

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PAULO DE SÁ OSORIO

“ANÁLISE DA MUTAÇÃO p.R337H NO GENE *TP53* EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA DA REGIÃO SUL DO BRASIL.”

Curitiba
2011

Dados da Catalogação na Publicação
Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR
Biblioteca Central

O83a 2011	Osorio, Paulo de Sá "Análise da mutação p.R337H no gene TP53 em pacientes com câncer de mama da região Sul do Brasil / Paulo de Sá Osorio ; orientador, Fábio Rueda Faucz. -- 2011. 34 f. ; il. ; 30 cm Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, Curitiba, 2011 Inclui bibliografias Texto em português e inglês 1. Mamas - Câncer - Pacientes - Brasil. 2. Proteína p53. 3. Câncer - Aspectos genéticos. I. Faucz, Fábio Rueda. II. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título. CDD 20. ed. – 610
--------------	---

PAULO DE SÁ OSORIO

“ANÁLISE DA MUTAÇÃO p.R337H NO GENE *TP53* EM PACIENTES COM
CÂNCER DE MAMA DA REGIÃO SUL DO BRASIL.”

Dissertação apresentada ao curso de
Mestrado em Ciências da Saúde da
Pontifícia Universidade Católica do
Paraná, como requisito à obtenção ao
título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rueda
Faucz.

Curitiba
2011

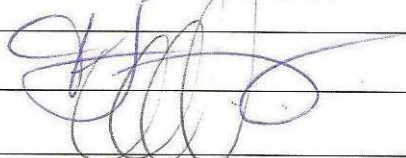


Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.

Aos quatorze dias do mês de setembro de 2011, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação **“ANÁLISE DA MUTAÇÃO p.R337H NO GENE TP53 EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA DA REGIÃO SUL DO BRASIL”** apresentada por **PAULO DE SÁ OSORIO** para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz PUCPR - Presidente	
Prof. Dr. Cleber Machado de Souza PUCPR	
Profª. Drª. Lilian Pereira-Ferrari UNBRASIL	
	LPFerrari.

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz

Conceito: Aprovado

Prof. Dr. Cleber Machado de Souza

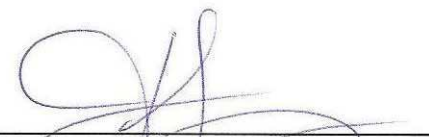
Conceito: Aprovado

Profª. Drª. Lilian Pereira-Ferrari

Conceito: Aprovado

Conceito Final: Aprovado

Observações da Banca Examinadora:


Prof. Dr. Fabio Rueda Faucz
Presidente da Banca Examinadora


Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho
Coordenador do PPGCS PUCPR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, Carlos e Elaine, pelo carinho e exemplo de vida.

À Carla, pelo apoio e paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela minha saúde.

Ao meu co-orientador e amigo, Prof. Dr. Fabiano Sandrini, que me ofereceu a oportunidade de realizar este projeto, muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Fabio Faucz, que me aceitou como seu orientado e me “aturou” durante todas as etapas do projeto, sempre me incentivando e auxiliando-me em todas as etapas necessárias para a conclusão do trabalho.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação da PUC PR.

A toda equipe da União Oeste Paranaense de Estudos e Combate ao Câncer de Cascavel, pelo apoio e estrutura que me cederam para a coleta de dados para essa pesquisa, em especial, ao Dr. Emerson Wander Silva Soares, que me forneceu as amostras para essa pesquisa.

Ao Dr. Alexandre Galvão Bueno pelo seu auxílio no momento da realização de uma etapa importante no trabalho, onde sua expertise foi de grande ajuda.

Ao Laboratório Álvaro – Diagnósticos da América, que me disponibilizou a sua estrutura para realização desse projeto, meus sinceros agradecimentos.

À minha família pelo apoio, carinho e pela compreensão em todos os meses de dedicação ao mestrado.

Aos meus amigos, que compreenderam meus momentos de ausência e me auxiliaram em todo este processo.

A Carla, com amor, admiração e gratidão por sua compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo do período de elaboração deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram para esse estudo.

EPÍGRAFE

“Se um homem tem um talento e não tem capacidade de usá-lo, ele fracassou. Se ele tem um talento e usa somente a metade deste, ele fracassou parcialmente. Se ele tem um talento e de certa forma aprende a usá-lo em sua totalidade, ele triunfou gloriosamente e obteve uma satisfação e um triunfo que poucos homens conhecerão.”

