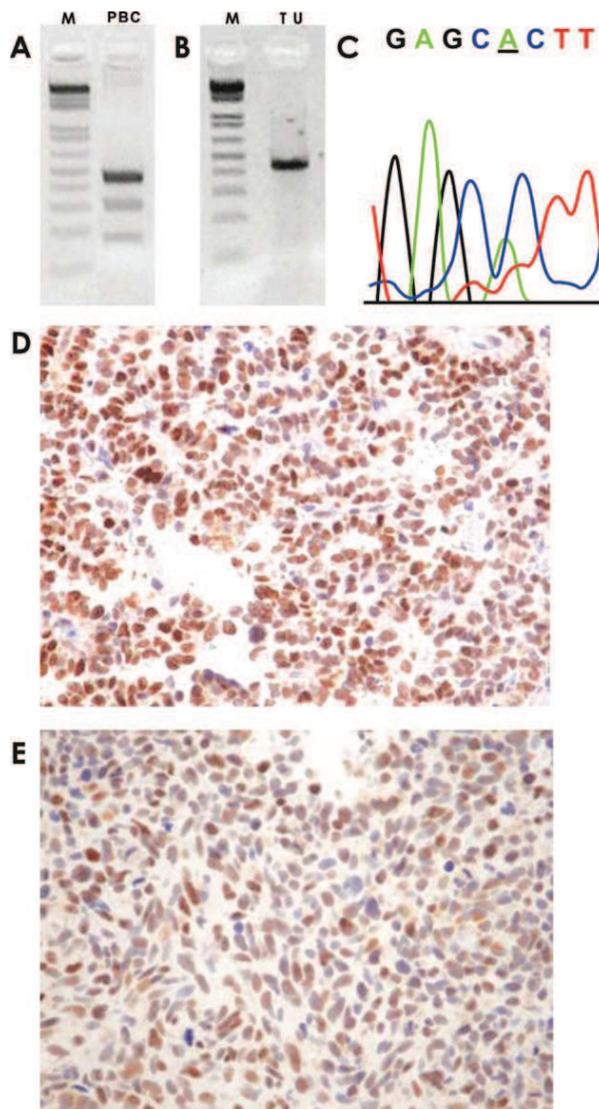


Figure 1. An analysis of mutational status of the arginine-to-histidine substitution at codon 337 (R337H) of the tumor protein 53 gene (*TP53*) is shown. (A) This representative analysis of a DNA sample from peripheral blood cells (PBC) shows a heterozygous pattern: Both the wild-type (293 base pair [bp] fragments and 154-bp fragments) and mutant (447-bp fragment) alleles are detected after digestion with *Hha*I. (B) A similar analysis of a DNA sample from choroid plexus carcinoma (CPC) tumor tissue (TU) shows only the mutated allele, indicating loss of the wild-type allele. M indicates 1-Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, Calif). (C) This chromatogram of the exon 10 region of the *TP53* gene in a CPC tumor sample confirms the guanine-to-adenine (G→A) transition at codon 337 (underlined base). (D,E) Immunohistochemistry reveals the nuclear accumulation of p53 (>80%) in (D) a CPC tumor sample and in (E) an osteosarcoma tumor sample.

Table 1. Prevalence of the Germline Codon 337 Arginine-to-Histidine *TP53* Mutation According to Tumor Type

Tumor Type	No. of Nontumor Samples Tested	No. of Tumor or Leukemia Samples Tested	No. of Patients Positive/Total ^a	Prevalence of R337H, %
AML	0	44	0/44	0
ALL (nonrelapsed) ^b	0	187	0/187	0
ALL (Relapsed) ^c	0	49	0/49	0
CNS tumor ^d	2	24	3/25	12
Choroid plexus carcinoma ^e	7	8	9/13	69
Choroid plexus papilloma ^e	2	3	0/5	0
Ewing sarcoma	0	25	0/25	0
Rhabdomyosarcoma	0	8	0/8	0
Osteosarcoma	41	3	3/41	7
Lymphoma ^f	0	30	0/30	0
Adrenocortical tumor	70	21	65/70	93

AML indicates acute myeloid leukemia; ALL, acute lymphocytic leukemia; CNS, central nervous system.

^a Both nontumor (peripheral blood mononuclear cells) and tumor tissues from some patients were analyzed; therefore, the total number of patients is less than the totals in the second and third columns.

^b Biphenotypic leukemia (n=1), B-cell ALL (n=159), and T-cell ALL (n=27).

^c B-cell ALL (n=37) and T-cell ALL (n=12).

^d The original cohort of 25 patients with astrocytoma (n=7), ependymoma (n=4), choroid plexus carcinoma (n=4), medulloblastoma (n=02), and others (n=8) was used for initial screening.

^e The total number analyzed, including patients who were added after the initial screening (choroid plexus carcinoma, n=13; choroid plexus papilloma, n=5).

^f Hodgkin lymphoma (n=20) and non-Hodgkin lymphoma (n=10).

ACT (65 of 70; 93%) carried this mutation (Table 1). All 21 of the available tumor samples from carriers had loss of heterozygosity (LOH) with retention of the mutated allele. Genomic *TP53* sequence analysis of the 5 children with ACT who did not carry the *TP53* R337H mutation revealed the wild-type sequence in exons 5 through 8. We observed no statistically significant difference in survival between carriers and noncarriers of the mutation ($P = .579$; Fisher exact test).

Central Nervous System Tumors

Three of the 25 CNS tumors that were tested initially on the basis of availability had the *TP53* R337H mutation. Remarkably, all 3 were CPC. Therefore, we investigated additional CPTs. During the study period, 21 of 309 (6.8%) CNS tumors had been diagnosed as CPT. All 21 CPTs that were included in this analysis were immunopositive for INI1 (data not shown). We tested 14 of these tumors for which samples were available. Six of the 9 CPC samples that were tested, but none of the 5 CPP samples that were tested, were positive for the *TP53* R337H mutation. Hence, the mutation was detected in a total of 9 of 13 (69%) CPC samples that were tested (Table 1). Next, we assessed whether the *TP53* R337H mutation played a role in CPC tumorigenesis. Marked nuclear accumulation of p53 (>80% of cells) was noted in all 8 tested CPC samples from carriers of the mutation (Fig.

1D, Table 2). Moreover, LOH with retention of the mutant allele was noted in 2 of 2 tested tumors. Although no statistically significant difference could be detected, CPC appeared to present at an earlier age in patients who carried the *TP53* R337H mutation than in noncarriers (median age at onset: 9 months vs 38 months; $P = .06$; Mann-Whitney test). This difference was not observed in ACT or osteosarcoma ($P = .873$ and $P = .136$, respectively; Mann-Whitney test). CPC also appeared to have a worse outcome in carriers (5 patients with CPC died, 1 patient relapsed, and 3 were in remission) than in noncarriers (2 patients died, and 2 were in remission), although no statistically significant difference could be detected ($P = 1$; Fisher exact test) in these small subsets.

Osteosarcoma

Three of 41 patients with osteosarcoma (7%) were identified as carriers of the *TP53* R337H mutation (Table 1). Their tumor characteristics and outcomes are summarized in Table 3. Two of these patients had osteoblastic osteosarcoma, and the other patient had a small cell osteosarcoma. Two of the 3 tumors had chondroblastic differentiation. LOH with retention of the mutant allele and strong nuclear accumulation of p53 were detected in 2 of the 3 tumors (Fig. 1E). In the third tumor, both the mutated and wild-type alleles were detected in normal and tumor tissues. All 3 of these patients had extremely

Table 2. Characteristics of Patients With Choroid Plexus Tumors Referred During 2002 to 2009

Patient	DX	Sex	Age at DX, mo	TP53 R337H Status		TP53 IHC ^a		Treatment	Outcome
				Normal Tissue	Tumor Tissue	Intensity	Localization		
1	CPC	Boy	13	NA	Positive homozygous	++++	Nuclear	S, C	Death; PD
2	CPC	Girl	12	Negative	NA	NA	NA	S, C	Alive; 6-y DFS
3	CPC	Boy	27	Positive heterozygous	Positive homozygous	++++	Nuclear	S, C, R	Death; PD
4	CPC	Girl	84	NA	Negative	++++	Nuclear	S, C, R	Alive; 5-y DFS
5	CPC	Girl	5	NA	Positive homozygous	++++	Nuclear	S, C	Death unrelated to disease
6	CPC	Girl	27	NA	Negative	++++	Nuclear	S	Death; S complications
7	CPC	Boy	49	NA	Negative	+	Nuclear	C	Death; sepsis during C
8	CPC	Boy	9	Positive heterozygous	NA	++++	Nuclear	S	Death; bleeding during S
9	CPC	Girl	8	Positive heterozygous	NA	++++	Nuclear	S, C, R	Alive; 3-mo DFS
10	CPC	Girl	17	Positive heterozygous	NA	++++	Nuclear	S	Alive; relapsed
11	CPC	Boy	36	Positive heterozygous	Positive homozygous	++++	Nuclear	S, C	Alive; receiving C
12	CPC	Girl	8	Positive heterozygous	NA	NA	NA	S, C	Alive; receiving C
13	CPC	Boy	3	NA	Positive homozygous	+++	Nuclear	S	Death; PD
14	CPP	Girl	24	NA	Negative	0	—	S	Alive
15	CPP	Girl	1	Negative	Negative	0	—	S	Alive; 4-y DFS
16	CPP	Boy	10	NA	NA	0	—	S	Alive; 3-y DFS
17	CPP	Girl	52	NA	NA	NA	NA	S	Lost to follow-up
18	CPP	Girl	29	NA	NA	+++	Nuclear	S	Lost to follow-up
19	CPP	Boy	88	NA	Negative	0	—	S	Alive; 2-y DFS
20	CPP	Boy	11	NA	Negative	0	—	S	Alive; 2-y DFS
21	CPP	Boy	9	Negative	Negative	++++	Nuclear	S	Death; bleeding during S

TP53 R337H indicates the arginine-to-histidine substitution at codon 337 in the tumor protein 53 gene; IHC, immunohistochemistry; CPC, choroid plexus carcinoma; NA not applicable; S, surgery; C, chemotherapy; PD, progressive disease; DFS, disease-free survival; R, radiotherapy; CPP, choroid plexus papilloma.

^aImmunohistochemistry was scored as 0 (no cells positive), + (up to 25% of cells positive), ++ (26% to 50% of cells positive), +++ (51% to 75% of cells positive), or ++++ (≥75% of cells positive).

aggressive tumors with pulmonary metastasis at diagnosis, and all 3 died of progressive disease after a median of 15 months, whereas only 9 of the other 38 patients with osteosarcoma who were not carriers of the *TP53* R337H mutation had died at the time of this report ($P = .021$; Fisher exact test).

Other Tumors

The *TP53* R337H mutation was not detected among patients with ALL ($n = 187$), relapsed ALL ($n = 49$), acute myeloid leukemia ($n = 44$), Hodgkin or non-Hodgkin lymphoma ($n = 30$), Ewing sarcoma ($n = 25$), or rhabdomyosarcoma ($n = 8$) (Table 1).

Geographic Distribution of the *TP53* R337H Mutation

Altogether, 22 carriers of the mutation (ACT, $n = 20$; CPC, $n = 2$) resided in the state of Minas Gerais, suggesting that the *TP53* R337H cluster region includes not only the states of Sao Paulo and Parana but also the southern portion of the state of Minas Gerais (Fig. 2).

DISCUSSION

Here, we present for the first time compelling evidence that the *TP53* R337H germline mutation is strongly associated not only with ACT but also with CPC in this geographic cluster region. Nine of 13 patients (69%) with CPC who were tested at our institution were positive for the mutation. Approximately 7% of pediatric brain tumors evaluated since 2002 have been CPT, for a relative frequency 2 to 3 times that reported in other pediatric brain tumor series.^{14,15} This observation cannot be attributed to referral bias, because our institution has no specific program or unusual expertise in managing this malignancy. Moreover, the ratio of CPP to CPC, which typically is reported as 5:1 in pediatric series,¹⁴ was only 0.6:1 at our center, indicating a surprisingly high relative frequency of CPC, which we estimate to be 5 to 10 times that reported in other series.¹⁴

The incidence of CPC at other institutions within the *TP53* R337H cluster region is not yet known. A high relative frequency of pediatric CPC has been noted at Clinics Hospital in Curitiba, Brazil, which is within the cluster region.¹⁶ However, it remains to be determined whether these tumors are associated with the *TP53*

Table 3. Tumor Characteristics and Outcomes of 3 Patients With Osteosarcoma who Carried the Codon 337 Arginine-to-Histidine TP53 Allele

Characteristic	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Osteosarcoma type	Small-cell osteosarcoma; focal chondroblastic differentiation	Osteoblastic osteosarcoma; extensive chondroblastic differentiation	Osteoblastic osteosarcoma
Primary site	Medial distal femur	Proximal humerus	Medial distal femur
Tumor size, cm	13×12×8	8.7×8.5	10×9×9
Soft tissue invasion	Yes	Yes	Yes
Articular cartilage invasion	Yes	Yes	Yes
Neural invasion	No	NA	No
Angiolymphatic invasion	No	NA	No
Pulmonary metastasis	Yes	Yes	Yes
Tumor necrosis ^a	85%	NA	93%
p53 Immunohistochemistry ^b	+++	+++	+
Tumor LOH	Yes	Yes	No
Outcome	Death; PD	Death; PD	Death; PD

NA indicates not available; LOH, loss of heterozygosity; PD, progressive disease.

^a After chemotherapy.

^b Immunohistochemistry was scored as + (up to 25% of cells positive), ++ (26% to 50% of cells positive), +++ (51% to 75% of cells positive), or ++++ (≥75% of cells positive).

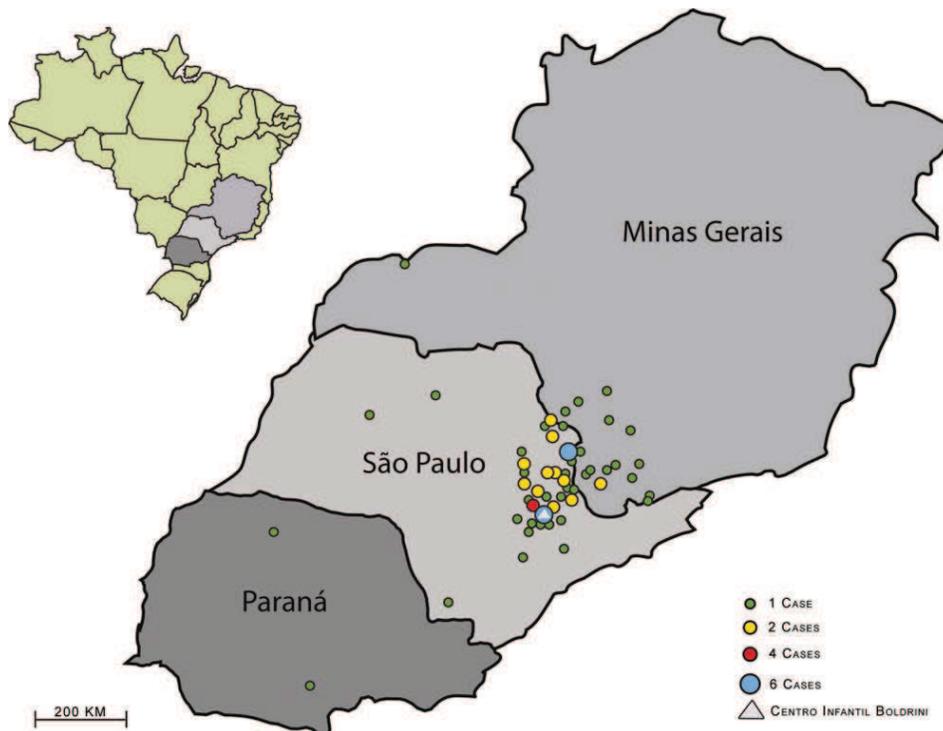


Figure 2. This map illustrates the geographic distribution of individuals in the current study who were positive for the arginine-to-histidine substitution at codon 337 (R337H) of the tumor protein 53 gene (TP53). The states of Parana, Sao Paulo, and Minas Gerais are indicated. The colored circles represent the origin of positive patients. It is known that Parana and Sao Paulo are within the TP53 R337H mutation cluster. The results suggest that the cluster extends northward into the state of Minas Gerais.

R337H mutation. Additional studies of pediatric and adult choroid plexus tumors in conjunction with regional population-based registry data should establish the incidence of these tumors within the cluster region.

ACT and choroid plexus tumor reportedly have occurred simultaneously in a single patient or in related children in families that carry germline TP53 mutations.^{17,18} We did not observe both malignancies in any patient in our series. It is possible that few children who

have CPC associated with the *TP53* R337H survive long enough to develop ACTs.

Loss of the wild-type allele and retention of the mutated allele is considered a hallmark of tumorigenesis mediated by tumor suppressor genes.¹⁹ Virtually all pediatric patients with ACTs who are carriers of the *TP53* R337H have LOH with retention of the mutated allele.⁶ Although only 2 patients with CPC in our series were tested for LOH, both tumors had LOH with retention of the mutated allele. Moreover, 8 of 8 tested cases of CPC among carriers of the *TP53* R337H mutation had strong nuclear localization of p53, suggesting the involvement of this mutation in tumorigenesis. Although the p53 protein expressed by the mutated gene is relatively functional and is not associated typically with LFS or LFLS,²⁰ it may exert a tumor-promoting effect in specific tissues, such as the choroid plexus and the adrenal cortex. This premise is consistent with the recent observation by Tabori et al²¹ that children with CPC who had no history of LFS or LFLS carried *TP53* polymorphisms that reduced p53 activity.

The *TP53* R337H mutation was identified in 7% of our patients with osteosarcoma. This frequency is much higher than that reported for the general population of this region (0.3%) and is higher than that reported for nonselected North American patients with osteosarcoma who had any constitutional *TP53* mutation (3%).²² Investigators at the Clinics Hospital in Sao Paulo also observed an association between osteosarcoma and the *TP53* R337H mutation in this region of Brazil. Those investigators reported that, of 47 patients with osteosarcoma, 8 had tumors with positive immunostaining for nuclear p53, and 4 of those 8 tumors harbored the *TP53* R337H mutation.²³ However, at our institution, the frequency of the mutation was much lower among patients with osteosarcoma than among patients with ACT (93%) and CPC (69%). Moreover, unlike patients with ACT and CPC, patients with osteosarcoma had no evidence of increased frequency, and 1 of 3 patients with osteosarcoma who had the *TP53* R337H mutation retained the wild-type *TP53* allele. Taken together, these results suggest that the *TP53* R337H mutation plays a different role in the development and progression of osteosarcoma than in those of ACTs and choroid plexus tumors.

