

# **Síndrome de Li-Fraumeni**

Fernanda Pandolfo

Luciano Paulo Massi

Maiquel da Silva

Monitor: Rachid Karam

Porto Alegre, 20 de novembro de 2001

## **RESUMO**

A síndrome de Li-Fraumeni apresenta um padrão de herança autossômico dominante negativo, que se caracteriza pela ocorrência de múltiplos cânceres primários, resultantes de mutações germinativas. 70% das mutações são no gene supressor de tumor TP53 que promove a parada do ciclo celular ou a apoptose, quando há dano do DNA. Apesar dos avanços dos métodos moleculares para se detectar a mutação, ainda não se desenvolveu um método efetivo de tratamento para as famílias com síndrome de Li Fraumeni.

## **PALAVRAS-CHAVES**

Gene, TP53, mutação, síndrome de Li-Fraumeni

### **ABSTRACT**

The Li-Fraumeni syndrome is an autosomal dominant-negative disease and is characterized for the incidence of several human cancers, resulted from a germline mutation. 70% of the mutations are in the tumor suppressor gene TP53 that promotes cell cycle arrest or induces apoptosis, when DNA damage occurs. Although molecular diagnosis are improving in order to detect mutations, there is not an effective method of treatment to families with Li-Fraumeni syndrome.

### **KEYWORDS**

Gene, TP53, mutation, Li-Fraumeni syndrome

## 1.0 INTRODUÇÃO

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) caracteriza-se por mutações na linhagem germinativa, principalmente no gene TP53 <sup>(1)</sup>. Lee e Berstein sugerem que esse gene funcione como um guardião do genoma, evitando a proliferação de uma célula que tenha um dano genético <sup>(2)</sup>. Essas alterações gênicas proporcionam uma alta taxa de tumores malignos na infância e em adultos jovens. Embora a mutação hereditária no TP53 seja muito rara nos diferentes cânceres humanos, ela tem sido freqüentemente detectada na LFS <sup>(3)</sup>. As mutações do gene supressor de tumor TP53 em células germinativas tem sido demonstradas em 70% das famílias com diagnóstico clínico de LFS <sup>(4)</sup>.

A mutação do TP53, que é a mais freqüente alteração genética detectada nos cânceres humanos, inativa as funções regulatórias de crescimento celular, causa a perda da atividade supressora de tumor e, em alguns casos, confere uma função promotora do tumor, com a ativação de genes envolvidos na proliferação celular, no aumento da sobrevivência da célula e na angiogênese <sup>(5)</sup>.

Clinicamente essa síndrome afeta crianças e adultos jovens caracterizando-se por um grande espectro de tumores, incluindo tumores de partes moles, sarcomas ósseos, tumores de cérebro, da adrenal e de mama pré-menopausa <sup>(6)</sup>. O diagnóstico clínico se faz através de critérios que relacionam o número de neoplasias, a idade em que surgem, os tipos e a distribuição dessas dentro da família <sup>(7)</sup>.

A LFS é considerada uma desordem autossômica dominante negativa, padrão de herança característico de moléculas como a proteína p53. Esse padrão ilustra a complexidade genética que está por trás das mutações e justifica o crescimento das investigações no campo da patologia molecular.

Desde o advento de testes diagnósticos para detectar alterações em nível molecular, o número de casos diagnosticados tem aumentado drasticamente. Com o desenvolvimento do PCR e do Single-Strand Conformation Polymorfism (SSCP) pode-se detectar a presença de alterações no DNA, que permite levantar expectativas sobre o surgimento de neoplasias na população.

A LFS está relacionada a uma alta taxa de morbimortalidade em consequência das diferentes localizações das neoplasias e das repercussões sistêmicas por elas provocada. Não há um tratamento definitivo para familiares portadores dessa síndrome; entretanto, a detecção precoce da mutação poderá fornecer informações e orientar para futuras intervenções.

## 2.0 HISTÓRICO

Em 1968, Miller analisou 21.659 certificados de óbitos de crianças americanas que morreram de câncer e foi constatada uma alta taxa de mortalidade por sarcomas e também a presença de tumores cerebrais nos seus irmãos. Assim, Li e Fraumeni dedicaram-se a observar e a examinar crianças com rhabdomyosarcoma <sup>(8)</sup>.

Em 1969, a LFS foi originalmente descrita a partir de uma evolução epidemiológica de mais de 600 revisões de histórias clínicas e familiares de pacientes com sarcoma na infância. A definição clínica da síndrome vem sendo refinada nas duas últimas décadas para o diagnóstico prospectivo de outras famílias<sup>(9)</sup>.

Em 1975, Fraumeni et al. descreveram uma família com uma prole de nove adultos em que quatro morreram de leucemia linfocítica ou linfoma histiocítico e um morreu de macroglobulinemia de Waldenstrom complicada por adenocarcinoma de pulmão. Na geração subsequente uma pessoa morreu de doença de Hodgkin. Quatro das nove pessoas saudáveis da família apresentam transformações linfocitárias com fitohemaglutinina e três desses tiveram elevação policlonal de IgM <sup>(4)</sup>.