Thomas Wolfe

SUMÁRIO

Introdução	9
Artigo	15
Conclusão	29
Referências bibliográficas	30

INTRODUÇÃO

O câncer é uma neoplasia maligna originada por um conjunto de causas, onde o acúmulo de deficiências genéticas hereditárias ou adquiridas parece ser fundamental. Dentre os genes relacionados aos fatores genéticos predisponentes a carcinogênese existem duas classes que parecem apresentar papel importante: os proto-oncogenes, que estimulam o crescimento celular; e os supressores tumorais, que o inibem. Quando mutados, os proto-oncogenes produzem uma multiplicação celular excessiva e, por sua vez, os supressores perdem a capacidade de inibir esse crescimento desenfreado. Os oncogenes e genes supressores de tumor têm sido associados a diferentes tipos de neoplasias, sendo que o gene supressor tumoral *TP53* é o que, com maior frequência, apresenta alterações (WEISS *et al.*, 1995; VOLGESTEIN *et al.*, 2004).

O modelo atualmente aceito para a função da proteína p53 é que ela exerce o papel de fator de transcrição envolvido no controle da progressão do ciclo celular, manutenção do DNA e integridade do genoma, reparação de danos ao DNA e apoptose. A perda da função da proteína p53 elimina o bloqueio do crescimento como resposta ao dano no DNA e pode permitir replicação do DNA danificado. Como consequência os tumores ocasionados por mutações neste gene normalmente apresentam uma elevada frequência de mutações em outros genes e um aumento da frequência de duplicações e deleções de genes. Uma expressão alterada dos alvos transcripcionais do gene *TP53* também seria esperada (BORRESEN-DALE, 2003).

Attardi e Jacks (1999) mostraram que a perda da atividade da p53 interfere na atividade de apoptose e acelera o aparecimento de tumores em

ratos transgênico. Porém Shaulsky *et al.* (1991) sugerem que as mutações no gene *TP53* de alguns tecidos, onde ocorra a perda do mecanismo de supressão, não seriam suficientes para que se desenvolva tumor.

Entretanto, as mutações predispõem as células a terem um crescimento celular desenfreado que poderiam induzir a uma divisão celular de característica maligna (SHAULSKY *et. al.*, 1991).

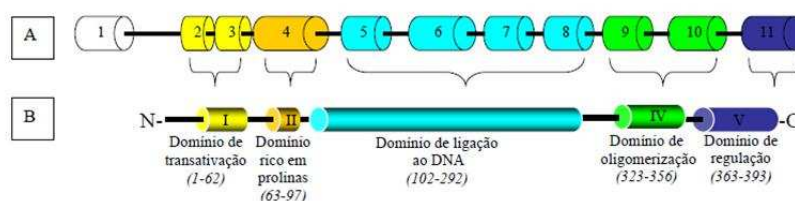
Apesar das mutações do *TP53* serem principalmente somáticas, classicamente mutações germinativas deste gene estão relacionados à Síndrome de Li-Fraumeni (SLF) (MALKIN *et. al.*, 1990; ACHATZ *et.al.*, 2007). Descrita inicialmente por Li e Fraumeni, em 1969, a síndrome é caracterizada por múltiplos tumores primários em crianças e adultos jovens, sendo predominantemente de partes moles, tumor cerebral, osteossarcomas, carcinoma adrenocortical, leucemias e mama. A SLF é uma forma rara de câncer familiar e apresenta herança autossômica dominante (LI; FRAUMENI, 1969; VARLEY, 2003; UPTON *et. al.*, 2009).

Estima-se que pacientes com SLF apresentem 50% de chance de desenvolver tumores antes dos 30 anos de idade, comparados a 1% na população em geral e que 90% dos portadores desenvolvem câncer até 70 anos de idade (MALKIN *et.al*, 1990).

Para um diagnóstico preciso de SLF devemos realizar uma minuciosa anamnese, com uma história familiar muito precisa, pois algumas famílias com SLF e Li-Fraumeni Like (LFL) apresentam quadros clínicos que se sobrepõem aos de outras síndromes genéticas ligadas ao câncer, como a alta incidência de câncer de mama em idade jovem, dificultando assim o diagnóstico. (ACHATZ *et.al*, 2009).