The *TP53* R337H mutation was not detected in any of our patients with newly diagnosed ALL (n = 187), relapsed ALL (n = 49), or acute myeloid leukemia (n = 44), consistent with the findings of others.²⁴ A recent study identified only 2 patients with leukemia (2.7%) among 75 patients who had *TP53* mutations, and both of

those patients had other primary cancers that were typical of LFS.²⁵ Although an association has been reported between acquired *TP53* mutations and relapsed ALL,²⁶ our results provided no indication that the *TP53* R337H mutation plays a role in ALL relapse in this region. Nor did we identify the *TP53* R337H mutation among 30 patients with lymphoma (Hodgkin lymphoma, n = 20; non-Hodgkin lymphoma, n = 10), 25 patients with Ewing sarcoma, or 8 patients with rhabdomyosarcoma.

The prognostic implications of the *TP53* R337H mutation in children with malignancies remain elusive. There is no evidence that the mutation is associated with prognosis in patients with ACTs. Children with completely resected small tumors have an excellent prognosis, and patients with residual or metastatic disease have a very poor outcome regardless of the presence or absence of the germline mutation.²⁷ In patients with pediatric CPC, prognostic analysis is limited by the small number of patients. A recent study²¹ suggested that *TP53* mutations are associated with a poor prognosis in children with CPC; however, all of the mutations in that study's population affected the p53 DNA-binding domain. Our 3 patients with osteosarcoma who carried the *TP53* R337H mutation had disseminated disease at diagnosis and had dismal outcomes. To fully address the role of R337H in the incidence and prognosis of these tumors, we recommend *TP53* R337H screening for every pediatric patient with CPC or osteosarcoma in southern Brazil.

Currently, there is no evidence of de novo R337H mutations. In this study, 43 families (41 from patients with ACT and 2 from patients with CPC) were tested for the presence of R337H, and the results demonstrated that it was inherited in all cases. The familial cancer histories of our patients who carried the *TP53* R337H mutation were available only from medical records and were not obtained by a genetic counselor. For that reason, we lacked sufficient information to adequately investigate the association between R337H and LFS/LFLS among our patients. However, very few of our carriers' medical records information was compatible with LFS or related syndromes, consistent with reports by others^{6,8,9}; thus, there had been no reason to suspect a germline *TP53* mutation. This finding highlights the need for more inclusive clinical criteria, such as those described by Gonzalez et al,²⁵ for the identification of potential carriers of low-penetrance germline *TP53* mutations. Although the R337H mutation appears to be unique to Brazil, it is likely that it and other low-penetrance *TP53* mutations play a much broader role in human cancers.

CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

This study was supported by a grant from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (PROCAD Project 247/2007). The authors acknowledge support by the St. Jude International Outreach Program through a Center-of-Excellence grant from the State of Tennessee and by the American Lebanese Syrian Associated Charities (ALSAC). Sharon Naron, who provided editorial review, is supported by ALSAC.

REFERENCES

- Piovesan GC. Prevalence of the R337H TP53 Allele in the State of Parana. [dissertation; in Portuguese] Parana, Brazil: Federal University of Parana; 2006.
- Lalloo F, Varley J, Ellis D, et al. Prediction of pathogenic mutations in patients with early onset breast cancer by family history. *Lancet*. 2003;361:1101-1102.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990;250:1233-1238.
- Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*. 1994;54:1298-1304.
- Li FP, Fraumeni JF, Mulvihill JJ, et al. A cancer family syndrome in twenty-4 kindreds. *Cancer Res*. 1988;48:5358-5362.
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:9330-9335.
- Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010;2:1-17.
- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86:4970-4973.
- Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. 2006;43:91-96.
- Assumpcao JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, et al. Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil [serial online]. *BMC Cancer*. 2008; 8:357.
- Achatz MI, Olivier M, Calvez FL, et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett*. 2006;245: 96-102.
- Brandalise SR, Pinheiro VR, Aguiar SS, et al. Benefits of the intermittent use of 6-mercaptopurine and methotrexate in maintenance treatment for low-risk acute lymphoblastic leukemia in children: randomized trial from the Brazilian Childhood Cooperative Group-Protocol ALL-99. *J Clin Oncol*. 2010;28:1911-1918.
- Sambrook J, Russel DW. *Molecular Cloning—A Laboratory Manual*. Volume 2. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press; 1989.
- Wolff JE, Sajedi M, Brant R, Coppes MJ, Egeler RM. Choroid plexus tumors. *Br J Cancer*. 2002;87:1086-1091.
- Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, et al. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors: results from the Central Brain Tumor Registry of the United States, 1990-1994. *Neuro-Oncology*. 1999;1:14-25.
- Torres LF, de Noronha L, Scheffel DL, Pinheiro DL, Gugelmin ES. Choroid plexus tumors: epidemiologic comparative study of 24 cases [in Portuguese]. *Arq Neuropsiquiatr*. 2004;62:127-130.
- Russel-Swetek A, West AN, Mintern JE, et al. Identification of a novel TP53 germline mutation E285V in a rare case of paediatric adrenocortical carcinoma and choroid plexus carcinoma. *J Med Genet*. 2008;45:603-606.
- Wang L, Cornford ME. Coincident choroid plexus carcinoma and adrenocortical carcinoma with elevated p53 expression: a case report of an 18-month-old boy with no family history of cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2002;126:70-72.
- Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971;68:820-823.
- DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*. 2002;9:12-16.
- Tabori U, Shlien A, Baskin B, et al. TP53 alterations determine clinical subgroups and survival of patients with choroid plexus tumors. *J Clin Oncol*. 2010;28:1995-2001.
- McIntyre JF, Smith-Sorensen B, Friend SH, et al. Germline mutations of the p53 tumor suppressor gene in children with osteosarcoma. *J Clin Oncol*. 1994;112:925-930.
- Oliveira CR, Mendonca BB, Camargo OP, et al. Classical osteoblastoma, atypical osteoblastoma, and osteosarcoma: a comparative study based on clinical, histological, and biological parameters. *Clinics (Sao Paulo)*. 2007;62:167-174.
- Wada M, Bartram CR, Nakamura H, et al. Analysis of p53 mutations in a large series of lymphoid hematologic malignancies of childhood. *Blood*. 1993;82:3163-3169.
- Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, et al. Beyond Li Fraumeni syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol*. 2009;27:1250-1256.
- Marks DI, Kurz BW, Link MP. High incidence of potential p53 inactivation in poor outcome childhood acute lymphoblastic leukemia at diagnosis. *Blood*. 1996;87:1155-1161.
- Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol*. 2004;22:838-845.

4.1.2 Expressão das isoformas da p53 e sua associação com a tecido-especificidade da R337H

Os resultados apresentados em 4.1.1 corroboraram o fato de que a mutação R337H está associada ao desenvolvimento de outros tumores além do TCA. Entretanto, alguns tecidos são preferencialmente afetados pela presença da R337H, como é o caso da glândula adrenal, mamas, plexo coroide e ossos.

Para investigar a hipótese de que o padrão de expressão das isoformas da p53 poderia influenciar a suscetibilidade de alguns tecidos à presença da R337H e resultar na ocorrência de câncer apenas em um determinado conjunto de tecidos, caracterizamos a expressão de 06 das 09 isoformas da p53 (Figura 9) em 71 amostras teciduais. As amostras analisadas incluíram tumores da glândula adrenal (n=29), glândula adrenal não-tumoral (n=01), leucemia mielóide aguda (n=04), leucemia linfóide aguda (n=04), linfoma (n=04), rabdmiossarcoma (n=02), tecido muscular não-tumoral (n=01), sarcoma de Ewing (n=03), osteossarcoma (n=05), carcinoma do plexo coroide (n=05), papiloma do plexo coroide (n=03), tumores do sistema nervoso central exceto tumores do plexo coroide (n=05; astrocitoma n=02, ependimoma n=01, oligodendroma n=01, meduloblastoma n=01) e neuroblastoma (n=05) (Figura 10). Nos casos em que não houve amplificação do controle positivo (β -globina), a amostra não foi considerada. A análise estatística dos resultados obtidos por RT-PCR não revelou a existência de um padrão diferencial de expressão das isoformas de p53 entre o grupo de tumores associados a R337H e o grupo dos tumores não associados (Tabela 2; $p=0.39$, teste t).

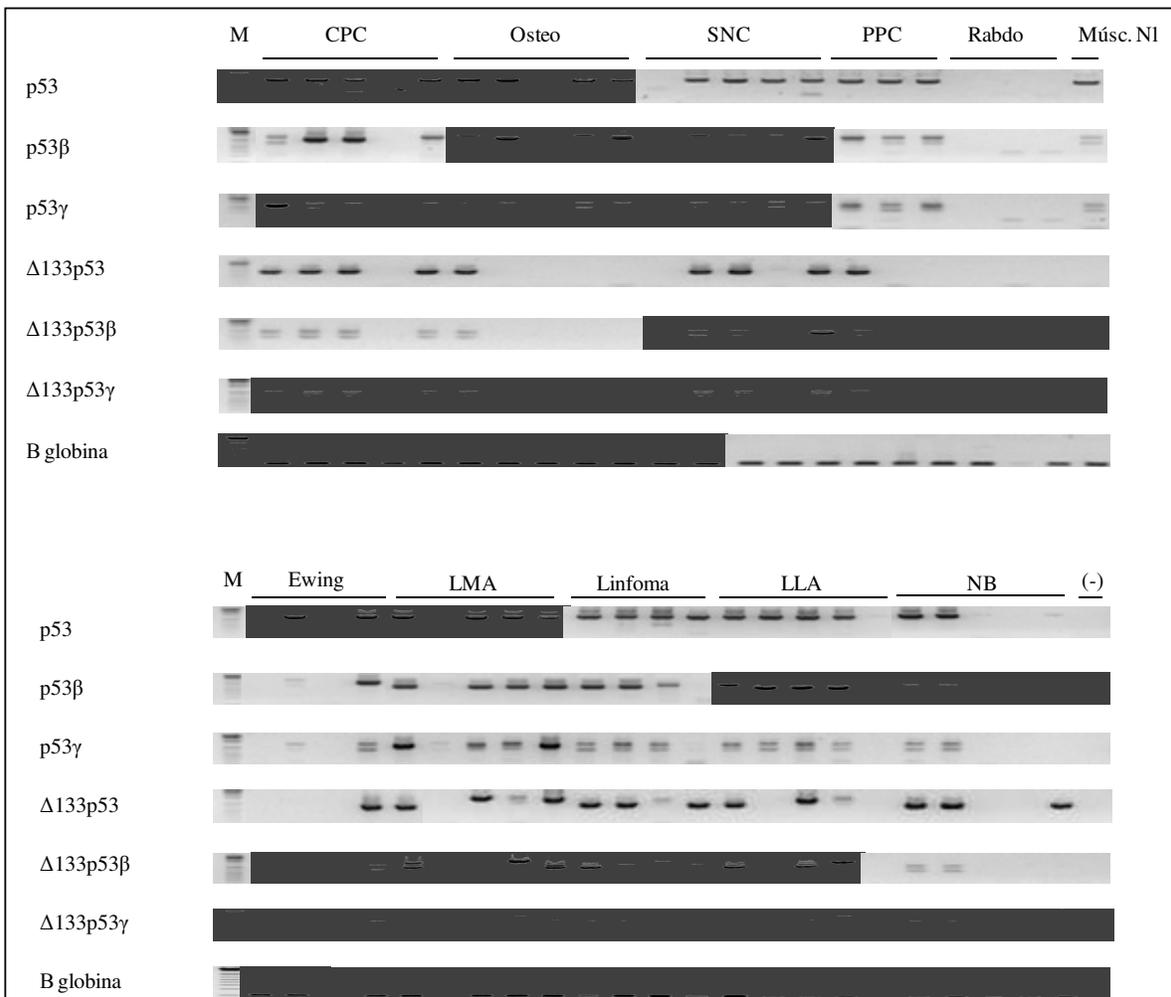


Figura 10: RT-PCR para detecção das isoformas da p53. Gel de agarose mostrando a expressão de 06 diferentes RNAm do *TP53*. As amostras de TCA não foram mostradas. M – marcador de peso molecular; CPC – carcinoma do plexo coróide; Osteo – osteossarcoma; SNC – tumores do sistema nervoso central exceto CPC; CPP – papiloma do plexo coróide; Rabdo – rabiomiossarcoma; Músc. NI – tecido muscular normal; Ewing – sarcoma de Ewing; LMA – leucemia mielóide aguda; LLA – leucemia linfóide aguda; NB – neuroblastoma; (-) – controle negativo.

Tabela 2: Padrão de expressão das isoformas da p53 em tumores associados e não associados à mutação R337H.

Isoforma	Presença em tumores associados a R337H % (positivos/total)	Presença em tumores não associados a R337H % (positivos/total)
p53	95% (43/45)	85% (22/26)
p53β	91% (41/45)	80% (21/26)
p53γ	91% (41/45)	80% (21/26)
Δ133p53	58% (25/45)	61% (16/26)
Δ133p53β	56% (24/45)	61% (16/26)
Δ133p53γ	56% (24/45)	61% (16/26)

Tumores associados a R337H: tumor de córtex adrenal, adrenal normal, carcinoma do plexo coróide, osteossarcoma e neuroblastoma (dados não publicados). Tumores não associados a R337H: rabdomiossarcoma, astrocitoma, ependimoma, oligodendroma, meduloblastoma, papiloma do plexo coróide, sarcoma de Ewing, leucemia mielóide aguda, linfoma, leucemia linfoblástica aguda e músculo normal.

Capítulo 2

Alterações genéticas associadas à tumorigênese em portadores da mutação R337H.

4.2.1 Sujeitos da pesquisa

Desde 1982 até 2011, foram admitidos 113 pacientes para o tratamento do TCA no Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini, dos quais 67% eram do sexo feminino e 33% do sexo masculino. Entretanto, alguns destes pacientes foram perdidos de segmento, portanto as análises que seguem foram realizadas considerando 107 pacientes. A média da idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 3.4 anos e a mediana de 2.2 anos (4 meses - 23 anos).

Com relação ao estadiamento da doença, 49 pacientes foram classificados com doença estadio I, 29 pacientes estadio II, 21 pacientes estadio III e 08 pacientes estadio IV.

4.2.2 Análise da presença da mutação R337H em pacientes com TCA e seus familiares

Dos 113 pacientes que foram recebidos no Centro Infantil Boldrini com o diagnóstico do TCA, foi possível obter amostra de 84 deles para investigação da mutação R337H do gene *TP53*. Destes, 90% eram portadores da mutação R337H. Esta porcentagem variou ligeiramente da publicada na série descrita em Seidinger *et al.*, 2011 pois após a conclusão do trabalho mencionado, 14 pacientes foram analisados e somados à série descrita anteriormente.

Adicionalmente aos pacientes, 177 familiares de pacientes foram testados para a presença da mutação R337H, sendo que foram identificados 81 indivíduos positivos e 96 indivíduos negativos. Não foram identificados indivíduos homozigotos nesta série de pacientes e nenhuma evidência de mutação *de novo* foi encontrada.

4.2.3 Análises de cariótipo e FISH do gene *TP53*

De acordo com a hipótese inicial deste trabalho de tese, foram realizadas análises de cariótipo e FISH do gene *TP53* em células do sangue periférico dos portadores da mutação R337H com o objetivo de verificar a ocorrência de alterações cromossômicas numéricas e/ou estruturais que pudessem ajudar a explicar o padrão de segregação desta mutação aparentemente diferente do esperado para os padrões Mendelianos.

Foram realizadas análises de cariótipo convencional em 22 pacientes portadores da mutação R337H que desenvolveram o TCA. Visando melhorar a resolução da técnica de cariotipagem por bandamento G, padronizamos a utilização de um agente intercalante, o brometo de etídeo, na cultura de células antes da adição de colchicina, inibidor da formação do fuso mitótico. A adição de brometo de etídeo pode aumentar o padrão de 400 bandas por conjunto haplótipo (sem adição de brometo de etídeo) para até 600-700 bandas (com adição de brometo de etídeo) (Muravenko *et al.*, 2003) Os resultados com 7,5 µg / mL de brometo de etídeo adicionados 1 hora e 30 minutos antes do início do processo de hipotonia foram bastante satisfatórios (Figura 11).

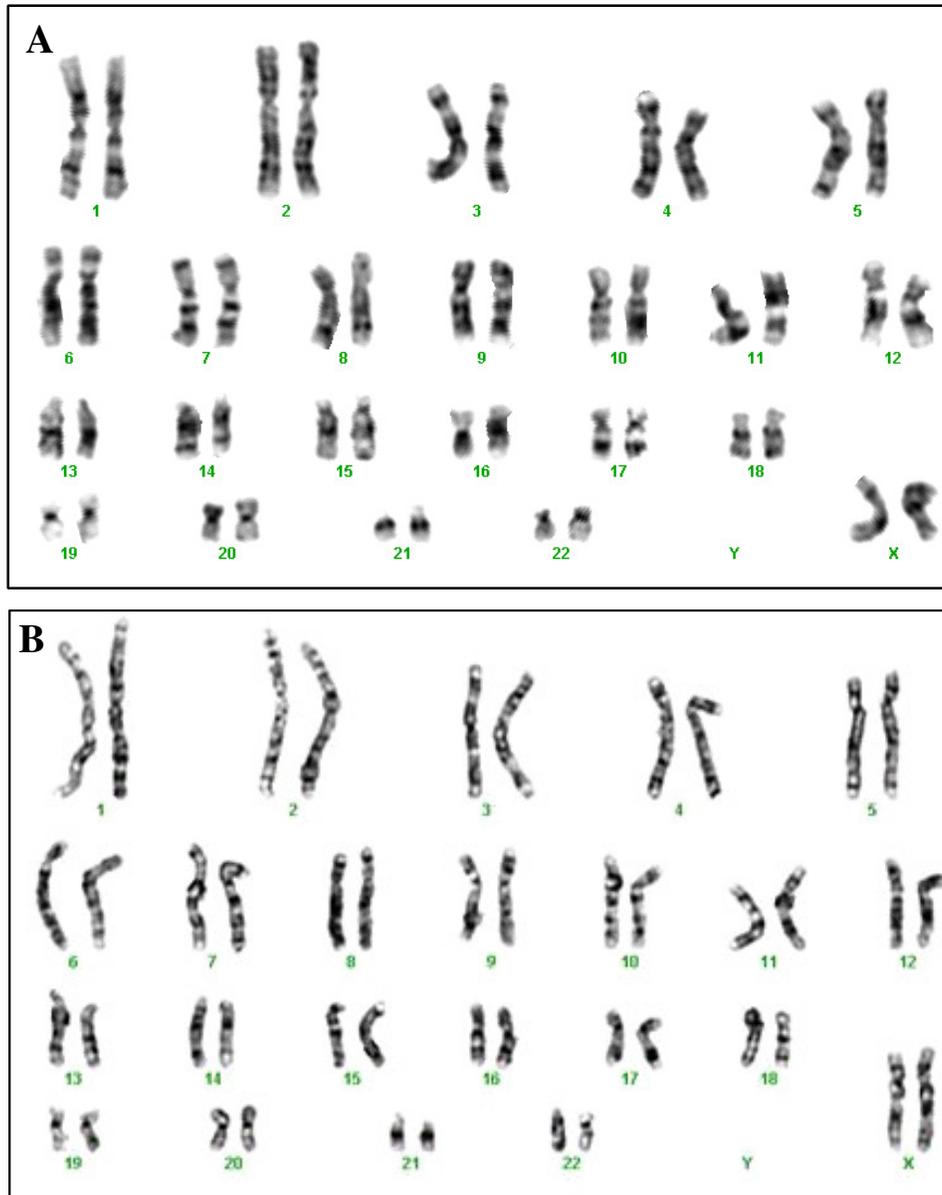


Figura 11: Comparação entre o padrão de resolução das bandas sem adição de brometo de etídeo (A) e com adição de brometo de etídeo (B) na análise do cariótipo.