Embora muitos estudos fossem realizados com essas famílias, permaneceu-se indescritível por 20 anos o elemento causador da LFS. Então, estudos genéticos relacionaram o fato de famílias com a LFS apresentarem herança de alterações no gene supressor de tumor TP53 <sup>(2)</sup>. Em 1990, mutações em células germinativas no gene supressor de tumor TP53 foram identificadas em cinco famílias com o diagnóstico

clínico de LFS. Estudos subsequentes estabeleceram um padrão de recorrência autossômica dominante negativa de pelo menos seis tumores: câncer de mama pré-menopausa, sarcomas de partes moles na infância, osteossarcoma, tumores de cérebro, carcinomas adrenocorticais e leucemia aguda <sup>(4)</sup>.

Lynch et al. (2000) analisou um extenso segmento de uma família com excesso de tumores cerebrais e concluiu que se tratava de uma família com síndrome de Li-Fraumeni. Um paciente da linhagem genética direta apresentou rhabdomyosarcoma com dois anos e cinco meses e aos quatorze anos, leucemia linfoblástica aguda e linfoma linfoblástico. O interessante é que nenhuma mutação no gene TP53 das células germinativas foi identificado em alguns membros da família, o que levou a pensar que outras mutações gênicas estão relacionadas a LFS <sup>(10)</sup>. Atualmente se sabe que mutações em outros genes como o CHK2, por exemplo, também podem levar à síndrome.

### 3.0 EPIDEMIOLOGIA

O interessante da mutação do gene TP53 é que ela aumenta em 25 vezes a chance de uma pessoa de 50 anos desenvolver câncer se comparada com a população em geral<sup>(11)</sup>.

Em famílias portadores da LFS, a probabilidade de desenvolver qualquer câncer invasivo (excluindo carcinomas de pele) alcança em torno de 50% aos 30 anos, enquanto que na população em geral somente 1% desenvolve câncer. Mais de 90% dos portadores da mutação gênica desenvolverão câncer<sup>(10)</sup>.

Segundo Stonea e colaboradores, a análise de famílias portadoras da síndrome identificou as diferentes prevalências entre o amplo espectro de neoplasias. Câncer de mama (39%), câncer cerebral (17%) e câncer de estômago (17%) foram os fenótipos mais freqüentemente encontrados. O câncer da adrenal, que é um achado típico da síndrome, não foi identificado neste estudo<sup>(4)</sup>.

Hisada et al. (1998) quantificaram a incidência de segundo e terceiro câncer primário em indivíduos originários de 24 famílias com diagnóstico de LFS, entre 1968 e 1986. Das 200 pessoas com diagnóstico de câncer compatível com LFS, 30 (15%) desenvolveram um segundo tipo de câncer e 8 indivíduos (4%) desenvolveram um terceiro, enquanto 4 (2%) desenvolveram um quarto tipo. Além disso, o risco relativo de ocorrência de um segundo câncer foi de 5.3, com uma probabilidade acumulada de ocorrência de 57% de segundo câncer 30 anos depois de diagnosticado o primeiro. Os



riscos relativos de um segundo câncer em famílias com essa síndrome foram de 83.0, 9.7 e 1.5 para indivíduos com um primeiro câncer antes dos 20 anos, dos 20 aos 44 anos e acima dos 45 anos, respectivamente <sup>(10)</sup>.

#### 4.0 ASPECTOS CLÍNICOS

Muitos estudos de acompanhamento de famílias portadoras da LFS foram realizados identificando os tipos de cânceres e a faixa etária das pessoas afetadas. O osteossarcoma está entre os tumores mais freqüentes quando associado a mutações do TP53. Os sarcomas de tecido mole e o câncer de mama são predominantes na LFS e aproximadamente 10% dos pacientes desenvolvem tumores cerebrais <sup>(12)</sup>.

Portanto, a LFS foi inicialmente organizada através de observações clínicas seguidas de estudos epidemiológicos. A definição clínica desta síndrome tem sido ampliada para abranger tumores de células germinativas e tumor de Wilms <sup>(8)</sup>. O espectro de cânceres, desta síndrome tem sido determinado incluindo carcinoma de mama, sarcomas de partes moles, tumores de cérebro, osteossarcomas, leucemias e carcinomas adrenais. Existem outros tumores freqüentemente observados nessa síndrome como melanoma, neoplasias gonadais , carcinomas de pulmão, pâncreas, próstata, entre outros <sup>(3)</sup>.

Após inúmeras observações de famílias com um grande número de neoplasias e de acometimento de crianças e de adultos relativamente jovens, foram elaborados critérios para o diagnóstico da LFS.