Freqüentemente esporádico, o câncer de mama também pode estar associado à diversas síndromes como a Síndrome de Cowden, devido a mutações no gene PTEN; Síndrome de Peutz-Jeghers, pela presença de mutações no gene STK11; Síndrome do Câncer de Mama e Ovário Hereditário que está associada a mutações nos genes BRCA1 e BRCA2; e ainda Síndrome de Li-Fraumeni, por mutações germinativas no gene *TP53* (WEISS *et.al.*, 1995; VOLGESTEIN *et.al.*, 2004).

O gene *TP53* localiza-se no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1) e codifica uma fosfoproteína nuclear de peso 53 kDa composta por 393 aminoácidos, que se estendem por 11 exons, sendo o primeiro não codificante (SOUSSI *et.al.*, 1994). A proteína p53 humana possui cinco domínios sendo cada um deles responsável por funções específicas (MAY e MAY 1999). O domínio inicial (exon 2 e 3), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína Mdm2. É seguido por um domínio rico em resíduos de prolina (exon 4) e pela região central da p53, que abriga o domínio de ligação ao DNA (exon 5-8). O domínio de oligomerização (exon 9 e 10) é fundamental na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros. O domínio final (exon 11) é o de regulação (Figura 1) (ACHATZ *et.al.*, 2009). De



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

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

todas as mutações observadas (somáticas e germinativas), 89% ocorrem nas regiões entre os exons 5-8 (GREENBLATT *et.al.*, 1994).

Dentro deste gene, uma mutação que tem se mostrado importante em associação com tumores, na região sul do Brasil, é a mutação p.R337H. Esta mutação está localizada no exon 10 do gene *TP53*, resulta em uma substituição do aminoácido arginina, de códon CGC, pelo histidina, de códon CAC na posição 337 da proteína, na base 1010 (LATRONICO *et.al.*, 2001).

A mutação p.R337H foi inicialmente detectada em crianças com tumores adrenocorticais em famílias sem nenhum histórico de câncer familiar (LATRONICO *et.al.*, 2001; RIBEIRO *et.al.*, 2001).

Latronico *et al.* (2001) estudaram a mutação p.R337H em crianças e adultos, da região sul do Brasil, com tumores esporádicos benignos e malignos das adrenais, sem nenhum histórico familiar significativo de câncer. A mutação está presente em 78% das amostras, entretanto não estava restrita ao grupo pediátrico, pois foi encontrada em 14% das amostras de adultos. A presença dessa mutação em adultos foi relatada como um prognóstico desfavorável para os adultos, mas não nas crianças.

Sandrini *et al* (2005), analisaram a frequência da mutação germinativa p.R337H do *TP53* em crianças com tumores esporádicos das adrenais provenientes da região oeste do estado do Paraná e verificaram que a mutação estava presente em 75% das crianças.

Posteriormente a mutação p.R337H foi relacionada com famílias brasileiras com SLF e LFL, sendo a mais freqüente mutação encontrada dentre todas as do gene *TP53*, apresentando um amplo espectro de tumores que

incluíam câncer de mama, câncer no cérebro e adenocarcinomas (ACHATZ *et al.*, 2007).

Palmero *et al.* (2007), verificaram a incidência da mutação p.R337H na população em geral, analisando 750 mulheres saudáveis da região sul do país, sendo detectada em 2 mulheres que possuíam história familiar de câncer em múltiplos sítios. De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa do Câncer (IARC), a mutação germinativa p.R337H do gene *TP53* foi observada em 251 amostras das 2482 disponíveis no banco de dados do IARC. Destas, 248 se encontram no Brasil, associadas a vários tipos de tumores, e apenas 53 delas não estão relacionadas com a SLF (PETITJEAN *et.al.*, 2007).

A frequência de SLF na população em geral é de 1:5000 (LALOO *et al.* 2003), porém a frequência da mutação p.R337H no Brasil é 10-20 vezes maior do que qualquer outra mutação do *TP53* associada a SLF (ACHATZ *et.al.*,2009).

Dentre todos os tumores da síndrome de Li-Fraumeni, o de mama é o segundo mais freqüente no mundo, sendo a principal neoplasia em mulheres americanas (VARLEY, 2003; UPTON *et.al*, 2009).