Nenhum dos 22 pacientes estudados apresentou alterações cromossômicas passíveis de visualização pela técnica, mesmo com a adição de brometo de etídeo na cultura de células, o que aumentaria as chances de detecção de alterações cromossômicas mais sutis (Figura 12A, B).

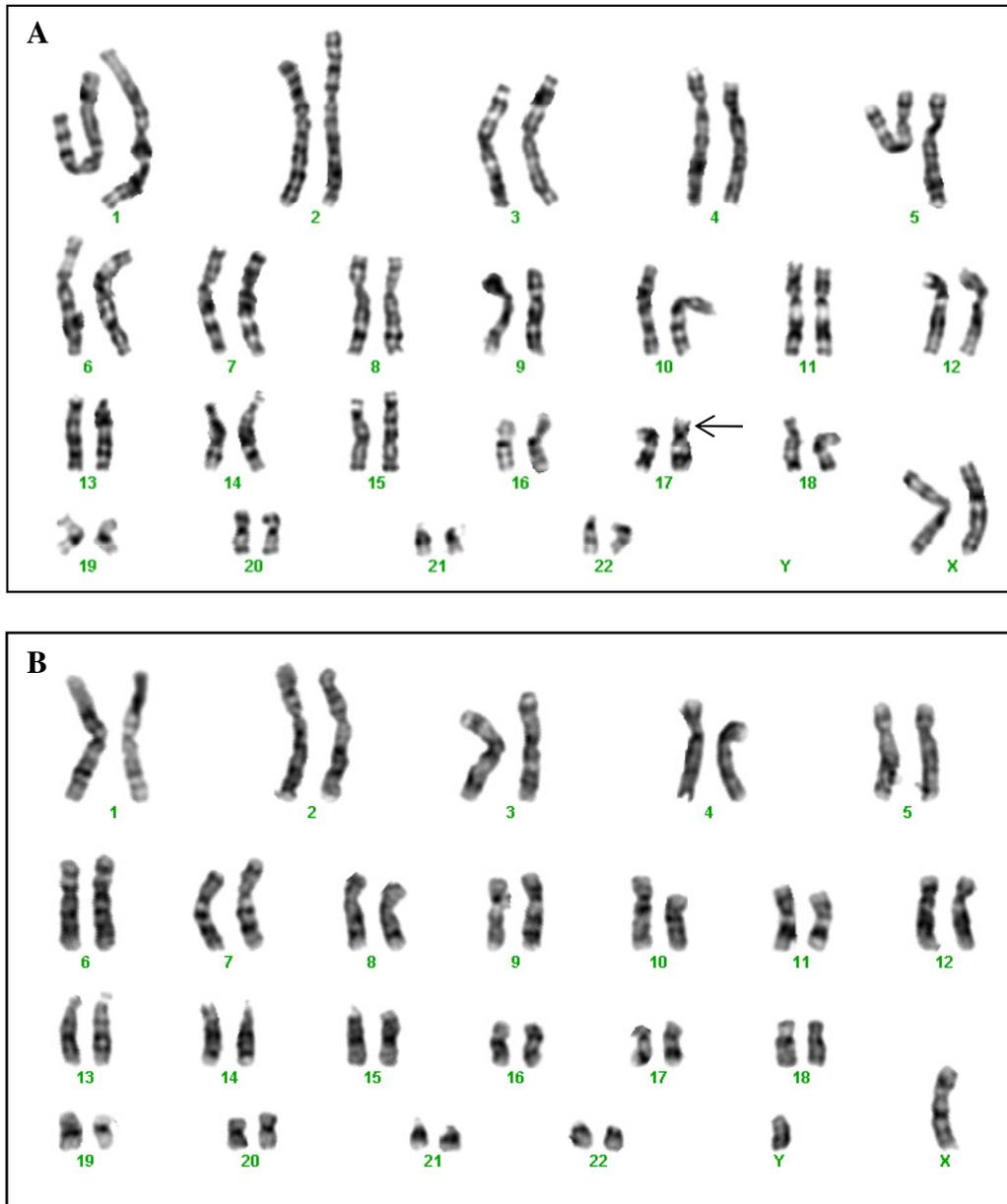


Figura 12: Cariótipo representativo de um paciente com TCA do sexo feminino (A) e do sexo masculino (B). O gene *TP53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 (indicado pela seta). A figura demonstra a ausência de alterações estruturais e numéricas passíveis de visualização pela técnica.

Para verificar alterações no *TP53* que não poderiam ser visualizadas através da análise do cariótipo dada a resolução limitada desta técnica, realizamos a hibridização in situ fluorescente (FISH) em células interfásicas do sangue periférico de pacientes com a R337H. Dos 76 pacientes com TCA portadores da mutação R337H foi possível obter amostra do sangue periférico de 45 deles para a análise do *TP53* por FISH. Os experimentos realizados com a sonda LSI p53 (Figura 13) em células interfásicas demonstraram que os pacientes portadores da mutação R337H que desenvolveram o TCA apresentam em média 8% das células do sangue periférico com deleção de um alelo do gene *TP53* (Figura 14). Nesta análise, foram incluídos pacientes antes do início do tratamento, durante o tratamento e fora de terapia.

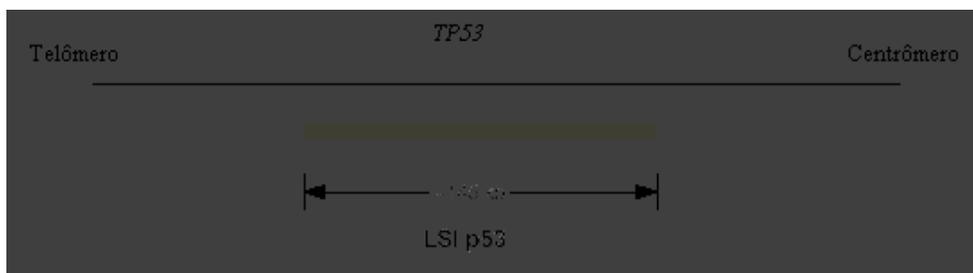


Figura 13: Representação da sonda LSI p53 (17p13.1) utilizada nos experimentos de FISH. Está representado o braço curto do cromossomo 17, evidenciando a localização física do *TP53* e a região de complementaridade da sonda LSI p53.

Os resultados obtidos foram comparados a três grupos controle. Para isto, foram testados 29 portadores da mutação que não desenvolveram câncer, 19 indivíduos com câncer sem a mutação R337H e 35 indivíduos sem a mutação e sem câncer. O grupo formado por portadores da mutação R337H que não desenvolveram câncer foi composto por familiares de pacientes positivos. O resultado obtido para os portadores da mutação que desenvolveram o TCA, quando comparado aos grupos controle, revela que os indivíduos portadores da mutação que desenvolveram o TCA apresentam uma porcentagem maior de células com alteração no locus correspondente ao *TP53* ($p < 0.0001$, teste Kruskal-Wallis,

pós teste Dunn's Multiple Comparison; Figura 14). Este resultado estabelece uma associação entre a presença da mutação R337H, o mosaicismismo do *TP53* em células do sangue periférico e o desenvolvimento do TCA.

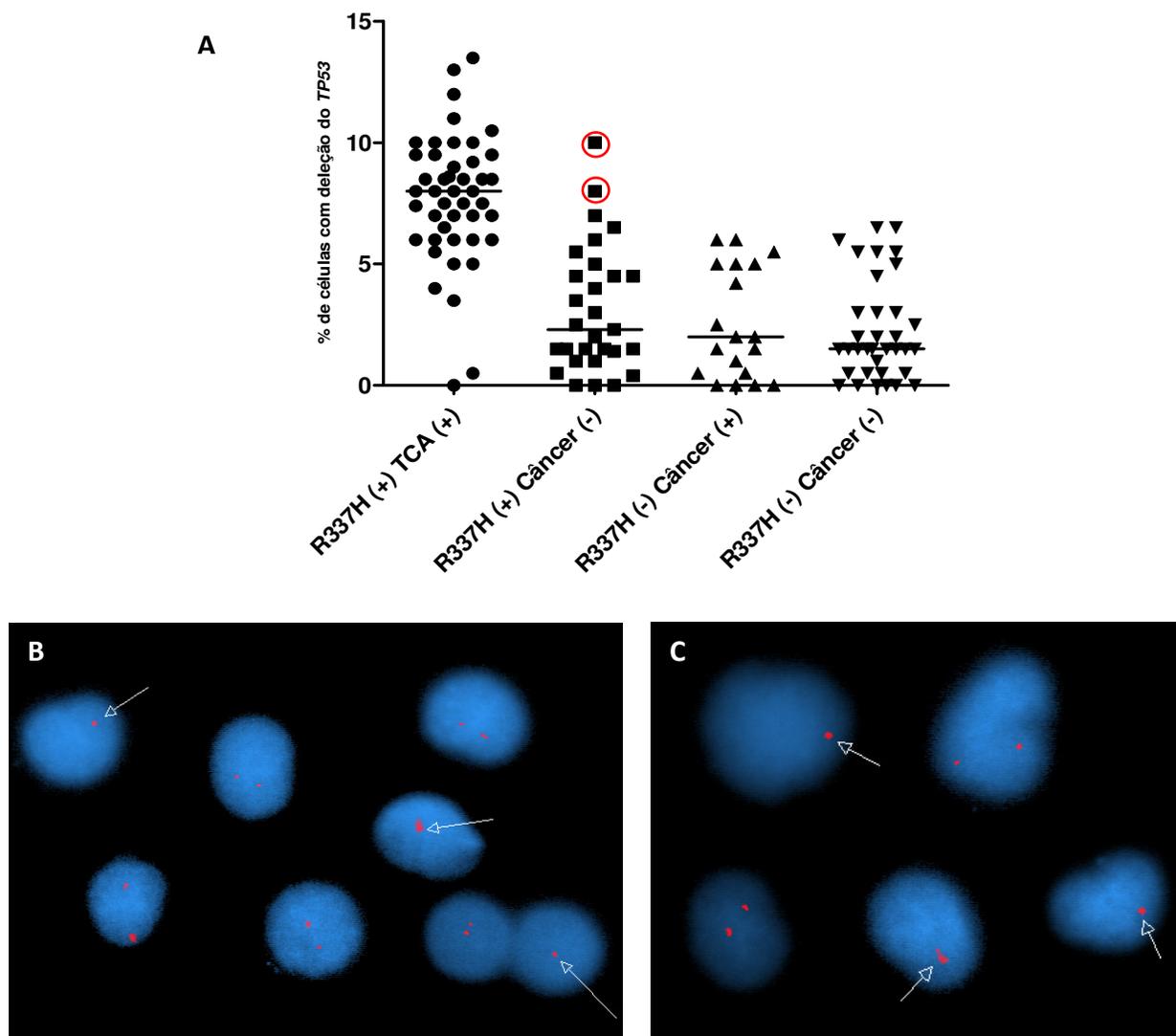


Figura 14: A. Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do *TP53*. O grupo R337H (+) TCA (+) é estatisticamente diferente dos outros três, enquanto nenhum dos outros é diferente entre si ($p < 0.0001$). Os indivíduos identificados por um círculo vermelho são dois portadores da R337H que não desenvolveram câncer, porém foram estudados aos 2 e 9 anos de idade, o que significa que eles ainda estão na faixa de risco para o desenvolvimento do TCA. B, C. Células interfásicas do sangue periférico com deleção de um dos alelos do *TP53*. As setas indicam os núcleos com deleção (presença de somente um sinal vermelho; $n = 200$ núcleos analisados). Imagens representativas da análise de dois pacientes.

Shlien e colaboradores levantaram a hipótese de que a exposição a agentes quimioterápicos poderia influenciar no acúmulo de alterações cromossômicas conhecidas como CNV (*Copy Number Variations*) em portadores de mutações germinativas no *TP53* (Shlien *et al.*, 2008). Apesar de boa parte dos pacientes ter sido analisada antes do início do tratamento, para verificar esta hipótese, dividimos a população de pacientes analisada entre pacientes com estadio I e II da doença e III e IV (Figura 15).

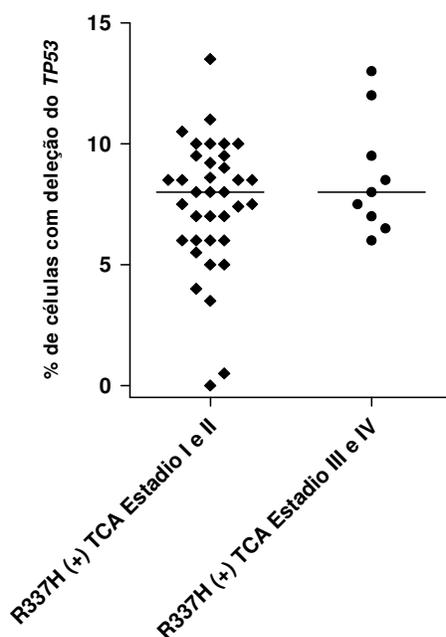


Figura 15: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do *TP53* e estadio da doença.

Não foi identificada diferença significativa na porcentagem de células com deleção do *TP53* comparando-se os pacientes estadio I e II ($p=0.62$, Mann-Whitney test). Dado que os pacientes com TCA estadio I e II não recebem tratamento quimioterápico e não há diferença estatística entre o grupo de pacientes estadio I/II e III/IV ($p=0.48$, Mann-Whitney), podemos sugerir que a presença da deleção do *TP53* não se trata de uma consequência do efeito de drogas quimioterápicas, que reconhecidamente podem induzir danos ao DNA.

Com o objetivo de determinar se a deleção encontrada pelo FISH do *TP53* é específica do locus 17p13.1 ou se está ocorrendo a perda do cromossomo 17 inteiro, utilizamos o probe Miller-Dieker LIS (17p13.3) / Smith-Magenis RAI (17p11.2) (Kreatech Diagnostics), o qual contém duas sondas de 350 kb e 250 kb que flanqueiam o *TP53*, hibridizando respectivamente nos loci 17p13.3 e 17p11.2. Embora os resultados da análise do cariótipo dos pacientes com TCA (Figura 12) sugerem que não há perda do cromossomo 17 inteiro, vale lembrar que as análises de cariótipo são realizadas em células metafásicas que foram estimuladas pela fitohemaglutinina e entraram em mitose. Este processo pode causar um viés, selecionando células sem a referida alteração cromossômica, uma vez que células com a deleção do *TP53* poderiam não estar aptas a responder a este processo e, portanto, estariam sub representadas nas análises de cariótipo.

A análise com a sonda Miller-Dieker LIS (17p13.3) / Smith-Magenis RAI (17p11.2) em células interfásicas do sangue periférico (n=200) no controle e no paciente com deleção do *TP53*, revelou a dupla marcação verde-vermelho em ambos os cromossomos (Figura 16). Os resultados sugerem, portanto, que a perda do *TP53* encontrada em cerca de 8% das células dos pacientes com TCA (Figura 14) é uma perda intersticial, que preserva o restante do braço curto do cromossomo 17, tanto na direção centromérica quanto na direção telomérica.

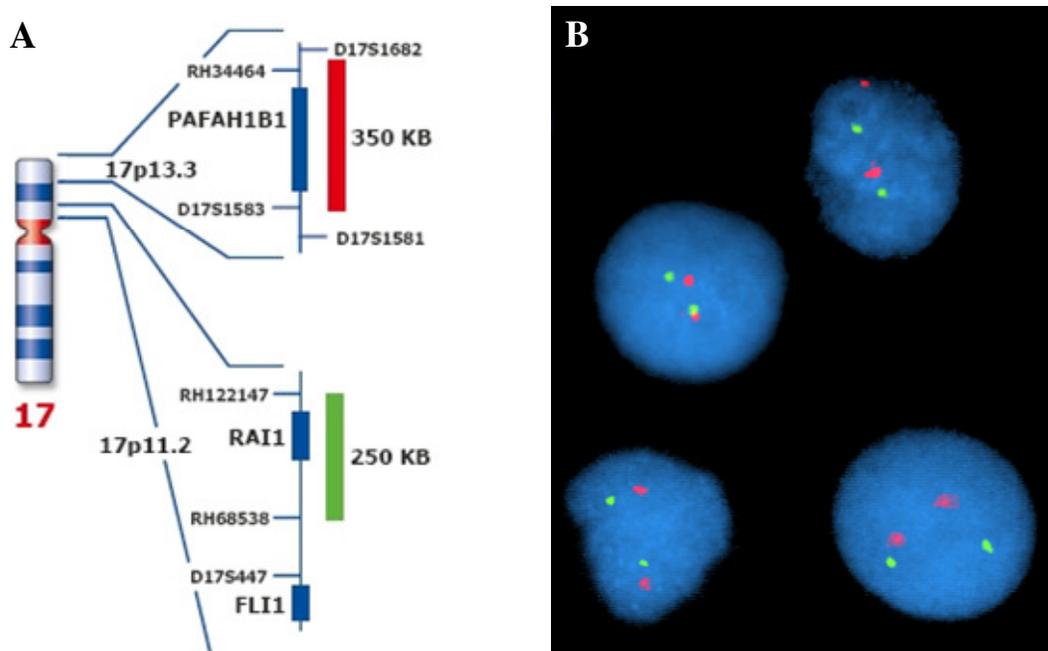


Figura 16: Análise com a sonda Miller-Dieker LIS (17p13.3) / Smith-Magenis RAI (17p11.2) em células interfásicas do sangue periférico. (A) Representação do cromossomo 17 evidenciando as regiões telomérica e centromérica onde hibridizam as sondas Miller-Dieker LIS (17p13.3) em vermelho e Smith-Magenis RAI (17p11.2) em verde. (B) Resultado da hibridização em células interfásicas do sangue periférico, demonstrando que as regiões telomérica e centromérica estão presentes em todas as células do paciente com deleção do *TP53*, sugerindo que a mesma acomete o braço curto do cromossomo 17 de maneira intersticial (n=200 núcleos analisados).

Para verificar se a presença da deleção do *TP53* em células do sangue periférico está associada somente ao desenvolvimento do TCA ou também às outras neoplasias em portadores da R337H, realizamos o FISH do gene *TP53* em pacientes pediátricos portadores da mutação que desenvolveram tumor do plexo coróide (TPC, n=06). Os resultados indicaram que a associação encontrada com o TCA não ocorreu com o tumor de plexo coróide (p=0.26 Kruskal-Wallis test; Figura 17).

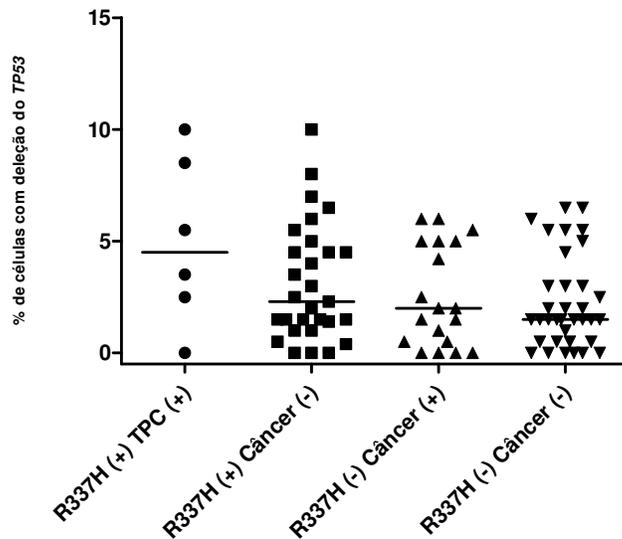


Figura 17: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do *TP53*. O grupo de pacientes portadores da R337H que desenvolveu tumor de plexo coróide não difere dos demais grupos analisados ($p=0.26$; Kruskal-Wallis test).

Além dos pacientes com tumor de plexo coróide, a deleção do *TP53* foi investigada em portadores da R337H que desenvolveram câncer na idade adulta ($n=05$). Dentre os indivíduos analisados, dois pacientes tiveram câncer de mama, um câncer de garganta, um câncer retal e um coriocarcinoma. Nestes casos, os indivíduos analisados não eram pacientes diagnosticados e tratados no Centro Infantil Boldrini e, portanto, o diagnóstico foi informado pelo próprio paciente ou familiar, sem análise do laudo anátomo-patológico. Da mesma forma que os pacientes com tumor de plexo coróide, nos pacientes adultos também não foi encontrada associação entre a deleção do *TP53* e a ocorrência de câncer ($p=0.35$ Kruskal-Wallis test; Figura 17).

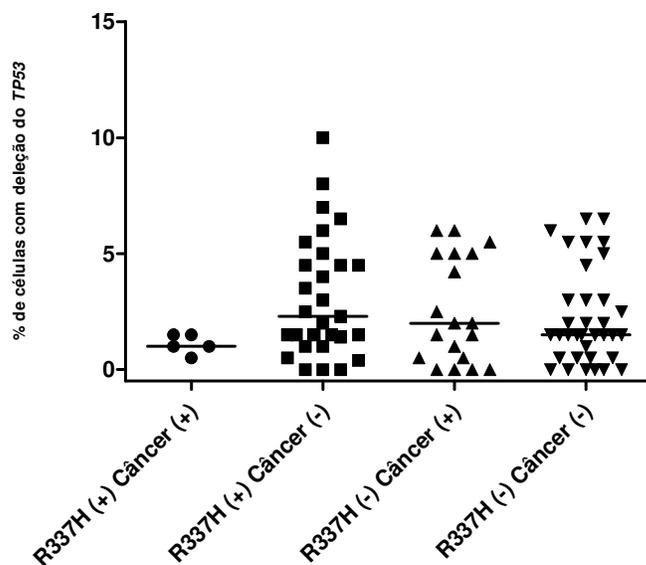


Figura 18: Distribuição dos indivíduos analisados de acordo com a porcentagem de células do sangue periférico com deleção do *TP53*.

4.2.4 Origem das células com deleção do *TP53* em portadores da R337H

Uma vez que o tumor da adrenal apresenta perda de heteroziguidade nos portadores da R337H (Seidinger *et al.*, 2011), suspeitamos que as células com deleção do *TP53* encontradas no sangue periférico dos pacientes poderiam se tratar de células tumorais circulantes. Entretanto, a morfologia dos núcleos que contém a deleção do *TP53* é característica das células sanguíneas. A captura de imagens sem a utilização do filtro para detecção do DAPI ressalta o aspecto segmentado característico dos núcleos de células do sangue periférico (Figura 19). Além disto, se as células com deleção do *TP53* detectadas no sangue se tratassem de células tumorais, os pacientes deveriam estar apresentando sinais clínicos da doença, o que não é o caso da grande maioria deles, que já se encontram fora de terapia há anos.

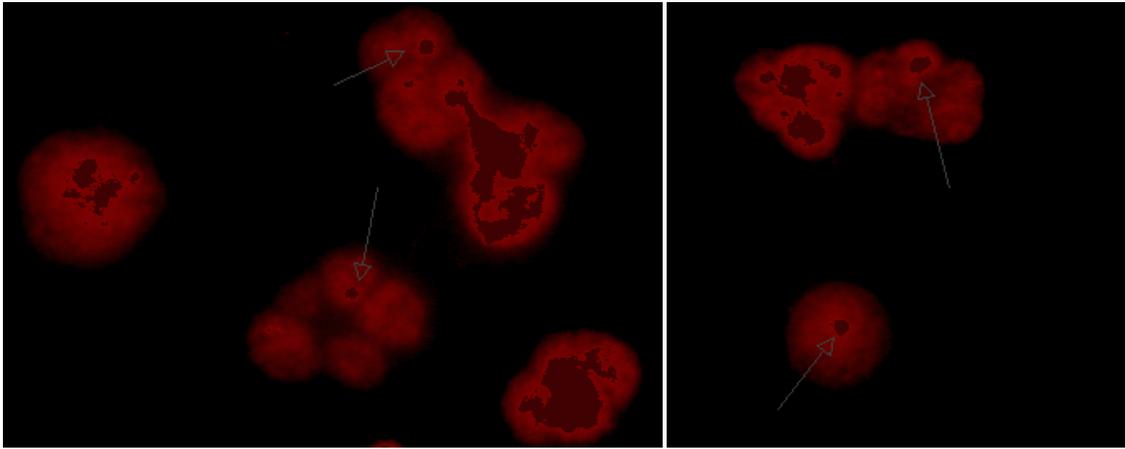


Figura 19: Captura de imagens do FISH do *TP53* em núcleos interfásicos sem a utilização do filtro para detecção do DAPI, ressaltando o aspecto segmentado característico dos núcleos de células do sangue periférico. A seta indica os núcleos com deleção do *TP53*.

As células com deleção do *TP53* foram identificadas em portadores da R337H recém diagnosticados com TCA, em tratamento para a doença ou fora de terapia há anos. Este mosaicismo de células normais e células que contém a deleção do *TP53* encontrado nos pacientes sugere que o evento que resulta nesta deleção pode ter ocorrido em algum momento durante a embriogênese.

Considerando que o córtex da adrenal e o sangue derivam do mesmo folheto embrionário (mesoderme), nós postulamos a hipótese de que o mosaicismo presente no sangue periférico também pode estar presente no córtex da adrenal e nos outros tecidos derivados deste mesmo folheto. No córtex da adrenal, logo após o nascimento, ocorre um processo de remodelagem da glândula, em que a zona fetal é eliminada por um processo essencialmente apoptótico. Neste contexto, células com deleção do *TP53* selvagem provavelmente apresentariam uma resistência a este processo de morte celular e se tornariam potenciais clones tumorigênicos (Figura 20).

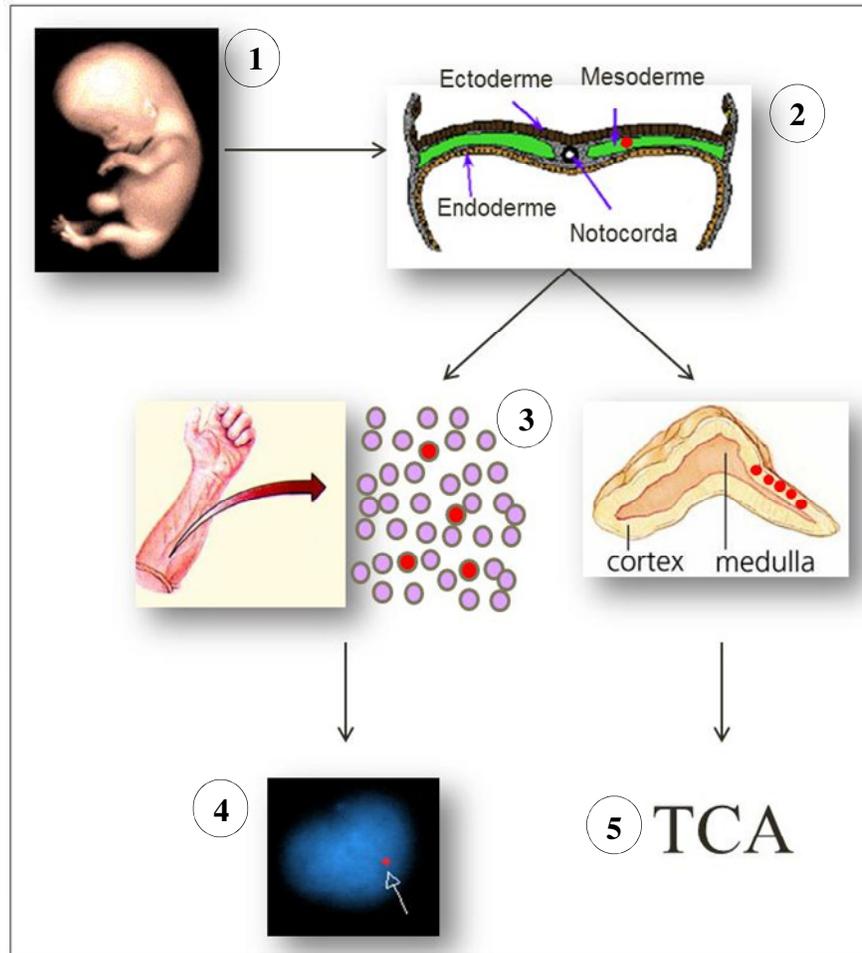


Figura 20: Representação esquemática da hipótese para explicar a associação entre a presença da deleção do *TP53* em células do sangue periférico e a ocorrência do TCA em portadores da mutação R337H. (1) Durante o desenvolvimento embrionário, um evento que resultou na deleção de um alelo do *TP53* afeta uma célula da mesoderme (2). A célula com deleção é indicada por um círculo vermelho. (3) Nos tecidos provenientes deste folheto embrionário, o que inclui o sangue e o córtex da adrenal, observa-se um mosaicismismo de células normais e células que portam a deleção do *TP53* (círculos vermelhos). (4) No sangue periférico, este mosaicismismo foi identificado pelas análises de FISH e no córtex da adrenal (5) as células com deleção do *TP53* selvagem podem se apresentar como potenciais clones tumorigênicos.

Caso esta hipótese fosse verdadeira, esperaríamos encontrar o mosaicismismo de células com deleção do *TP53* também no córtex da adrenal não tumoral destes pacientes. Em um dos pacientes incluídos no estudo, foi possível o reconhecimento do tecido não tumoral

adjacente ao tumor ressecado da glândula adrenal. Neste caso, o médico patologista dissecou o tecido, de forma a obter uma amostra da adrenal não tumoral do paciente. Nesta amostra, realizamos o FISH do gene *TP53* objetivando investigar a presença de mosaicismos no tecido normal da glândula. O resultado obtido revelou a ausência de deleção do gene *TP53* na amostra de adrenal não tumoral.

Este resultado não exclui a ocorrência do mosaicismos no córtex da adrenal, uma vez que, em se tratando de um tecido sólido, as células com deleção poderiam estar agrupadas em uma parte do órgão não analisada.

Outra forma de investigar esta hipótese seria verificar quais as linhagens de células do sangue periférico apresentam a deleção do *TP53*. Se o evento que originou estas células ocorreu durante a embriogênese, todas as linhagens celulares presentes no sangue periférico deveriam apresentar o mosaicismos do gene *TP53*, independente se originadas dos progenitores linfóides ou mielóides (Figura 21). Com o objetivo de verificar esta hipótese, fracionamos o sangue total de um portador da R337H em linfócitos, monócitos e granulócitos e realizamos o FISH do gene *TP53* separadamente em cada uma das frações.

Em uma contagem de 200 núcleos, a deleção do *TP53* foi encontrada em 10% das células do sangue total. Considerando as frações, encontramos a deleção em 9% dos linfócitos, 6.5% dos granulócitos e, apesar de termos obtido uma quantidade baixa de monócitos (contagem de núcleos n=20), a deleção foi encontrada em 10% das células (Figura 22). Este resultado corrobora a hipótese de que uma célula-tronco pode ter perdido um alelo do *TP53* e está originando células-filha com deleção deste gene nos portadores da R337H.

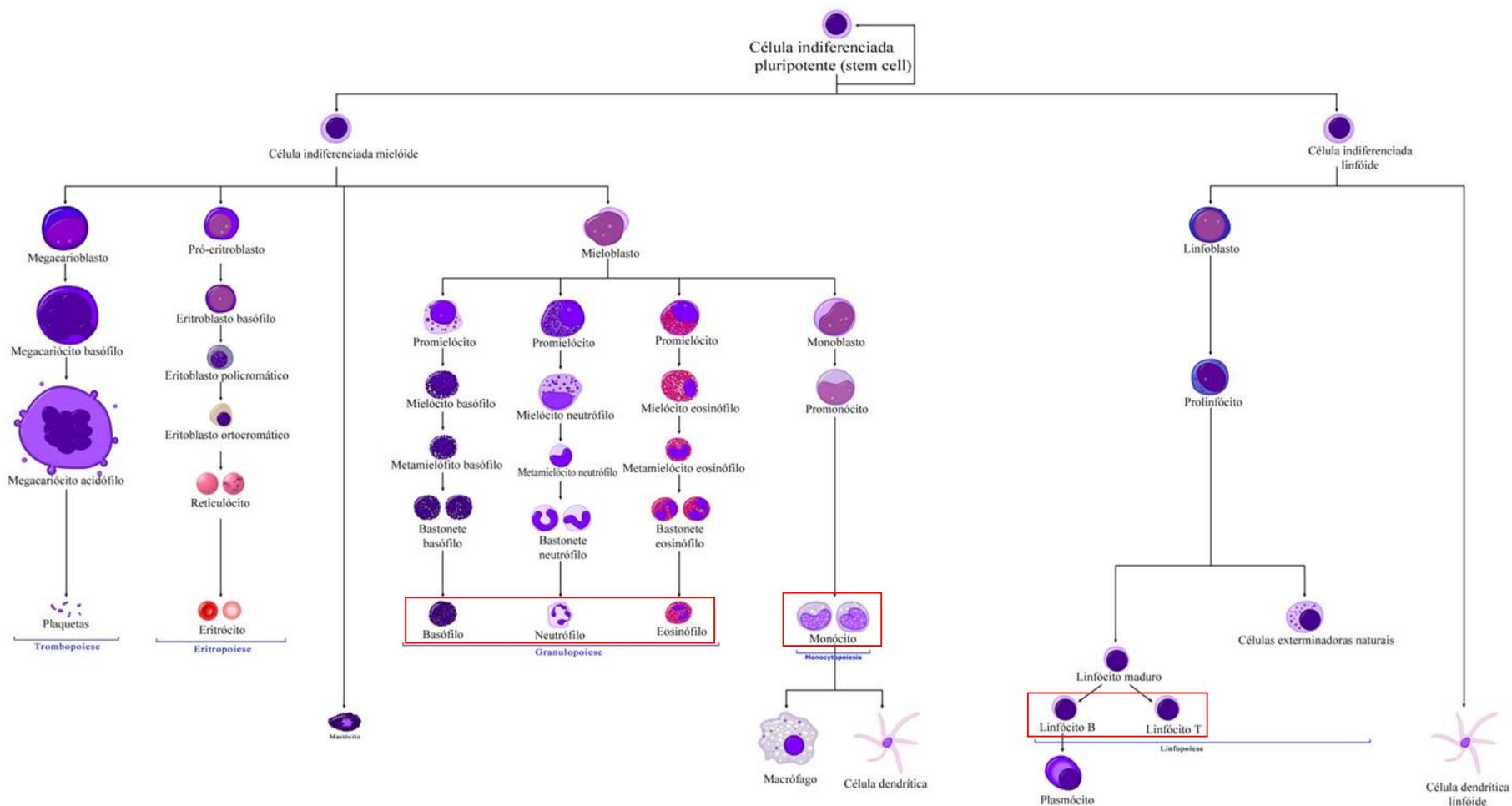


Figura 21: Representação gráfica da hematopoiese. As células-tronco hematopoiéticas originam duas linhagens progenitoras principais: a linfóide e a mielóide. Estas duas linhagens darão origem aos linfócitos, granulócitos e monócitos, indicados na figura por retângulos vermelhos. (fonte: modificado de <http://pt.wikipedia.org/wiki/Hematopoiese>).