O câncer de mama por sua vez é o que causa mais morte em mulheres e sua incidência é de mais de 11 mil novos casos ao ano no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). No estado do Paraná, o câncer de mama é considerado o terceiro tumor mais freqüente, representando 12,4% do total de casos de câncer admitidos entre o ano de 2000 e 2004 pelo Hospital Erasto Gaertner (LIGA, 2007), mas o primeiro tumor mais freqüente em mulheres com uma incidência estimada de 3 mil novos casos no ano de 2010 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

A maioria das mutações observadas em câncer de mama tem origem somática (LACROIX *et al.*, 2006), que são responsáveis por 98% das mutações observadas em tumores (HOLLSTEIN *et al.*, 1991) e 40-45% destas mutações estão relacionadas a mutações no *TP53* (SOUSSI *et al.*, 1994).

Mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 são relacionadas às formas familiares de câncer de mama. Mutações nestes genes também têm sido observadas nas formas esporádicas, entretanto com uma incidência significativamente menor. Nas formas não familiares de carcinoma de mama, mutações no gene *TP53* parecem ser tão freqüentes quanto às mutações em BRCA1 e BRCA2 (LALLOO *et al.*, 2006).

A freqüência de mutações do *TP53* em câncer de mama é de 30% (TROESTER *et al.*, 2006) e está associada a uma doença mais agressiva com pior prognóstico, independente de outros fatores de risco e também com uma resistência a certas terapias utilizadas contra o câncer (GASCO *et al.*, 2002; TROESTER *et al.*, 2006).

Sendo assim a correlação da mutação p.R337H com o câncer de mama esporádico é importante para determinarmos se a alta incidência da mutação pode estar diretamente ligada ao alto desenvolvimento de câncer de mama na região Sul. A existência de uma relação conhecida entre o câncer de mama e mutações no gene *TP53*, em especial a mutação p.R337H, poderia fornecer maiores informações sobre a etiologia desta doença e possibilitar a criação de novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico mais precisos.

ARTIGO

Short Report

p.R337H mutation in gene *TP53* in breast cancer patients

Paulo de Sá Osorio^{1,4}, Carla Mariléia Frasson^{1,4}, Emerson Wander Silva Soares², Alexandre Galvão Bueno³, Fabiano Sandrini¹, Fabio Rueda Faucz⁴

1) Álvaro Center for Analysis and Clinical Research – Diagnósticos da América (DASA), Cascavel, Paraná, Brasil; 2) Department of Surgical Oncology, West Paraná Union to Study and Fight Cancer (UOPECCAN - União Oeste Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer), Cascavel, Paraná, Brazil; 3) Department of Pathology, UOPECCAN, Cascavel, Paraná, Brazil; 4) Group for Advanced Molecular Investigation (NIMA), Graduate Program in Health Sciences (PPGCS), Center for Biological and Health Sciences (CCBS), Pontificia Universidade Catolica do Parana (PUCPR) Curitiba, Paraná, Brazil.

Running title: p.R337H mutation in breast cancer

Key words: *TP53*, breast cancer, p.R337H

Word count: 1982

To whom correspondence should be addressed: : Paulo de Sá Osorio. Paulo.osorio@dasa.com.br, Rua General Osório, 3212, Centro, 85801-110, Cascavel, PR, Brazil.
Phone: +55 (45) 3220 – 8000 Fax +55 (45) 3220 - 8077

SUMMARY

Background: Germline p.R337H mutation in gene *TP53* is highly prevalent in sporadic adrenalcortical tumors (ACT) in southern Brazil, where a high incidence of these tumors has been observed. Similar to ACT, breast cancer, also frequent in this region, is related to Li-Fraumeni syndrome (LFS) as well as to *TP53* gene mutations. Until now, the p.R337H mutation has not been evaluated in breast tumors in southern Brazil.

Objective: In the present study we investigated the presence of p.R337H mutation in the *TP53* gene in breast cancer patients.

Methods: The p.R337H mutation was investigated in blood and tumor samples by means of restriction enzyme analysis and sequencing of exon 10 in the *TP53* gene.

Results: The p.R337H mutation was observed in 2 of 147 breast cancer patients and not observed in any of the 191 control subjects. Both positive patients had suggestive familial history of LFS.

Conclusion: The p.R337H mutation in gene *TP53* is associated with LFS, but not with sporadic breast cancer in patients from southern Brazil.

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most common cancer in women and is responsible for the greatest number of female deaths from tumors. It is estimated that worldwide, more than one million women are diagnosed with BC every year (1). In Brazil, more than 11 thousand new BC cases occur each year (2). Sporadic BC is frequently associated with several syndromes, such as the Cowden syndrome, caused by mutations in the *PTEN* gene; Peutz-Jeghers syndrome, caused by mutations in gene *STK11*; and Li-Fraumeni syndrome (LFS), caused by germline mutations in the gene *TP53* (3).