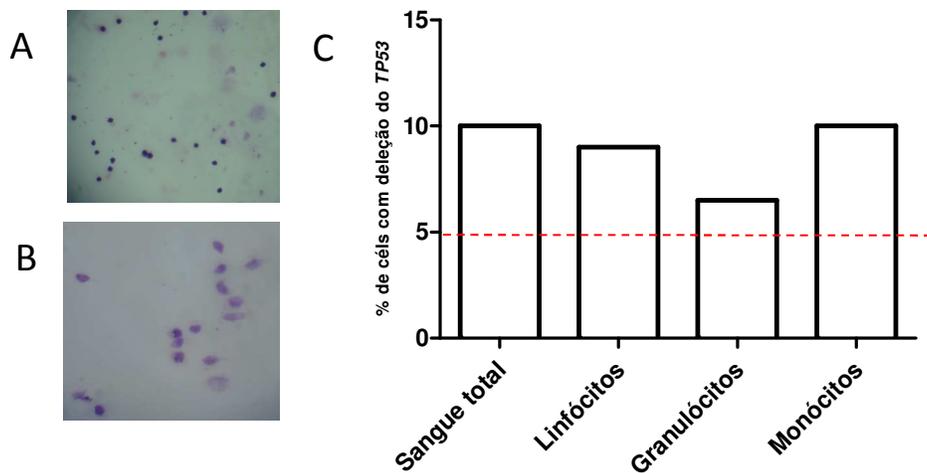


Figura 22: FISH do gene *TP53* em diferentes linhagens de células do sangue periférico. A) Lâmina corada com corante de Wright evidenciando maior proporção de linfócitos na fração correspondente a este tipo celular. B) Lâmina corada com corante de Wright evidenciando maior proporção de monócitos na fração correspondente a este tipo celular. C) Porcentagem de células com deleção do gene *TP53* no sangue total e nas diferentes linhagens celulares do sangue de um portador da R337H. A linha pontilhada indica a faixa de corte de 5%, valor utilizado como referência.

4.2.5 Alelo perdido com a deleção do *TP53*

Com o objetivo de determinar se o alelo selvagem ou mutante foi eliminado com a deleção do *TP53*, clonou-se por PCR a partir de DNA de sangue o exon 10 de um portador da R337H com deleção do *TP53* e um portador da R337H sem deleção em vetor de *E. coli*. Após o crescimento das bactérias, realizamos a genotipagem de pelo menos 230 colônias de cada amostra (Figura 23). Teoricamente, a disponibilidade de insertos selvagens e mutantes na amostra de uma pessoa sem deleção do *TP53* é igual, portanto, a proporção esperada entre colônias contendo o alelo selvagem e o mutante seria de aproximadamente 1:1. A proporção esperada para uma pessoa com deleção deveria se afastar da esperada de 1:1, tendendo a favor do alelo que ficou retido após a deleção. O resultado encontrado para o paciente com deleção foi de 130 colônias selvagens x 137 colônias mutantes. Em um indivíduo sem deleção o resultado foi de 96 colônias selvagens x 117 colônias mutantes. Neste indivíduo sem deleção, a proporção

divergiu muito da proporção esperada de 1:1. Por isso, seria necessário genotipar um número muito alto de colônias para minimizar o erro na contagem de alelos. Desta forma, consideramos que o método não era viável para responder a esta pergunta.

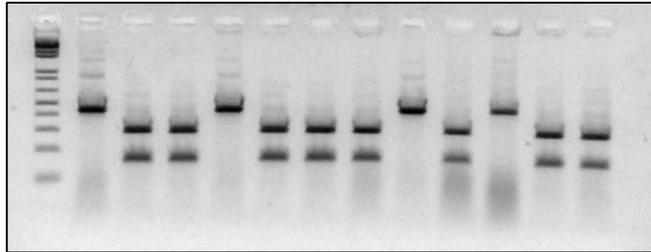


Figura 23: Gel de agarose corado com brometo de etídeo representativo da genotipagem das colônias transformadas com o exon 10 de um portador da R337H com deleção do gene *TP53*. Cada colônia poderia apresentar o padrão do alelo mutante (fragmento de 447 pb) ou selvagem (fragmentos de 293 pb e 154) pb).

Como alternativa a este experimento, foram isoladas células individuais do sangue periférico dos pacientes com deleção do *TP53* através de microscopia óptica. Após purificação do DNA, foi realizada uma reação de PCR, seguida por nested PCR e sequenciamento para genotipagem das células individualmente.

Das 96 células isoladas, houve amplificação no nested PCR em 28 casos. Estes produtos de PCR foram sequenciados e o resultado demonstrou a presença de células hemizigotas selvagem (n=10), hemizigotas mutante (n=06) e heterozigotas (n=05). Em 07 casos a qualidade do sequenciamento não permitiu a conclusão do genótipo (Figura 24).

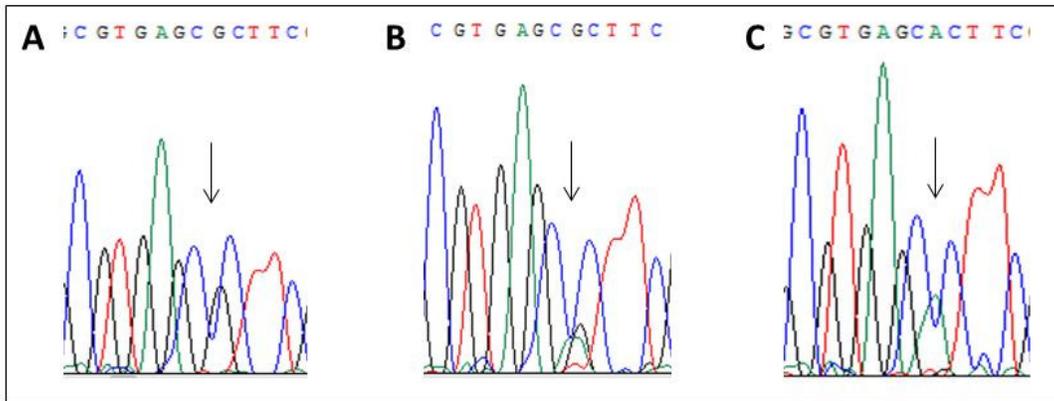


Figura 24: Eletroferograma representativo da genotipagem de uma célula em um estado de (A) hemizigose selvagem, (B) heterozigose e (C) hemizigose mutante. A seta indica a base em que ocorre a transição G → A no códon 337 da p53.

A porcentagem de células em um estado de hemizigose foi maior do que a esperada de 8% (valor médio encontrado no sangue periférico dos pacientes). Este dado pode ser interpretado de duas formas: a primeira delas é que existe uma porcentagem maior de células com deleção de *TP53* no sangue periférico, mas dado o tamanho da sonda utilizada (145 Kb), a mesma só seria detectada nos casos em que a perda de material genético abrange uma grande região. Neste caso, a deleção acometeria os dois alelos, ou seja, estão sendo perdidos tanto o alelo selvagem como o mutante.

Uma segunda hipótese seria a de que, como a reação de PCR foi realizada utilizando-se apenas uma célula como substrato de amplificação, houve um processo de *allele drop-out*, ou seja, um dos alelos foi amplificado preferencialmente nos primeiros ciclos da reação de PCR. Com isso, ao longo dos outros ciclos da PCR, o alelo que foi amplificado no começo da reação ficou super-representado sobre o outro e, portanto, identificamos um falso positivo hemizigoto.

Considerando a segunda hipótese como a mais plausível e para tentar solucionar o problema, foi realizada a genotipagem de células individuais por Real Time PCR, uma técnica que por ser mais sensível do que o PCR convencional talvez minimizasse o efeito de *allele drop-out*.

Os resultados iniciais, assim como no ensaio de sequenciamento, demonstraram hemizigose do alelo selvagem e do alelo mutante. Entretanto, nos ensaios subsequentes em que foram genotipados outros pacientes com deleção, controles sem deleção e controles sem mutação, as contaminações sucessivas inviabilizaram a conclusão sobre este experimento e sobre o alelo perdido na deleção do *TP53*.

4.2.6 Alterações genéticas associadas ao surgimento da deleção do *TP53*

Os experimentos de FISH demonstraram que a deleção do gene *TP53* na forma de mosaico nas células de sangue periférico está associada à presença da mutação R337H e à ocorrência do TCA nestes indivíduos.

A mutação R337H pode ser a causa associada à ocorrência de deleção ou ela pode estar agindo somente como um marcador de outra alteração que co-segrega com ela e suscitibiliza os portadores da R337H à ocorrência da deleção do *TP53*. Para investigar esta hipótese, buscamos por outras alterações cromossômicas nestes indivíduos.

Um primeiro resultado que argumenta contra esta hipótese são as análises de cariótipo dos pacientes com a mutação R337H. Nestas análises não foram evidenciadas alterações cromossômicas grosseiras como deleções, duplicações e trocas de material genético intra e intercromossômicas (Figura 12). Entretanto, como discutido anteriormente, a resolução desta técnica é limitada e alterações mais sutis talvez não pudessem ser identificadas. Por esta razão, realizamos um *Comparative Genomic Hybridization array* (aCGH) do cromossomo 17 de três pacientes do sexo masculino portadores da mutação R337H, que desenvolveram o TCA e que apresentaram 10%, 13.5% e 10% de células do sangue periférico com deleção do *TP53*. O *chip* HG18 CHR17 FT contava, em média, com uma sonda a cada 160 pb e apresentava uma boa cobertura do cromossomo 17, permitindo a identificação de ganhos e perdas de material genético.

Os resultados do aCGH não revelaram alterações como deleções ou inserções próximas ao *TP53* que poderiam contribuir com a instabilidade genômica nesta região (Figura 25). Entretanto, estes experimentos não detectariam variações de sequência ou inversões de regiões cromossômicas.

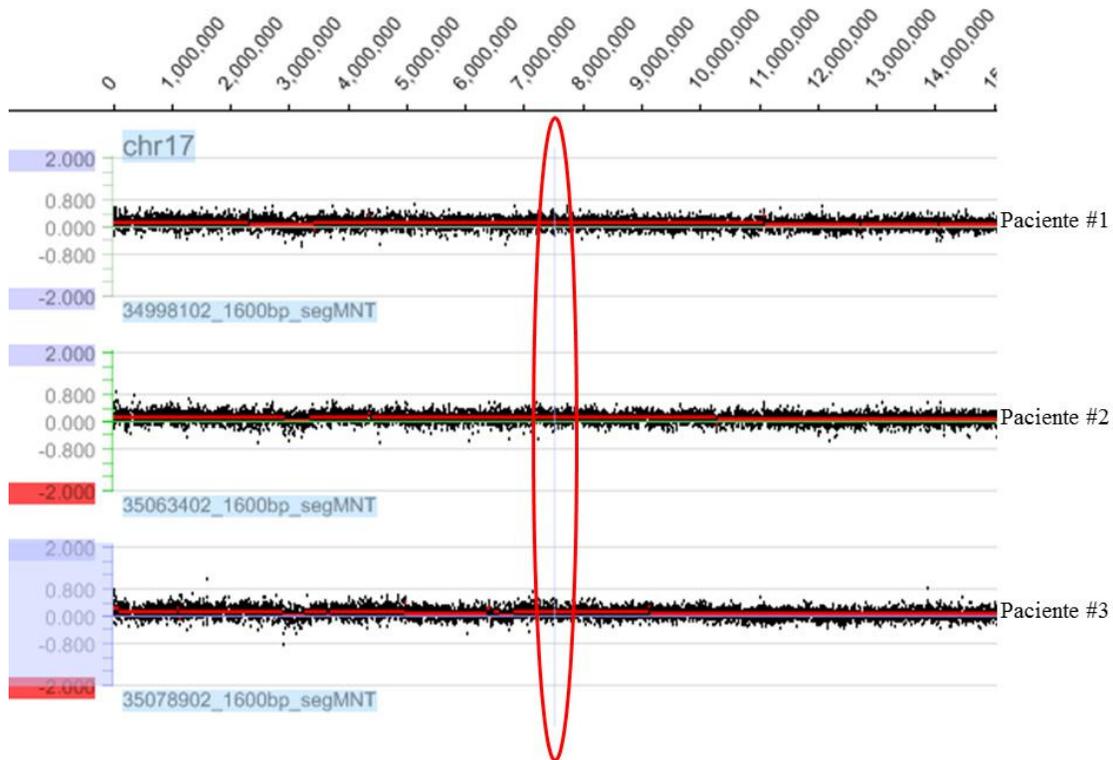


Figura 25: Representação gráfica dos dados obtidos no aCGH, demonstrando a ausência de ganhos e perdas de segmentos cromossômicos na região do braço curto do cromossomo 17 que poderiam estar co-segregando com a mutação R337H. O gene *TP53* está representado por um traço vertical azul e, dada a dificuldade de identificação do mesmo pela escala, ele está evidenciado por um círculo vermelho.

Outro aspecto investigado foi a presença do genoma do Herpes Vírus Humano – 6 (HHV-6) nestes pacientes. Sabe-se que em alguns casos pode haver a integração do genoma viral do HHV-6 no cromossomo hospedeiro, especialmente nas extremidades teloméricas (Nacheva *et al.*, 2008). Com relação ao cromossomo 17, verificou-se que a região onde preferencialmente ocorre a integração é a banda 17p13.3, próximo à extremidade telomérica do braço curto (Morris *et al.*, 1999; Nacheva *et al.*, 2008). A

integração do genoma viral pode desestabilizar o telômero e outras regiões do genoma hospedeiro, tornando-o suscetível à recombinação (Morris *et al.*, 1999). Além disto, pode haver a transmissão vertical do genoma viral, ou seja, a herança do genoma do HHV-6 integrado ao cromossomo que formará o zigoto (Tanaka-Taya *et al.*, 2004).

Caso os portadores da R337H tivessem o genoma do HHV-6 integrado ao seu cromossomo 17, resultando em maior instabilidade e suscetibilidade à ocorrência de deleções, esperaríamos encontrar a maioria dos pacientes (com deleção do *TP53*) positivos para a presença de DNA viral. Além disto, nos tumores em que há perda de heterozigose, sabendo-se que o alelo retido é o mutante, esperaríamos que perto da totalidade dos tumores analisados apresentassem positividade para a presença do DNA viral. Dos 19 pacientes em que foram estudadas amostras de DNA de sangue periférico, 14 mostraram positividade para amplificação do DNA viral por PCR, representando 73,6% da amostra. Dos 06 tumores estudados, somente 01 apresentou positividade para a amplificação do DNA viral, o que nos fez refutar esta hipótese de trabalho.

Deleções cromossômicas podem surgir como consequência de recombinação homóloga desigual, que é mediada por regiões muito parecidas ou até mesmo idênticas de cromossomos homólogos, muitas vezes contendo elementos repetitivos, como elementos Alu ou LCRs (*low copy repeats*) (Jeffs *et al.*, 1998; Kolomietz *et al.*, 2002, Reiter *et al.*, 1996; Edelman *et al.*, 1999; Amos-Landgraf *et al.*, 1999).

Os experimentos de aCGH não revelaram alterações como deleções ou inserções próximas ao *TP53* que poderiam contribuir com a instabilidade genômica nesta região. Entretanto, estes experimentos não detectariam inversões, inserções e translocações. Com o objetivo de verificar se existem alterações na seqüência de DNA em torno do alelo R337H, como elementos Alu ou LCRs, que poderiam estar aumentando a probabilidade da ocorrência de deleção nos portadores desta mutação, seqüenciamos

25.824 pb da região 17p13 a partir do DNA proveniente do tumor da adrenal de um portador da R337H. O DNA tumoral foi escolhido como fonte para ser sequenciado, pois como o tumor apresenta perda de heterozigose com retenção do alelo mutante, teríamos uma evidência mais forte de que eventuais alterações encontradas estariam sendo co-segregadas com o alelo mutante 337H.

Foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores (Anexo V) para amplificar 22 fragmentos de DNA que se sobrepuseram em cerca de 100 a 200 nucleotídeos, permitindo a cobertura da região correspondente ao chr17:7171184-7197007 (NCBI; GRCh37.p5) / chr17:7567810-7593633 (Ensembl; GRCh37) (Figura 26).

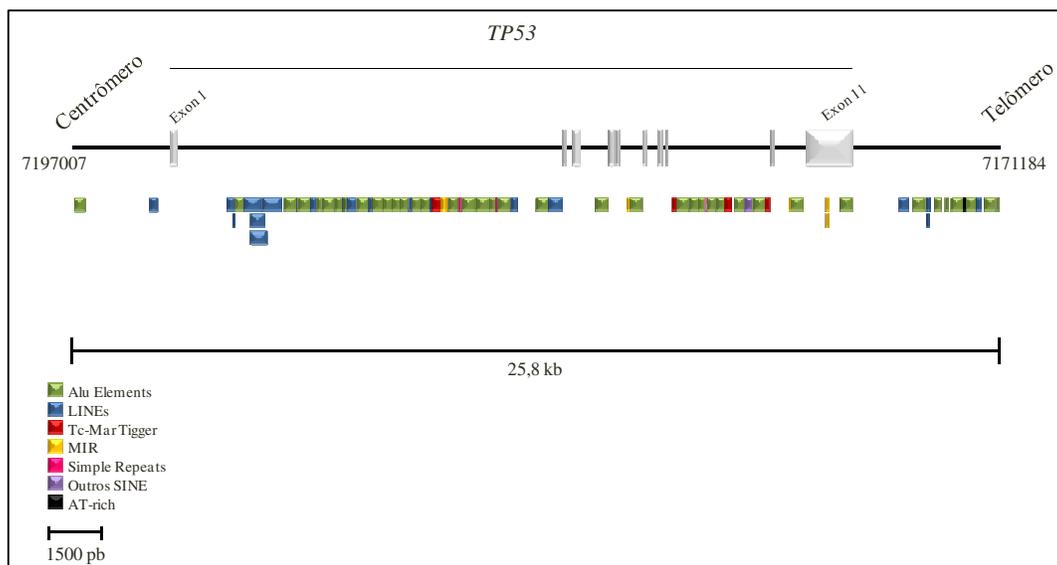


Figura 26: Representação da região de 25.824 pb do locus correspondente ao *TP53*.

Os amplicons foram sequenciados e analisados com o auxílio da ferramenta BLASTn (*nucleotide Basic Local Alignment Search Tool*), sendo comparados à sequência de referência do cromossomo 17 (NT 010718.16). A região do *TP53* é uma região muito rica em elementos repetitivos e sequências Alu (Figura 26). Por isso, repetições A/T são frequentes e o sequenciamento nas regiões imediatamente após estas repetições apresenta qualidade baixa, comprometendo a análise (Figura 27). Por isso, alguns oligonucleotídeos iniciadores tiveram que ser desenhados internamente ao

amplicon, para que o sequenciamento pudesse contemplar toda a sequência do produto amplificado (Anexo V).