Although *TP53* mutations are mainly somatic, classically, germline mutations in this gene are related to LFS, an autosomal dominant rare form of familial cancer syndrome. Individuals affected by the syndrome present mutations in the *TP53* gene and several types of cancer, mainly brain tumors, sarcomas, adrenal tumors, leukemia, and BC. Among all LFS tumors, BC is the second most frequent in the world, and is the most common neoplasm affecting North-American women (4).

In non-familial BC, mutations in the *TP53* gene seem to be as frequent as those in the *BRCA1* and *BRCA2* genes (5). About 98% of the mutations observed in BC cases are somatic (6) and from these, 40-45% are related to mutations in the *TP53* gene (7).

The p.R337H mutation located on exon 10 of *TP53* gene is observed in about 75% of the sporadic adrenocortical tumors (ACT) in children from the western region of the state of Parana. This mutation is caused by the substitution of amino acid arginine, specified by the codon CGC for histidine

and specified by the codon CAC which is in position 337 of the protein base 1010 (c.1010G>A) (8).

We evaluated whether or not the p.R337H mutation in the *TP53* gene observed in patients with ACT that are highly prevalent in southern Brazil was also found in BC patients from the same area.

MATERIAL AND METHODS

2.1 Patients

Patients who underwent removal of breast nodules in UOPECCAN (União Oeste Paranaense de Estudo e Combate ao Câncer), from March 8th, 2010 to October 31st, 2010, were invited to take part in the study. During the surgery, a peripheral blood sample and a tumoral tissue sample of the material removed were collected from each patient. Only those samples for which diagnosis of BC was confirmed were used in the study. Tumor samples of patients who presented the germline p.R337H mutation were also analyzed for loss of heterozygosity.

A total of 147 women with BC were included in the study. Age ranged from 31 to 89 years old (mean age of 56 years old). From this group, 28 women presented a history of familial cancer. From these, 18 had history of familial breast carcinoma, and 2 presented a familial pattern of LFS and/or Li-Fraumeni-like syndrome (LFL). Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the Institutional Review Boards of participating centers.

The control group included 191 women, 35 years of age and above (a mean age of 58 years old, ranging from 35 to 91 years old) who were seen at Álvaro Center of Research and Clinical Analysis, Cascavel, Parana, and were not diagnosed as carriers of BC or any other kind of neoplasm and/or had suggestive familial history of cancer.

2.2 DNA analysis

Genomic DNA was extracted with the commercial kit QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, USA).

Amplification of the exon 10 was carried out in 10 µl of PCR mix containing 100-200 ng of genomic DNA; 1 µl of 10x buffer; 1.5 mM MgCl₂; 1.2 µM of each primer (5'-TTG AAC CAT CTT TTA ACT CAG G-3' (forward) and 5'-ATG AAG GCA GGA TGA GAA TG-3' (reverse)); 0.2 mM deoxynucleotide triphosphate (dNTP); 1.25U Taq DNA Polymerase (Invitrogen, USA) and water to 10 µl.

GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) thermocycler was used in the following cycle: denaturation at 95°C for 5 minutes followed by 30 cycles at 94°C for 1 minute, 60°C for 1 minute, 72°C for 1 minute, and a final cycle at 72°C for 7 minutes of incubation.

The amplicon was cleaved by *HhaI* endonuclease according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, USA). Digested fragments harboring wild-type sequences showed two bands (82 and 177 base pairs), whereas alleles with p.R337H mutation were not cleaved and showed only one band (259 base pairs).

Some samples were sequenced to confirm the RFLP analysis. Those samples were purified using the commercial kit QIAQuick PCR Purification (Qiagen, USA) and the amplicons were then sequenced using the BigDye Terminator Sequence v3.1 (Applied Biosystems, USA).

RESULTS

3.1 Analysis of the gene encoding protein P53

Cleavage of the *TP53* gene by the restriction enzyme was carried out in peripheral blood samples collected from 147 patients and in 191 controls. The cleavage pattern for the heterozygous p.R337H mutation was observed in two patients for both blood and tissue, and this mutation was then confirmed by sequencing. Both patients presented a familial history compatible with LFS. The mutation was not observed in any of the samples collected from the control group.

DISCUSSION

Mutations in the *TP53* gene are found in most human cancers and are responsible for the inactivation of protein P53, which causes loss of apoptosis control and consequent proliferation of tumor cells (9). According to the International Agency for Research on Cancer, the germline p.R337H mutation was observed in France, Portugal and Brazil. In France, it was described in

brain and adrenal cancer (10); in Portugal the mutation was observed in adrenal cancer (11), and in Brazil, both in adrenals and BC (8, 12-14).

In an analysis of worldwide data, the germline p.R337H mutation was seen in 41 samples of the 560 BC patients, and only one of these samples was collected from a patient who did not have history of familial cancer. All others were associated with LFS (15).

Mutations in the *TP53* gene are frequent in BC, however, only in Brazil was the p.R337H (c.1010G>A) mutation reported to be associated with this disease (12, 13, 15-17).

In the present study, the germline p.R337H mutation was found in two of the 147 BC patients analyzed. However, these could be linked with LFS, similar to the findings of Assumpção *et al.* (2008), who analyzed 123 women with BC, both sporadic and familial, and only three had the mutation. From these samples, two presented familial history of LFL (13).

Achatz *et al.* (2007) also observed the presence of mutation in the *TP53* gene in 45 samples of patients with familial pattern of LFS. Mutations in *TP53* were found in 13 samples, and the p.R337H mutation was the most frequent. In these samples, BC was the most common tumor pattern found (12).

Assumpção *et al.* (2008) demonstrated that patients who showed a p.R337H mutation, together with other genetic factors, may present a significantly increased risk for BC. The p.R337H mutation is 10-20 times more frequent than other mutations in the *TP53* gene associated with LFS. In the general population, the frequency is 1:5000 (18). The frequency of this mutation, however, is directly associated with clinical diagnoses of LFS/LFL, and not of BC.

We observed a lower incidence of this mutation in breast tumors than in ACT of pediatric patients in southern Brazil (8). In contrast to that observed by Assumpção *et al.* (2008), we did not find germline mutations in sporadic BC. In order to assess the incidence of this mutation in the general population, Palmero *et al.* (2008) analyzed 750 samples of healthy women, and the mutation was found in 2 of these (0.3%). These samples were from two women that were fourth degree relatives and had familial history of cancer in different sites, a finding that corresponds with LFS. These results suggest that the mutant allele may have low penetrance and may predispose multiple tumors, occurring in a greater frequency than any other *TP53* mutation associated with LFS (17).

Recent reports on the presence of this mutation in tumor samples have been more related to clinical diagnoses of LFS (9, 12, 17). Among the different types of tumors associated to this syndrome, BC is the most common, occurring between 24 and 64 years of age and representing 25% of all diagnosed tumors (16).

The presence of the mutation in two samples of patients with familial pattern of LFS is not sufficient evidence for establishing a relationship between sporadic BC and the p.R337H (c.1010G>A) mutation on exon 10 of the *TP53* gene, as suggested by Assumpção *et al.* (13). These findings suggest that this mutation has been observed in women with BC associated with LFS. However, considering that the estimated prevalence of p.R337H in the southern Brazil is 0.3%, the high incidence of carriers in this population suggests that the mutation may be a determining factor in the occurrence of cancer in this region (17). The incidence of p.R337H mutation is higher in individuals from southern Brazil,

however the incidence of BC is not higher than in others regions. Therefore, other modifier genes are needed to express the p.R337H mutation and cause breast tumors (12,17).

Due to this high incidence, further studies identifying these gene modifiers have been carried out to determine the risk of cancer associated with p.R337H, and thus help to understand the different responses of each type of tumor cell as well as predict who could be at higher risk among p.R337H carriers (16).

ACKNOWLEDGEMENTS - We thanks the Alvaro Center for Analysis and Clinical Research – Diagnosticos da América for its support.

CONFLICTING INTERESTS - None declared.

PATIENT CONSENT - Obtained.

ETHICS APPROVAL - This study was conducted with the approval of the West Paraná Union to Study and Fight Cancer (UOPECCAN) Research Ethics Committee (TA 004/2010).

PROVENANCE AND PEER REVIEW - Not commissioned; externally peer reviewed.

COPYRIGHT LICENSE STATEMENT

I *Paulo de Sá Osorio* The Corresponding Author of this article (the “Contribution”) has the right to grant on behalf of all authors and does grant on behalf of all authors, a licence to the BMJ Publishing Group Ltd and its licensees, to permit this Contribution (if accepted) to be published in *Journal of Medical Genetics (JMG)* and any other BMJ Group products and to exploit all subsidiary rights, as set out in our licence set out at: (<http://jmg.bmj.com/site/about/licence.pdf>).