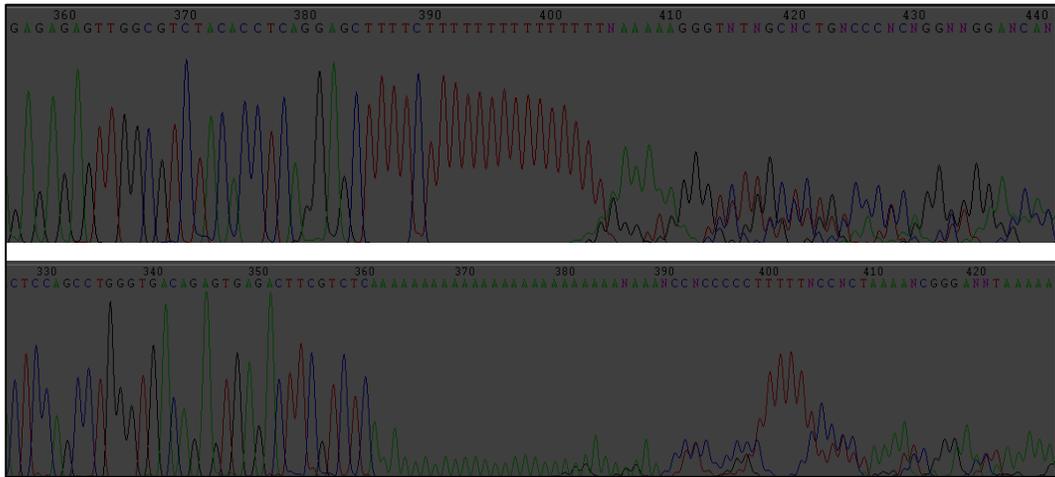


Figura 27: Eletroferogramas representativos de uma região poli-T e uma região poli-A evidenciando a perda da qualidade do seqüenciamento logo após a repetição nucleotídica.

O genótipo do codon 337 da p53 confirmou que o alelo seqüenciado foi o alelo mutante (Figura 28A). Além disto, o genótipo do polimorfismo rs9894946, associado ao efeito fundador desta mutação, também foi encontrado no paciente estudado (Figura 28B), reforçando que, de fato, trabalhamos com o alelo mutante 337H.

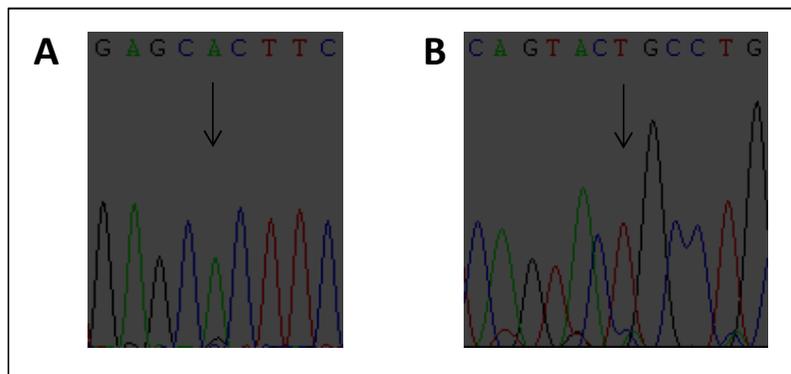


Figura 28: Eletroferogramas obtidos no seqüenciamento do DNA tumoral de um portador da R337H. (A) Sequência correspondente à região do códon 337, evidenciando somente a presença do alelo mutante (indicado pela seta). (B) Sequência correspondente ao polimorfismo rs9894946, demonstrando o genótipo associado ao efeito fundador descrito para esta mutação (base indicada pela seta).

O sequenciamento do intron 9, um dos *clusters* de elementos Alu dentro do *TP53* (Figura 26) revelou um possível rearranjo cromossômico nesta região (Figura 29). Apesar de claramente podermos observar picos sobrepostos no eletroferograma e ser necessária a clonagem para sequenciamento isolado destes produtos, a análise da sequência obtida para esta região utilizando-se o algoritmo BLASTn revelou que a sequência apresentou grande similaridade com uma sequência do intron 1 do *TP53* (Figura 30). Este resultado pode levar a algumas hipóteses que ainda necessitam ser comprovadas. A primeira delas é que o rearranjo encontrado é uma alteração secundária ao crescimento do tumor, em que várias alterações vão se acumulando ao longo do tempo. A segunda hipótese é que este rearranjo pode ser uma “cicatriz” do evento que resultou na deleção encontrada no sangue periférico e, portanto, guarda a história natural desta deleção. Se esta hipótese for verdadeira, seria esperado encontrar este mesmo tipo de rearranjo nas células do sangue periférico do mesmo paciente, análise que ainda não foi realizada.

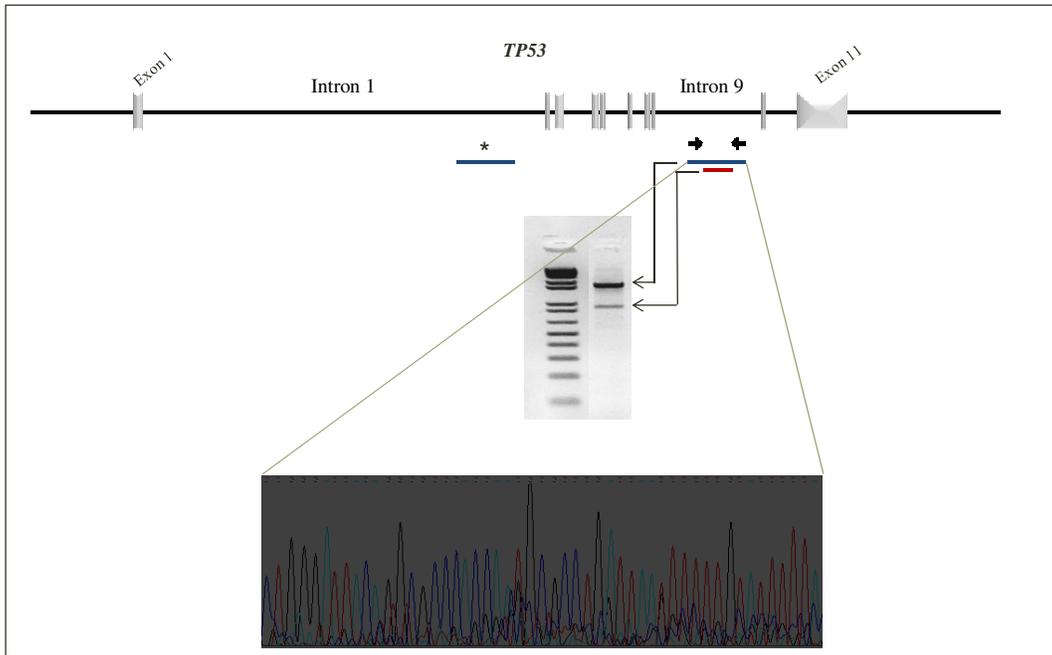


Figura 29: Representação esquemática da alteração de seqüência encontrada no intron 9 do *TP53*. Os exons do gene *TP53* estão representados por quadrados. No intron 9, os oligonucleotídeos iniciadores utilizados estão representados por duas setas em direções opostas. A reação de PCR com estes oligonucleotídeos resultou em dois produtos, representados no gel de agarose. A banda maior foi seqüenciada e parte do eletroferograma está representado. A análise utilizando-se a ferramenta BLASTn mostrou similaridade com uma seqüência do intron 1 (representada por um asterisco). A banda menor (vermelha) também foi submetida à reação de sequenciamento e análise utilizando-se para tal a ferramenta BLASTn (Figura 31).

Query	28	CCCTTaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaGAAAGAGAGCATCCCTCACTggcaacatagtgaaac	87
Sbjct	7185533	CCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAAAGAAAGAGAGCATCCTGCCTGGGCAACATAGTGAAAC	7185474
Query	88	cctgcctctacaaaaaaaaactcaaaaaatagaccgggtgcagtggtcacacctgtattccc	147
Sbjct	7185473	CCTGCCTCTACAAAAAACTCAAAAATTGGCCGGGTGCAGTGGCTCACACTGTAATCCC	7185414
Query	148	agccctttgggattgggaggcgggaggatcacaggaggtcaggagttcgaaccaggcctg	207
Sbjct	7185413	AGCACTTTGGGAGTCGGAGGGGGGAGGATCACCTGAGGTCAGGAGTTCGAAACCAGCCTG	7185354
Query	208	gccaacatggcaaaaccccatctctagtaaaaaatacaaaaaattaatcaggcgcatgggt	267
Sbjct	7185353	GCCAACATGGCAAAACCCCATCTCTACTAAAAATACAAAAAATTAATCAGGCGCATTGGT	7185294
Query	268	ggcgccctgtaatcccagctactcaggaagttgaggcaagaggatcgcttgaatctggga	327
Sbjct	7185293	GGGCGCCTGTAATCCCAGCTACTCAGGAAGTTGAGGCAAGAGGATCGCTTGAATCTGGGA	7185234
Query	328	ggcggaaaggttac	340
Sbjct	7185233	GGTGG-AGGTAC	7185222

Figura 30: Resultado do alinhamento utilizando o algoritmo BLASTn. Esta análise corresponde ao alinhamento da seqüência da banda maior obtida na amplificação do intron 9. Notar que a posição desta seqüência no Sbjct corresponde à região do intron 1.

A banda menor obtida na amplificação do intron 9 (Figura 29) também foi sequenciada e revelou se tratar de uma seqüência similar à seqüência esperada. Contudo, nesta seqüência foi perdida uma região de 735 nucleotídeos (Figura 31). As implicações deste achado não parecem estar ligadas à presença da mutação R337H ou à ocorrência da deleção do *TP53*, visto que esta banda menor também foi encontrada em indivíduos sem a mutação R337H, sem a deleção do *TP53* e sem câncer.

```

1. gaccagaccagctttcaaaaagaaaattgttaaagagagcatgaaaatggttctatgactttgcctgatac
agatgctacttgacttacgatgggttacttccctgataaactcgtcgtaagttgaaaatattgtaagttgaaa
atggatttaatacacacctaatctaaggaacatcatagcttagcctagcctgcttttttttttttttttttggg
gacagagtctcactctgtcaccagcctggagtgcagtggcgggatctcggtcactgcaacctcgccttct
gggttcaagcgttctcctgctcagccactgagtagctgggattacaggcacctgcccgcagcccagcta
atTTTTGTatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttattt
ctcctgaccttgatctgcctgcttggcctcccaaagtctgggattacaggcgtgagccaccgcaccgg
cctgctagcctacttttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttatttattt
gatgtgatcatagctcattataccctcctgggctcaagcaatccccctaacctctgcctccccagtagctagga
ccacaggcatacaccaccataaccagctaatttttaaaattttttagatagatagagtctcactatgttgc
ccaggtggtctctagcctactttttgagacaaggtcttgcctctgtcaccagcctggatagagtgcagttag
tgcagtcacagctcactgcagcctccacctcccaggtccatccatcctcccagctcagcctcccaagtgtct
tcaactacaggcctgcaccaccatgctggtaatttttatttatttatttatttatttatttatttatttattt
tttgagactcagctcactctgtcggccaggtggagtgcagtggcatgatctcggtcactgcaacctctgc
ctcctgggttcaagtgattctcctgcctcagcctcccgaatagctaggactacaagcgcctgctaccagccc
agctaatttttgtatttttagtagagacaggtttcaccatggtggccaggctggtctcgaacttctgacct
gtgatccgcccgcctcggcctcccaaagtctgggattacaggtgtgagccaccagcccggctaatttttat
ttatttattttaaagacagagtctcactctgtcactcaggctagagtgcagtggcaccatctcagctcactgca
gccttgacctccctgggtccgggtatttcacctcccaagtagctaggactacaggcaccatgccacgacacc
cagctaattttttatttctgtgaagtcaaggtcttgcctacgttgcccctgctgggtatcaaaccctgggctc
aatcaatccttccacctcagcctcccaagtttgggttacaggcatgagctaccacactcagccttagcct
acttgaaacgtgttcagagcatttaagttaccctacagttg.1572

```

Figura 31: Seqüência esperada ao utilizar o par de oligonucleotídeos iniciadores representado na figura 29 (1572 pb). Em vermelho, a seqüência da banda menor, com 735 nucleotídeos a menos (em preto).

Além destes achados, não foram encontradas outras alterações na seqüência genômica do paciente analisado.

5.0 Discussão

As mutações germinativas do gene *TP53* normalmente estão associadas à Síndrome de Li-Fraumeni, uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer em que os portadores chegam a apresentar 90% de chances de desenvolver algum tipo de tumor ao longo de suas vidas (Nagy et al., 2004). Os tumores frequentemente encontrados em famílias com a SLF incluem sarcomas ósseos e de partes moles, câncer de mama, tumores do sistema nervoso central, tumor do córtex da adrenal e leucemia (Li et al., 1988).

Diferentemente da grande maioria das mutações germinativas do *TP53* associadas ao câncer, a mutação R337H, no seu descobrimento, não foi descrita como uma mutação associada a um amplo espectro tumoral e, sim, como uma mutação tecido-específica associada somente ao desenvolvimento do tumor do córtex da adrenal (Ribeiro et al., 2001). Nas regiões sul e sudeste do Brasil, onde a frequência estimada desta mutação alcança 0,3% da população, a incidência do TCA chega a ser 10 a 15 vezes maior do que a descrita em outros países (Sandrini et al., 1997). Em 2006, foi identificada a presença desta mutação em famílias brasileiras com LFL (Achatz et al., 2006), abrindo a discussão sobre o espectro de tumores que esta mutação predispõe. Em 2008, nosso grupo identificou a associação da R337H com o câncer de mama (Assumpção et al., 2008).

Nesta tese, demonstramos pela primeira vez a associação da mutação R337H com o carcinoma de plexo coroide (69% dos casos analisados) e o osteossarcoma (7%) na faixa etária pediátrica. Em nossa instituição, a incidência relativa do carcinoma de plexo coroide quando comparada ao papiloma de plexo coroide foi aproximadamente 10 vezes maior do que a descrita em outras séries (Wolff et al., 2002). O mesmo não foi observado para o osteossarcoma.

O grupo de pacientes com osteossarcoma portadores da R337H tiveram uma pior apresentação clínica da doença, quando comparados ao grupo negativo para a presença da mutação, sendo que todos os casos positivos apresentaram metástase pulmonar ao diagnóstico e evoluíram a óbito ($p=0.02$).

Os dados obtidos neste estudo serão de grande importância para o aconselhamento genético das famílias de portadores da R337H, além de auxiliarem no estabelecimento de critérios clínicos sugestivos da presença de mutações no gene *TP53*. Atualmente, além do diagnóstico de Li-Fraumeni ou Li-Fraumeni like, a presença de tumores adrenocorticais e do plexo coróide em crianças independente da história familiar de câncer são sugestivos da presença de mutações no *TP53* (Gonzalez et al., 2009). Nossos resultados estão de acordo com este critério e reforçam que o teste para verificar a presença de mutações de p53 nestes indivíduos deve ser oferecido.

Com o objetivo de obter mais informações sobre a suscetibilidade de alguns tecidos à presença da R337H, investigamos o padrão de expressão do RNAm de diferentes isoformas da p53 buscando associações entre os achados. O padrão de expressão das isoformas estudadas não diferiu entre os tumores associados ou não à R337H. Apesar disto, seria bastante interessante investigar o efeito funcional e estrutural da R337H sobre as diferentes isoformas e verificar o seu impacto sobre as funções (Marcel et al., 2011) destas isoformas, principalmente sobre aquelas que conservam o domínio de tetramerização após a tradução.

Alterações cromossômicas são frequentemente encontradas em portadores de mutações no *TP53*. Tumores de mama com mutações no p53 têm um número médio maior de alterações identificadas por CGH em comparação aos tumores com p53 selvagem (Jain et al, 2001). Sarcomas de partes moles com cariótipo complexo estão associados a mutações de p53, enquanto os tumores com cariótipos mais simples

normalmente estão associados a p53 selvagem (Borden et al., 2003). Da mesma maneira, osteossarcomas com p53 mutante apresentam uma complexidade genômica maior, quando comparados aos osteossarcomas com p53 selvagem (Overholtzer et al., 2003).

Schlien e colaboradores verificaram que indivíduos portadores de mutações no *TP53* apresentam um aumento no número médio de CNVs, regiões do genoma em que há deleção ou duplicação de material genético, quando comparados a indivíduos controle. Foi verificado também que, dentre os portadores de mutações que desenvolveram câncer, o número médio de CNVs foi maior do que nos indivíduos com mutação que não desenvolveram câncer (Schlien et al., 2008). De forma similar, foi identificada nos portadores da R337H uma manifestação de instabilidade genômica associada à ocorrência de câncer, a deleção do *TP53* em células do sangue periférico, sob a forma de mosaïcismo.

As deleções gênicas são um evento que marcam o processo de tumorigênese associado a diferentes genes supressores tumorais. Os tumores de Wilms, retinoblastoma, câncer coloretal, de mama, de pulmão, próstata, bexiga, sistema nervoso central, melanoma e leucemia frequentemente apresentam a perda dos genes *WT1*, *RB1*, *TP53*, *p16/CDKN2* ou *PTEN* (Lobo, 2008).

O locus em que o gene *TP53* se encontra se apresenta como um *hot spot* para ocorrência de eventos de recombinação que podem resultar em perdas de segmentos cromossômicos. Na região 17p, uma sequência de 7.5 milhões de bases é constituída por 23% de Low Copy Repeats (LCRs), enquanto a média de outras regiões é de 5 a 10% (Stankiewicz et al., 2003). LCRs frequentemente são substratos para a ocorrência de recombinação homóloga não alélica (non allelic homologous recombination - NAHR), que pode resultar em deleções, duplicações ou translocações cromossômicas.

Além disto, a sequência do gene *TP53* é composta por aproximadamente 41% de elementos Alu, potencialmente envolvidos em eventos de recombinação.

Os dados obtidos neste trabalho nos levaram a postular a hipótese de que um evento de recombinação resultaria na deleção do *TP53* em uma célula durante o período embrionário e, ao longo do desenvolvimento ontogenético, esta célula se manifestaria sob a forma de um mosaico nos tecidos dela derivados.

As glândulas adrenais são constituídas por uma região cortical e uma região medular. O córtex é derivado do epitélio celomático (mesoderma) enquanto a medula é formada a partir da migração de células do neuroectoderma (Garcia et al, 1991). Durante a formação do córtex ocorrem duas ondas de proliferação e migração de células do epitélio celomático: a primeira ocorre em torno da sexta semana de gestação e dá origem ao córtex adrenal fetal; a segunda ocorre no final do terceiro mês de gestação e constitui o córtex adrenal definitivo (Garcia et al, 1991; Keegan & Hammer, 2002).

A zona adrenal fetal regride logo após o nascimento, principalmente devido a estímulos induzidos pela ativina (Spencer et al, 1992; Vanttinen et al, 2003), desaparecendo completamente no segundo ano de vida (Mesiano & Jaffe, 1997; Garcia et al, 1991; Keegan & Hammer, 2002). Esta zona é responsável pela produção de sulfato dehidroepiandrosterona (S-DHEA) do feto, o qual é convertido a estradiol, hormônio crucial para a manutenção da gravidez (Mesiano & Jaffe, 1997).

Levando-se em consideração os achados dos pacientes com TCA, os estudos funcionais sobre a R337H e o desenvolvimento ontogenético humano, uma hipótese para os dados encontrados neste trabalho seria de que, dado que o sangue e o córtex da glândula adrenal derivam do mesmo folheto embrionário, o mosaicismo de células com deleção do *TP53* e células normais estaria presente nos dois tecidos (e nos outros tecidos derivados do mesmo folheto embrionário). As células com deleção, ao expressar

somente um dos alelos, apresentariam um fenótipo mais deletério da mutação R337H, consequência da haploinsuficiência do gene. A expressão do fenótipo mutante da R337H pode se resumir à perda da função de supressão tumoral da p53 ou até mesmo no ganho de função da proteína mutante R337H. No córtex da glândula adrenal, estas células haploinsuficientes para a p53 apresentariam alguma vantagem seletiva perante as demais no processo de remodelagem da glândula, exibindo características provavelmente importantes para o processo de malignização.

Um estudo recente realizado com pacientes do estado do Paraná diagnosticados com TCA corrobora esta hipótese. Foram identificados em mais da metade dos tumores a expressão de fosfatase alcalina placentária, demonstrando que as células tumorais guardam características do período embrionário (Boechat et al., 2011). Além disto, boa parte dos pacientes com TCA apresentam os sinais clínicos da doença logo após o nascimento, nos primeiros anos de vida. A manifestação clínica da doença nesta faixa etária, em que a maioria dos pacientes apresentam virilização (Michalkiewicz et al., 2004), também é um fator que argumenta a favor de que o tumor se origina em grande parte dos casos de células produtoras de andrógenos, que no período embrionário/neonatal é constituído pela zona fetal.

A deleção do *TP53* não foi encontrada em pacientes com tumores do plexo coroide e nos portadores da mutação R337H que desenvolveram câncer na idade adulta. Isto pode indicar que o mecanismo de tumorigênese nestes outros sítios anatômicos é diferente da glândula adrenal. Entretanto, coincidentemente, os tumores analisados nestes pacientes não derivam do mesmo folheto embrionário que o sangue. Por isso, seria importante determinar se existe a presença da deleção do *TP53* em células da mucosa oral, por exemplo, que seriam representativas da ectoderme.

Apesar de não termos conseguido definir qual o alelo retido após a deleção do *TP53* nas células do sangue, seria muito importante chegar a esta conclusão. Esta informação poderia nos dar indícios mais fortes sobre a relação entre as células com deleção do sangue periférico e a ocorrência do tumor na adrenal, uma vez que o tumor apresenta perda de heterozigidade com retenção do alelo mutante.

Os resultados obtidos com a análise do FISH do gene *TP53* abrem a perspectiva do desenvolvimento de um teste de predição do risco de desenvolvimento do TCA em portadores da mutação R337H. Apesar da realização de testes genéticos em crianças ser controversa e não autorizada em alguns casos, no caso da R337H e do TCA, a ocorrência do câncer na faixa etária pediátrica e a necessidade do diagnóstico precoce seriam argumentos favoráveis à realização deste tipo de teste. Visto que a deleção do gene *TP53* esteve associada à ocorrência do TCA, caso as duas crianças portadoras da deleção que não desenvolveram câncer desenvolvam no futuro (Figura 14), será obtida uma evidência de que o teste pode ter valor preditivo para estratificar o risco do desenvolvimento do TCA em portadores da R337H. Esta é uma aplicação tentadora, porém os resultados obtidos são incipientes, requerendo estudo adicionais, com um número maior de indivíduos acompanhados por um longo período de tempo.

O sequenciamento do gene *TP53* foi realizado objetivando-se a identificação de alterações de sequências ligadas à R337H (agindo em cis) que poderiam colaborar com a ocorrência da deleção do gene *TP53* nestes pacientes. Um exemplo disto seria a inserção de elementos Alu, que além dos efeitos inerentes à sua inserção no genoma, fornecem grande oportunidade para a ocorrência de recombinação que potencialmente resultam em deleções e duplicações gênicas (Deininger & Batzer, 1999). Frequentemente a recombinação entre elementos Alu pode contribuir com a ocorrência

de doenças, como a hipercolesterolemia, distrofia muscular de Duchenne, α -talassemia, leucemia mielóide aguda e câncer de mama (revisado por Deininger & Batzer, 1999).

Os resultados obtidos com o sequenciamento confirmaram que o paciente estudado apresentava o genótipo característico do efeito fundador associado a esta mutação (alelo T para o polimorfismo rs 9894946) (Garritano et al., 2010). Com relação a alterações na sequência gênica, foi encontrada uma evidência de alteração envolvendo os introns 1 e 9 do *TP53*. Entretanto, para entender as características e as implicações da alteração encontrada neste paciente, estudos adicionais serão necessários. A clonagem dos produtos de PCR e posterior sequenciamento poderá nos dar mais evidências se esta alteração encontrada guarda a história natural da deleção do *TP53* encontrada no sangue periférico ou se é uma alteração secundária ao desenvolvimento do tumor.

A deleção do *TP53* encontrada nos portadores da R337H não explica diretamente a ocorrência do desvio no padrão de segregação desta mutação, apresentado no item 1.0. Contudo, caso o mosaico de células com deleção do *TP53* ocorra também em células germinativas, somente um tipo de gameta (mutante ou selvagem) será produzido por estas células. Isto pode resultar na maior representação de um dos alelos no pool de gametas, ocasionando um desvio na proporção esperada de 1:1 na progênie dos portadores da mutação. Entretanto, a investigação desta hipótese se mostrou inviável durante a execução deste trabalho, dada a dificuldade de obtenção de células germinativas carreadoras da R337H.

6.0 Conclusões

- A mutação R337H está fortemente associada ao carcinoma de plexo coroide pediátrico, um tumor que apresentou incidência relativa elevada, assim como o TCA, na região sudeste do Brasil;
- A R337H também está associada ao osteossarcoma pediátrico, que se demonstrou clinicamente mais agressivo nos portadores da mutação quando comparados aos não portadores;
- Esta mutação não foi identificada em pacientes com leucemia linfóide, leucemia mielóide, linfoma, sarcoma de Ewing, rabdomiossarcoma e outros tumores do SNC pediátricos (exceto TPC), tumores frequentemente encontrados em famílias com síndrome de Li-Fraumeni;
- Pela primeira vez foi identificada a R337H em indivíduos provenientes do sul do estado de Minas Gerais;
- Os portadores da R337H que desenvolveram TCA apresentaram uma deleção intersticial do cromossomo 17, afetando o gene *TP53*, em cerca de 8% das células do sangue periférico;
- Além da deleção do *TP53* em mosaico, estes pacientes não apresentaram outras alterações cromossômicas identificadas por análises de cariótipo e aCGH do cromossomo 17;
- Esta deleção não foi encontrada em portadores da R337H que não desenvolveram câncer nem em portadores da R337H que desenvolveram TPC.

7.0 Referências Bibliográficas

- 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*, 10:920-925, 2009.
- Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 245:96-102, 2006.
- Amos-Landgraf JM, Ji Y, Gottlieb W, Depinet T, Wandstrat AE, Cassidy SB, Driscoll DJ, Rogan PK, Schwartz S, Nicholls RD. Chromosome breakage in the Prader-Willi and Angelman syndromes involves recombination between large, transcribed repeats at proximal and distal breakpoints. *Am J Hum Genet* 65:370–386, 1999.
- Aranha IP & Martin-DeLeon PA. The murine Rb(6.16) translocation: evidence for sperm selection and a modulating effect of aging. *Hum. Genet.* 87: 278–284, 1991.
- Assumpção JG, Seidinger AL, Mastellaro MJ, Ribeiro RC, Zambetti GP, Ganti R, Srivastava K, Shurtleff S, Pei D, Zeferino LC, Dufloth RM, Brandalise SR, Yunes JA. Association of the germline *TP53* R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. *BMC Cancer* 8:357, 2008.
- Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, Harris M, Jones PH, Binchy A, Crowther D, Craft AW, Eden OB, Evans DG, Thompson E, Mann JR, Martin J, Mitchell ELD, Santibáñez-Koref MF. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res*, 54:1298-1304, 1994.
- Bode AM, Dong Z. Post-translational modification of p53 in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 4:793-805, 2004.
- Boechat GA, Stinghen ST, Custódio G, Pianovski MA, Figueiredo FR, Jenkins J, Zambetti GP, Ribeiro RC, Figueiredo BC. Placental alkaline phosphatase in pediatric adrenocortical cancer. *J Pediatr Hematol Oncol*. 33:149-53, 2011.
- Boldrup L, Bourdon J, Coates PJ, Björdon S, Nylander K. Expression of p53 isoforms in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer* 43:617-623, 2007.
- Borden EC, Baker LH, Bell RS, Bramwell V, Demetri GD, Eisenberg BL, Fletcher CD, Fletcher JA, Ladanyi M, Meltzer P, O'Sullivan B, Parkinson DR, Pisters PW, Saxman S, Singer S, Sundaram M, van Oosterom AT, Verweij J, Waalen J, Weiss SW, Brennan MF. Soft tissue sarcomas of adults: state of the translational science. *Clin Cancer Res*. 9:1941-56, 2003.
- Bourdon J, Fernandes K, Murray-Zmijewski F, Liu G, Diot A, Xirodimas DP, Saville MK, Lane DP. p53 isoforms can regulate p53 transcriptional activity. *Genes & Dev* 19:2122–2137, 2005.

- Brosh R, Rotter V. When mutants gain new powers: news from the mutant p53 field. *Nat Rev Cancer*. 9:701-13, 2009.
- Deininger PL, Batzer MA. Alu repeats and human disease. *Mol Gen Metabol*. 67:183-193, 1999.
- DiGiamarino, EL, Lee AS, Cadewll C, Zhang W, Bothner B, Riberio RC, Zambetti G, Kriwacki RW. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 9:12-16, 2002.
- Dittmer D, Pati S, Zambetti G, Chu S, Teresky AK, Moore M, Finlay C, Levine AJ. Gain of function mutations in p53. *Nat. Genet*. 4:42-46, 1993.
- Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Jr Butel JS, Bradley A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. *Nature* 356:215-221, 1992.
- Edelmann L, Pandita RK, Spiteri E, Funke B, Goldberg R, Palanisamy N, Chaganti RS, Magenis E, Shprintzen RJ, Morrow BE. A common molecular basis for rearrangement disorders on chromosome 22q11. *Hum Mol Genet* 8:1157-1167, 1999.
- el-Deiry WS, Kern SE, Pietenpol JA, Kinzler KW, Vogelstein B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nat Genet*. 1:45-9, 1992.
- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível em <http://globocan.iarc.fr>, acesso em 24/01/2012.
- Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SB, Boffetta P, Ribeiro RC. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline *TP53* R337H mutation. *J Med Genet* 43:91-96, 2006.
- Garcia SML, Jeckel Neto E, Fernadez, CG *Embriologia*. Porto Alegre : Ed. Artes Médicas. 350 pg. 1991.
- Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, Brugières L, Vargas FR, Brentani RR, Ashton-Prolla P, Landi S, Tavtigian SV, Hainaut P, Achatz MI. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 31:143-150, 2010.
- Gonzalez KD, Noltner KA, Buzin CH, Gu D, Wen-Fong CY, Nguyen VQ, Han JH, Lowstuter K, Longmate J, Sommer SS, Weitzel JN. Beyond Li Fraumeni Syndrome: clinical characteristics of families with p53 germline mutations. *J Clin Oncol*. 27:1250-1256, 2009.

- Gropp A & Winking H. Robertsonian translocations: cytology, meiosis, segregation pattern and biological consequences of heterozygosity, pp. 141–181 in *Biology of the House Mouse*, edited by R. J. Berry. Academic Press, New York/London. 1981.
- Hall CB, Caserta MT, Schnabel K, Shelley LM. Chromosomal Integration of Human Herpesvirus 6 Is the Major Mode of Congenital Human Herpesvirus 6 Infection. *Pediatrics*. 122:513–520, 2008
- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 144:646-74, 2011.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 100:57-70, 2000.
- Hsiao M, Low J, Dorn E, Ku D, Pattengale P, Yeargin J, Haas M. Gain-of-function mutations of the p53 gene induce lymphohematopoietic metastatic potential and tissue invasiveness. *Am. J. Pathol.* 145:702–714, 1994.
- Hussain SP, Harris CC. Molecular epidemiology of human cancer: contribution of mutation spectra studies of tumor suppressor genes. *Cancer Res*. 58:4023-37, 1998.
- Jacks T, Remington L, Williams BO, Schmitt EM, Halachmi S, Bronson RT, Weinberg RA. Tumor spectrum analysis in p53-mutant mice. *Curr. Biol.* 4:1–7, 1994.
- Jain AN, Chin K, Børresen-Dale AL, Erikstein BK, Eynstein Lonning P, Kaaresen R, Gray JW. Quantitative analysis of chromosomal CGH in human breast tumors associates copy number abnormalities with p53 status and patient survival. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 98:7952–7957, 2001.
- Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP. Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. *Science*. 267:1498-502, 1995.
- Jeffs AR, Benjes SM, Smith TL, Sowerby SJ, Morris CM. The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Hum Mol Genet* 7:767–776, 1998.
- Jordan JJ, Inga A, Conway K, Edmiston S, Carey LA, Wu L, Resnick MA. Altered-function p53 missense mutations identified in breast cancers can have subtle effects on transactivation. *Mol Cancer Res*; 8:701–16, 2010.
- Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends in Endocrinol & Metab* 13:200-208, 2002.
- Kolomietz E, Meyn MS, Pandita A, Squire JA. The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes Chrom Cancer* 35:97–112, 2002.
- Konishi H, Mohseni M, Tamaki A, Garay JP, Croessmann S, Karnan S, Ota A, Wong HY, Konishi Y, Karakas B, Tahir K, Abukhdeir AM, Gustin JP, Cidado J, Wang GM, Cosgrove D, Cochran R, Jelovac D, Higgins MJ, Arena S, Hawkins L, Lauring

- J, Gross AL, Heaphy CM, Hosokawa Y, Gabrielson E, Meeker AK, Visvanathan K, Argani P, Bachman KE, Park BH. Mutation of a single allele of the cancer susceptibility gene BRCA1 leads to genomic instability in human breast epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:17773-8, 2011 .
- Latronico AC, Chrousos GP. Adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317-24, 1997.
- Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-Binding Domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 86:4970-4973, 2001.
- Lefevre M, Gerard-Marchant R, Gubler JP, Chaussain JL, Lemerle J. Adrenal cortical carcinoma in 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In: Humphrey GB, Grindey GB, Dehner LB *et al*. Adrenal and endocrine tumors in children. Boston: Martinus Nijhoff Publishers p. 256-76, 1984.
- Levine AJ, Hu W, Feng Z. The P53 pathway: what questions remain to be explored? *Cell Death Differ*. 13:1027-36, 2006 .
- Levine AJ, Oren M. The first 30 years of p53: growing ever more complex. *Nat Rev Cancer*. 9:749-58, 2009.
- Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 88:323–331, 1997.
- Li FP, Fraumeni JF Jr, Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res* 48:5358-5362, 1988.
- Lion T, Kidd V. Appropriate controls for RT-PCR. *Leukemia* 12:1893-1993, 1998.
- Lobo I. Chromosome abnormalities and cancer cytogenetics. *Nature Education*. 1(1), 2008.
- Maira MS, Pearson MA, Fabbro D, Garcia-Echeverria C. *Cancer Biology Comprehensive Medicinal Chemistry II* ISBN (Volume 7) 0-08-044520-9; pp. 1–31.
- Marcel V, Dichtel-Danjoy ML, Sagne C, Hafsi H, Ma D, Ortiz-Cuaran S, Olivier M, Hall J, Mollereau B, Hainaut P, Bourdon JC. Biological functions of p53 isoforms through evolution: lessons from animal and cellular models. *Cell Death Differ*. 18:1815-1824, 2011 .
- Mateu MG, Fersht AR. Nine hydrophobic side chains are key determinants of the thermodynamic stability and oligomerization status of tumour suppressor p53 tetramerization domain. *EMBO J*. 17:2748-58, 1998 .