REFERENCES

- [1] Tfayli A, Temraz S, Abou MR, Shamseddine A. Breast cancer in low- and middle-income countries: an emerging and challenging epidemic. J Oncol 2010;**2010**:490631.
- [2] **Ministério da Saúde**. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>. Published 2009. Accessed January 10, 2011.
- [3] Petrakis NL. Genetic factors in the etiology of breast cancer. Cancer 1977 Jun;**39**(6 Suppl):2709-15.
- [4] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. CA Cancer J Clin 2010 Sep;**60**(5):277-300.
- [5] Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise handbook of familial cancer susceptibility syndromes - second edition. J Natl Cancer Inst Monogr 2008;(38):1-93.
- [6] Lacroix M, Toillon RA, Leclercq G. p53 and breast cancer, an update. Endocr Relat Cancer 2006 Jun;**13**(2):293-325.
- [7] Soussi T, Legros Y, Lubin R, Ory K, Schlichtholz B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. Int J Cancer 1994 Apr 1;**57**(1):1-9.

- [8] Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de CM, Elias LL. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res* 2005 Apr;**37**(4):231-5.
- [9] Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent *TP53* mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? *Lancet Oncol* 2009 Sep;**10**(9):920-5.
- [10] Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, Gardes M, Dessarps-Freichey F, Abel A, Hua D, Ligot L, Dondon MG, Bressac-de PB, Frebourg T, Lemerle J, Bonaiti-Pellie C, Feunteun J. P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. *Br J Cancer* 2000 Jun;**82**(12):1932-7.
- [11] Pinto C, Veiga I, Pinheiro M, Peixoto A, Pinto A, Lopes JM, Reis RM, Oliveira C, Baptista M, Roque L, Regateiro F, Cirnes L, Hofstra RM, Seruca R, Castedo S, Teixeira MR. *TP53* germline mutations in Portugal and genetic modifiers of age at cancer onset. *Fam Cancer* 2009;**8**(4):383-90.
- [12] Achatz MI, Olivier M, Le CF, 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* 2007 Jan 8;**245**(1-2):96-102.
- [13] Assumpcao 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* 2008;**8**:357.
- (14) Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell 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 U S A* 2001 Jul 31;**98**(16):9330-5.
- (15) 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* 2007 Jun;**28**(6):622-9.
- (16) Marcel V, Palmero EI, Falagan-Lotsch P, Martel-Planche G, Ashton-Prolla P, Olivier M, Brentani RR, Hainaut P, Achatz MI. *TP53* PIN3 and MDM2 SNP309 polymorphisms as genetic modifiers in the Li-Fraumeni syndrome: impact on age at first diagnosis. *J Med Genet* 2009 Nov;**46**(11):766-72.
- (17) Palmero EI, Schuler-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 *TP53* mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. *Cancer Lett* 2008 Mar 8;**261**(1):21-5.

- (18) Lalloo F, Varley J, Ellis D, Moran A, O'dair L, Pharoah P, Evans DG.
Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast
cancer by family history. *Lancet* 2003 Mar 29;**361**(9363):1101-2.

CONCLUSÃO

1. A mutação germinativa p.R337H (c.1010G>A) foi encontrada em 2 das 147 amostras de pacientes com câncer de mama;
2. Não foi observado a perda de heterozigozidade da mutação R337H nas amostras tumorais das pacientes.
3. A presença de cânceres de mama e a mutação p.R337H estão relacionados com a presença de cânceres em familiares associados com a Síndrome de Li-Fraumeni;
4. Não foi encontrada a mutação R337H do gene TP53 nas 191 amostras do grupo controle.
5. Não há relação da mutação germinativa p.R337H (c.1010G>A) em indivíduos da região Sul do Brasil com a forma esporádica de câncer de mama.

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.** Sep;10(9):920-5, 2009.

ACHATZ MI, OLIVIER M, LE CF, MARTEL-PLANCHE G, LOPES A, ROSSI BM, ASHTON-PROLLA P. GIUGLIANI R. PALMERO EL, 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.** Jan 8; 245(1-2):96-102, 2007.

ATTARDI LD, JACKS T. The role of p53 in tumour suppression: lessons from mouse models. **Cell Mol Life Sci** Jan;55(1):48-63, 1999.

BORRESEN-DALE AL. TP53 and breast cancer. **Hum Mutat** Mar;21(3):292-300, 2003.

GASCO M, SHAMI S, CROOK T. The p53 pathway in breast cancer. **Breast Cancer Res**, 4:70-76, 2002.

GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M, HARRIS CC. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene, Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis. **Cancer Research**. 54:4855-4878, 1994.

HOLLSTEIN M., SIDRANSKY D., VOGELSTEIN B., HARRIS C.C. p53 mutations in human cancers. **Science**. 253(5015):49-53, 1991.

LACROIX, M.; TOILLON, R.A.; LECLERCQ, G. P53 and breast cancer, un update. **Endocrine-Related Cancer**, n. 13; p. 293-325, 2006.

LALLOO F, VARLEY J, ELLIS D, MORAN A, O'DAIR L, PHAROAH P, EVANS DG. Prediction of pathogenic mutations in patients with early-onset breast cancer by family history. **Lancet**. Mar 29; 361(9363):1101-2, 2003.

LALLOO F, VARLEY J, MORAN A, ELLIS D, O'DAIR L, PHAROAH P, ANTONIOU A, HARTLEY R, SHENTON A, SEAL S, BULMAN B, HOWELL A, EVANS DG. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. **Eur J Cancer**;42:1143-1150, 2006.

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(10):4970-3. 2001.

LI FP, FRAUMENI JF. Soft-Tissue Sarcomas, Breast Cancer, and Other Neoplasms. A Familial Syndrome? **Annals of Internal Medicine**. 71 (4), 747-752, 1969.

LIGA PARANAENSE DE COMBATE AO CÂNCER. – Relatório Epidemiológico: RHC 2000 a 2004. - Curitiba: LPCC. 102 p. 2007.

MALKIN D, LI FP, STRON LC, FRAUMENI JF, NELSON CE, KIM DH, KASSEL J, GRYKA MA, BISCHOFF FZ, TAINSKY MA, FRIEND SH. Germ Line p53 Mutations in a Familial Syndrome of Breast Cancer, Sarcomas, and other Neoplasms. **Science**. 250:1233-1238, 1990.

MAY P, MAY E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. **Oncogene**. 18:7621-7636, 1999.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 10 de Janeiro de 2011.

PALMERO EI, SCHULER-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 TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett**. Mar 8; 261(1):21-5, 2008.

PETITJEAN A, ACHATZ MI, BORRESEN-DALE AL, HAINAUT P, OLIVIER M. TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes. **Oncogene**. Apr 2; 26(15):2157-65, 2007.

RIBEIRO RC, SANDRINI F, FIGUEIREDO B, ZAMBETTI GP, MICHALKIEWICZ E, LAFFERTY AR, DELACERDA L, RABIN M, CADWELL 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 U S A** ;98:9330-9335, 2001.

SANDRINI F, VILLANI DP, TUCCI S, MOREIRA AC, DE CASTRO M, ELIAS LL. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Horm Metab Res.**37(4):231-5, 2005.

SHAULSKY G, GOLDFINGER N, PELED A, ROTTER V. Involvement of wild-type p53 in pre-B-cell differentiation in vitro. **Proc Natl Acad Sci USA.** Oct 15;88(20):8982-6.

SOUSSI T, LEGROS Y, LUBIN R, ORY K, SCHLICHTHOLZ B. Multifactorial analysis of p53 alteration in human cancer: a review. **Int J Cancer.** 1;57(1):1-9, 1994.

TROESTER MA, HERSCHKOWITZ JI, OH DS, HE X, HOADLEY KA, BARBIER CS, PEROU CM. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. **BMC Cancer.** 6:276-289, 2006.

UPTON B, CHU Q, LI BD. Li-Fraumeni syndrome: the genetics and treatment considerations for the sarcoma and associated neoplasms. **Surg Oncol Clin N Am.** 18(1):145-56, 2009.

VARLEY JM. Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. **Hum Mutat.** 21(3):313-20, 2003.

VOLGESTEIN, B; KINZLER, KW. Cancer genes and the pathways they control. **Nature Medicine**, v.10, n.8, p.789-799, 2004.

WEISS J, HEINE M, ARDEN KC, KÖRNER B, PILCH H, HERBST RA, JUNG EG. Mutation and expression of TP53 in malignant melanomas. **Recent Results Cancer Res.**139:137-54, 1995.