- Mesiano F, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate adrenal cortex. *Endocr. Rev.* 18:378-403, 1997.
- Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol.* 22:838-45, 2004.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 11:577-90, 2003.
- Milner J, Medcalf EA, Cook AC. Tumor suppressor p53: analysis of wild-type and mutant p53 complexes. *Mol Cell Biol.* 11:12-9, 1991.
- Morris C, Luppi M, Mc Donald M, Barozzi P, Torelli G. Fine mapping of an apparently targeted latent Human Herpesvirus type 6 integration site in chromosome band 17p13.3. *J Med Virol* 58:69–75, 1999.
- Muravenko OV, Amosova AV, Samatadze TE, Popov KV, Poletaev AI, Zelenin AV. 9-Aminoacridine: an efficient reagent to improve human and plant chromosome banding patterns and to standardize chromosome image analysis. *Cytometry A.* 51:52-7, 2003.
- Nacheva EP, Ward KN, Brazma D, Virgili A, Howard J, Leong HN, Clark DA. Human Herpesvirus 6 Integrates Within Telomeric Regions as Evidenced by Five Different Chromosomal Sites. *J Med Virol* 80:1952–1958, 2008.
- Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene* 23:6445–6470, 2004.
- Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, Glover T, Collins FS, Weslon A, Modali R, Harris CC, Vogelstein B. Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342:705–708, 1989.
- Olive KP, Tuveson DA, Ruhe ZC, Yin B, Willis NA, Bronson RT, Crowley D, Jacks T. Mutant p53 gain of function in two mouse models of Li-Fraumeni syndrome. *Cell.* 119:847-60, 2004.
- Overholtzer M, Rao PH, Favis R, Lu XY, Elowitz MB, Barany F, Ladanyi M, Gorlick R, Levine AJ. The presence of p53 mutations in human osteosarcomas correlates with high levels of genomic instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11547-52, 2003.
- Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, Achatz MI, Olivier M, Martel-Planche G, Marcel V, Aguiar E, Giacomazzi J, Ewald IP, Giugliani R, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Detection of R337H, a germline mutation predisposing to multiple cancers, in

- asymptomatic women participating in a breast cancer screening programme in southern Brazil. *Cancer Lett.* 261:21-5, 2008.
- Peled A, Zipori D, Rotter V. Cooperation between p53-dependent and p53-independent apoptotic pathways in myeloid cells. *Cancer Res.* 56:2148-56, 1996.
- Petitjean A, Mathe E, Kato S, Ishioka C, Tavtigian SV, Hainaut P, Olivier M. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. *Hum Mutat.* 28:622-9, 2007.
- Pinto EM, Billerbeck AEC, Villares MCBF, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metab* 48:647-650, 2004.
- Piovesan GC. Prevalencia do alelo *TP53* R337H no estado do Paraná. Tese, Universidade Federal do Paraná, Brazil, 2006.
- Purdie CA, Harrison DJ, Peter A, Dobbie L, White S, Howie SE, Salter DM, Bird CC, Wyllie AH, Hooper ML, Clarke AR. Tumour incidence, spectrum and ploidy in mice with a large deletion in the p53 gene. *Oncogene* 9:603-609, 1994.
- Reiter LT, Murakami T, Koeuth T, Pentao L, Muzny DM, Gibbs RA, Lupski JR. A recombination hotspot responsible for two inherited peripheral neuropathies is located near a mariner transposon-like element. *Nat Genet* 12:288-297, 1996.
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michakiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cradewll C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci* 98:9330-9335, 2001.
- Rudenko HC, Else M, Dearden C, Brito-Babapulle V, Jones C, Dexter T, Fenwick K, Mackay A, Ashworth A, Matutes E, Gonzalez D, Catovsky D, Morgan GJ. Characterising the *TP53*-deleted subgroup of chronic lymphocytic leukemia: an analysis of additional cytogenetic abnormalities detected by interphase fluorescence in situ hybridisation and array-based comparative genomic hybridisation. *Leuk Lymphoma.* 49:1879-86, 2008.
- Sambrook J, Russel DW: *Molecular cloning - A laboratory manual. Volume 2 (ed 2)* New York, NY, Cold Spring Harbour Laboratory Press, 1989
- Sandrini R, Ribeiro R, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:2027-2031, 1997.
- Shaulsky G, Goldfinger N, Rotter V. Alterations in tumor development in vivo mediated by expression of wild type or mutant p53 proteins. *Cancer Res.* 51:5232-5237, 1991.

- Shlien A, Tabori U, Marshall CR, Pienkowska M, Feuk L, Novokmet A, Nanda S, Druker H, Scherer SW, Malkin D. Excessive genomic DNA copy number variation in the Li-Fraumeni cancer predisposition syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:11264-9, 2008.
- Sigal A, Rotter V. Oncogenic mutations of the p53 tumor suppressor: the demons of the guardian of the genome. *Cancer Res*. 60:6788-93, 2000.
- Solomon H, Madar S, Rotter V. Mutant p53 gain of function is interwoven into the hallmarks of cancer. *J Pathol*. 225:475-8, 2011.
- Song H, Hollstein M, Xu Y. p53 gain-of-function cancer mutants induce genetic instability by inactivating ATM. *Nat Cell Biol*. 9:573-80, 2007.
- Spencer SJ, Rabinovici J, Mesiano S, Goldsmith PC, Jaffe RB. Activin and inhibin in the human adrenal gland: regulation and differential effects in fetal and adult cells. *J. Clin. Investig*. 90:142-149, 1992.
- Stankiewicz P, Shaw CJ, Dapper JD, Wakui K, Shaffer LG, Withers M, Elizondo L, Park SS, Lupski JR. Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *Am J Hum Genet*. 72:1101-16, 2003.
- Stiller CA. International variations in the incidence of childhood carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 3:305-310, 1994.
- Tanaka-Taya K, Sashihara J, Kurahashi H, Amo K, Miyagawa H, Kondo K, Okada S, Yamanishi K. Human Herpesvirus 6 (HHV-6) Is Transmitted From Parent to Child in an Integrated Form and Characterization of Cases With Chromosomally Integrated HHV-6 DNA. *J Med Virol* 73:465-473, 2004.
- Toledo F, Wahl GM. Regulating the p53 pathway: in vitro hypotheses, in vivo veritas. *Nat Rev Cancer*. 6:909-23, 2006.
- Vänttinen T, Liu J, Kuulasmaa T, Kivinen P, Voutilainen R. Expression of activin/inhibin signaling components in the human adrenal gland and the effects of activins and inhibins on adrenocortical steroidogenesis and apoptosis. *J Endocrinol* 178:479-489, 2003.
- Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, Evans DG, Harris M, Kelsey AM, Birch JM. Are there low-penetrance *TP53* Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet*. 65:995-1006, 1999.
- Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature*. 408:307-10, 2000.
- Vogelstein, B., & Kinzler, K. Cancer genes and the pathways they control. *Nature Medicine* 789-799, 2004.
- Wolff JE, Sajedi M, Brant R, Coppes MJ, Egeler RM. Choroid plexus tumours. *Br J Cancer*. 87:1086-91, 2002.

World Health Organization. The global burden of disease: 2004 Update. Geneva: World Health Organization; 2008.

Young Jr JL, Ries LG, Silverberg E, Horm JW, Miller RW. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* 58:598–602, 1986.

Zancanella P, Oliveira BH, Pianovski MA, Ferman S, Voss SZ, Piovezan GC, Stinghen ST, Caleffe LG, Parise GA, Figueiredo BC. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in advanced childhood. *J Pediatr Hematol Oncol.* 28:513-24, 2006.

8.0 Anexos

Anexo I



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 16/12/08.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 1121/2008 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0017.0.144.146-08

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DOS TUMORES DO CÓRTEX DA ADRENAL (TCA) PEDIÁTRICOS EM PORTADORES DA MUTAÇÃO TP53-R337H.”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

APRESENTAÇÃO AO CEP: 12/12/2008

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 16/12/09 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Verificar os fatores que poderiam explicar maior susceptibilidade ao desenvolvimento do tumor do córtex da adrenal em pacientes do sexo feminino e avaliar alterações estruturais nos cromossomos dos portadores da mutação R337H que possam explicar a herança não mendeliana da mutação.

III - SUMÁRIO

Será realizado um estudo transversal, em que serão incluídas amostras de pacientes diagnosticados com TCA. Serão avaliadas 85 amostras de tumor disponíveis no banco de material biológico e 20 amostras prospectivas que forem incluídas em estudo anterior aprovado pelo CEP/Boldrini em 2003. Será realizada análise citogenética, análise de reversão sexual, análise de genes envolvidos na tumorigênese adrenal, análise de metilação, imunohistoquímica e FISH.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O estudo está bem estruturado. Todos os documentos estão corretamente anexados. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido pode ser dispensado para as amostras retrospectivas.

Recomendação: Quanto as amostras prospectivas é necessário utilizar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Poderia ser feito uma emenda no projeto anterior adicionado as informações do atual, utilizando-se apenas um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para as duas pesquisas.

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13084-971 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br



V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 16 de dezembro de 2008.


Prof. Dra. Carmem Sílvia Bertuzzo
PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



CEP, 25/08/09.
(PARECER CEP: N° 1121/2008)

PARECER

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “ESTUDO DOS TUMORES DO CÓRTEX DA ADRENAL (TCA) PEDIÁTRICOS EM PORTADORES DA MUTAÇÃO TP53-R337H”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: José Andrés Yunes

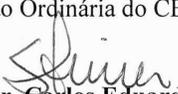
II - PARECER DO CEP.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP tomou ciência e aprovou a análise da mutação R337H e deleções do *TP53* em familiares das crianças tratadas para TCA e analisar a mutação R337H e deleções do *TP53* em amostras de crianças e adolescentes com leucemias agudas, tumores do sistema nervoso central e osteosarcoma, referente ao protocolo de pesquisa supracitado.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

III – DATA DA REUNIÃO.

Homologado na VIII Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 25 de agosto de 2009.


Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

Comitê de Ética em Pesquisa - UNICAMP
Rua: Tessália Vieira de Camargo, 126
Caixa Postal 6111
13083-887 Campinas – SP

FONE (019) 3521-8936
FAX (019) 3521-7187
cep@fcm.unicamp.br

Anexo III



CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÕES HEMATOLÓGICAS
DR. DOMINGOS A. BOLDRINI

Rua Dr. Gabriel Porto, 1.270 – Fone: (19) 3787-5000 – Barão Geraldo – Campinas -
SP – CEP: 13083-210

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. Responsável Legal: _____
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.) _____
Documentos de Identidade nº _____ Sexo: M F
Data nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ nº _____ Apto.: _____
Bairro: _____ Cidade _____ Estado _____
CEP: _____ - _____ Telefone: (____) _____
2. Nome do Paciente: _____ Data de nascimento: ____/____/____

II. Dados sobre a Pesquisa Científica

1. Título do Projeto: Estudo dos tumores do córtex da adrenal (TCA) pediátricos em portadores da mutação TP53-R337H.
2. Pesquisadores responsáveis: Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte, Dr. Jose Andres Yunes, Dra. Maria Jose Mastellaro, Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira.
3. Finalidade: Utilizar, para a realização de pesquisas genéticas, amostras de tecido tumoral e sangue periférico dos pacientes que foram diagnosticados e tratados para o TCA no Centro Infantil Boldrini.
4. Unidade do Centro Infantil Boldrini: Laboratório de Biologia Molecular
5. Avaliação do Risco da Pesquisa para o paciente: Sem risco

III. Registro das explicações do Pesquisador ao Representante Legal do Paciente sobre a Pesquisa

Para obter um maior conhecimento sobre o câncer, os médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisas clínicas científicas. Nesta pesquisa, as amostras biológicas coletadas serão analisadas para detectar alterações genéticas que podem estar relacionadas ao desenvolvimento de câncer na glândula adrenal. É importante obter informações a respeito destas alterações para que se possam entender melhor as características da doença. Por isso, você está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando a utilização das amostras de tecido tumoral e sangue periférico coletadas. Sua participação não é obrigatória.

Todo o material utilizado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no hospital.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo, bem como se desejar a qualquer momento se retirar deste estudo, por gentileza, entre em contato o pesquisador responsável Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte pelo email analuiza@boldrini.org.br ou pelo endereço R. Gabriel Porto 1270, Cidade Universitária, CEP13083-210, Campinas, SP; Fone: (19)37875070.

IV. Consentimento Livre e Esclarecido:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) doador(a) ou Representante Legal:

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo IV



CENTRO INFANTIL DE INVESTIGAÇÕES HEMATOLÓGICAS
DR. DOMINGOS A. BÓLDRINI

Rua Dr. Gabriel Porto, 1.270 – Fone: (19) 3787-5000 – Barão Geraldo – Campinas, SP
CEP: 13083-210

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

I. Dados de Identificação do Sujeito da Pesquisa ou Responsável Legal

1. Responsável Legal: _____
Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.) _____
Documentos de Identidade nº _____ Sexo: M F
Data nascimento: ____/____/____
Endereço: _____ n° _____ Apto.: _____
Bairro: _____ Cidade _____ Estado _____
CEP: _____ - _____ Telefone: (____) _____
2. Nome do Paciente: _____ Data de nascimento: ____/____/____

II. Dados sobre a Pesquisa Científica

1. Título do Projeto: Estudo dos tumores do córtex da adrenal (TCA) pediátricos em portadores da mutação TP53-R337H.
2. Pesquisadores responsáveis: Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte, Dr. Jose Andres Yunes, Dra. Maria Jose Mastellaro, Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira.
3. Finalidade: Utilizar amostras de sangue periférico de familiares de pacientes com TCA para realização de pesquisas genéticas no Centro Infantil Boldrini.
4. Unidade do Centro Infantil Boldrini: Laboratório de Biologia Molecular
5. Avaliação do Risco da Pesquisa para o paciente: Sem risco

III. Registro das explicações do Pesquisador ao Representante Legal do Paciente sobre a Pesquisa

Para obter um maior conhecimento sobre o câncer, os médicos e pesquisadores deste hospital desenvolvem pesquisas clínicas científicas. Nesta pesquisa, o sangue coletado será analisado para detectar alterações no gene p53, o qual protege as células do nosso corpo de eventuais danos. Uma determinada alteração neste gene está relacionada com maior chance de desenvolvimento de câncer na glândula adrenal. Por isso, você está sendo convidado a colaborar com este estudo, autorizando a utilização da amostra de sangue coletada. Sua participação não é obrigatória.

Todo o material utilizado nesta pesquisa será identificado no laboratório por código formado por números e letras e, portanto, sua privacidade e identidade serão preservadas. A eventual inclusão dos resultados em publicação científica será feita de modo a manter seu anonimato.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no hospital.

Caso você tenha questões a fazer sobre este acordo, bem como se desejar a qualquer momento se retirar deste estudo, por gentileza, entre em contato o pesquisador responsável Ana Luiza Ongaro Seidinger Conte pelo email analuiza@boldrini.org.br ou pelo endereço R. Gabriel Porto 1270, Cidade Universitária, CEP13083-210, Campinas, SP; Fone: (19)37875070.

IV. Consentimento Livre e Esclarecido:

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que me foi explicado, consinto em participar do presente Projeto de Pesquisa.

Campinas, _____ de _____ de _____.

Assinatura do(a) doador(a) ou Representante Legal:

Assinatura do pesquisador
(carimbo ou nome legível)

Anexo V

Mix	Oligonucleotídeo iniciador direto	Oligonucleotídeo iniciador reverso	Oligonucleotídeo iniciador para sequenciamento
01	CTTGTCCACCACTTTATCCC	TCTCCGCTGTGCTTCCTC	CTTGTCCACCACTTTATCCC; TCTCCGCTGTGCTTCCTC
02	TCAGTTCAGAGTCCGCATTT	CCATCATCTACACCCAGGTC	TCAGTTCAGAGTCCGCATTT; CCATCATCTACACCCAGGTC
03	GGGGACTTAGCGAGTTTGGG	CTTGGTAGGCATCACGGAGC	GGGGACTTAGCGAGTTTGGG; CTTGGTAGGCATCACGGAGC
04	GCCGTACTTACGTCATCTTT	GGTAGCCCTATACTCCAAC	GCCGTACTTACGTCATCTTT; GGTAGCCCTATACTCCAAC
05	GCTTGCCTATTTGTTTGCTT	ATTACCAGGTTTGGTTTGCT	GCTTGCCTATTTGTTTGCTT; ATTACCAGGTTTGGTTTGCT; CGCCAGTCTGTTTCCTCT
06	GAAAGAAAGAAAAAATAGAGGAATA	TAGAGGAAAAAGCGTTGAGTT	GAAAGAAAGAAAAAATAGAGGAATA; TTAGCTGGGCATGGTGG; CGGCAGCACTGAGTTTTCT
07	TACAAACCAACCAACCTCCTA	CGTTCACCACTACCCCTG	TACAAACCAACCAACCTCCTA; CGTTCACCACTACCCCTG; GAAAAGAAAACCAACGCT; CAGTCTTGCTCTGTCGC
08	GAAAAGAAAACCAACGCT	GACGGAATCTCGCTCTGTT	CGGAGGTTGTAGTGAGCC; GACGGAATCTCGCTCTGTT
09	GTGGTGGCTTACGCCTGTA	TGGGAAGGCAATGAGAT	GTGGTGGCTTACGCCTGTA; TGGGAAGGCAATGAGAT
10	ATTATCTCTAGATTACTTACATTACCC	GAGTCTCAGCTCTTATTGCC	ATTATCTCTAGATTACTTACATTACCC; GAGTCTCAGCTCTTATTGCC

11	AAAAACAGAAAAGTGTAACAAAC	GAGCGAGAAAGAGCAAGG	AAAAACAGAAAAGTGTAACAAAC; GAGCGAGAAAGAGCAAGG; GACGGAGTCTCGCCCTG
12	TTGAAACCAGAAGGCAGAG	AAGAGCAGAAAGTCAGTCCC	TTGAAACCAGAAGGCAGAG; GGGTGTCCTTCCCCATAC; AATACAGGAAGGGAGTTGG
13	CAGGAGTGCTTGGGTTGT	TCAGTGAGGAATCAGAGGC	CAGGAGTGCTTGGGTTGT; TCAGTGAGGAATCAGAGGC; TTCTTGCATTCTGGGACA
14	CAGATAGCGATGGTGAGC	CTGTTCCGTCCCAGTAGAT	CAGATAGCGATGGTGAGC; CTGTTCCGTCCCAGTAGAT
15	ACCTCTTACCGATTTCTTCC	TGGTGGTGTATGCCTGTG	ACCTCTTACCGATTTCTTCC; TGGTGGTGTATGCCTGTG; GACCAGACCAGCTTTCAAA
16	GACCAGACCAGCTTTCAAA	CAACTGTAGGGTAACTTAAATGC	GACCAGACCAGCTTTCAAA; CAACTGTAGGGTAACTTAAATGC
17	GCTCAATCAATCCTTCCA	ATTGTTTGACTTTATGACGGT	GCTCAATCAATCCTTCCA; ATTGTTTGACTTTATGACGGT
18	CAACAGAGTGAGACCCCATC	CCCTTTTCCCTGACCAAT	CAACAGAGTGAGACCCCATC; CCCTTTTCCCTGACCAAT
19	ATACACACTAATACTCTGAGGTGCT	GAGGAGGGACGGTTGGTT	ATACACACTAATACTCTGAGGTGCT; GAGGAGGGACGGTTGGTT; CCCCTTACCGTACTAACC
20	AACAAAGGCTGGAGACTGGG	GGACGGGAACTTGAACACG	AACAAAGGCTGGAGACTGGG; GGACGGGAACTTGAACACG; AAAGGGCTTCTTGGGATA

21	CGCCTGTAATCTCATCTTCTTGG	CACGCTTGTAATCACAGCACTTT	CGCCTGTAATCTCATCTTCTTGG; CACGCTTGTAATCACAGCACTTT; GCTCACTGCAACCCTCTG
22	GGGAGGCTAAAGCAGGAGG	CTGGCTATGTTGACGAGGTGTT	GGGAGGCTAAAGCAGGAGG; CTGGCTATGTTGACGAGGTGTT