- 1- Uma família incluindo dois parentes de primeiro grau com cânceres pertencentes ao espectro da LFS, sendo um dos parentes afetado antes dos quarenta e cinco anos <sup>(7)</sup>.
- 2- Crianças ou adultos jovens com um raro tumor em relação a população em geral pertencente ao espectro da LFS, tal como o carcinoma da adrenocortical <sup>(7)</sup>.
- 3- Criança ou adultos jovens com menos de quarenta e cinco anos com múltiplos tumores primários do espectro da LFS <sup>(7)</sup>.

O diagnóstico clínico, portanto, se faz através de critérios que relacionam o número de neoplasias, a idade em que essas surgem, os tipos e a distribuição dessas dentro da família <sup>(7)</sup>. Assim, a determinação da LFS é feita clinicamente, e posteriormente a análise molecular é realizada para identificar o gene mutado.

## **5.0 PATOLOGIA MOLECULAR**

### **5.1 Introdução**

A proteína supressora de tumor p53, considerada a mais importante na prevenção do câncer tem sido estudada por mais de 20 anos. A primeira descrição da p53 foi como uma proteína celular que se liga ao antígeno SV40 T (Lane e Linzer). Ironicamente, a p53 foi inicialmente classificada como uma proteína associada a transformação celular e como um proto-oncogene, pois está freqüentemente superexpressada em tumores e contribui para a imortalização e transformação de células primárias. No entanto, Levine et al. reconheceram que esses estudos detectaram p53 mutante, e num estudo publicado 10 anos depois da identificação da p53 mutante, eles demonstraram que a p53 selvagem, na verdade, inibe a transformação celular. Subseqüentemente, a p53 foi mostrada como um elemento chave para a maquinaria de antiproliferação celular, capaz de induzir a apoptose ou a parada do ciclo celular em resposta a numerosos tipos de estresses. A perda dessa função é o principal contribuinte para a instabilidade genômica, transformação celular e tumorigênese <sup>(5)</sup>.

O gene TP53 é altamente conservado em diversos organismos, sugerindo que a proteína codificada exerce um papel central e crítico na célula <sup>(3)</sup>.

A mutação da p53 geralmente resulta em inativação da função supressora de tumor. No entanto, algumas formas mutantes também conferem um fenótipo com ganho de função, manifestado pelo aumento do crescimento celular e pelo potencial tumorigênico. Essa função promotora de tumor pode significativamente contribuir para a iniciação e/ou progressão de neoplasias <sup>(5)</sup>.

A p53 mutada também é detectável em muitas células que se encontram em alta taxa de replicação, mesmo não-tumorais, mas é indetectável ou presente só em níveis pequenos nas células em repouso <sup>(2)</sup>.

## **5.2 Localização, estrutura e tamanho do gene TP53**

O gene TP53 é formado por 11 éxons, 10 íntrons e mede aproximadamente 20,3 Kb <sup>(13)</sup>.

McBride et al. (1985, 1986) localizaram o gene TP53 no cromossomo 17 na banda terminal do braço curto (17p13). Benchimol et al. (1985) também determinaram que o gene localiza-se no braço curto do cromossomo 17, assim como Isobe et al. (1986) que localizaram o TP53 no 17p13. VanTuinem e Ledbetter (1987) restringiram a localização do gene para 17p13.105-p12 <sup>(2)</sup>.

Reismam et al. caracterizaram a região reguladora do gene TP53. Eles identificaram dois promotores: o primeiro localizado 100 a 250 pares de base “upstream” do primeiro éxon não codificado e o segundo, promotor mais efetivo, dentro do primeiro íntron <sup>(2)</sup>.

### 5.3 Estrutura da proteína p53

A fosfoproteína p53 humana contém 393 aminoácidos com cinco domínios altamente conservados (ver fig. 1A). A p53 tem seu papel principal como um fator de transcrição, induzindo a expressão de vários genes “downstream” em resposta ao estresse genotóxico. O N-terminal contém um domínio ácido (aminoácidos 1 a 42) que interage com os componentes da maquinaria transcricional, como CHK2, TBP e TAFs. Adjacente ao domínio de transativação está uma região rica em prolina (aminoácidos 64 a 92), consistindo de cinco repetições PXXP (onde P é prolina e X é aminoácido), necessária para a apoptose e implicada na regulação negativa da p53. O domínio central (constituído pelos aminoácidos de 102 a 292) é necessário para a ligação a seqüências específicas de DNA. O domínio de oligomerização (aminoácidos 324 a 355) participa da formação dos tetrâmeros de p53 e é essa forma tetramérica que tipicamente se liga ao DNA numa seqüência específica (essa é a forma funcionalmente ativa). O C-terminal (aminoácidos 311 a 393) contém uma seqüência de localização nuclear e exibe capacidade de ligação não específica tanto ao DNA quanto ao RNA, assim como uma atividade de anelamento da fita simples de ácidos nucléicos. Tem sido postulado que essas funções sirvam para detectar danos de DNA. O C-terminal também funciona como um domínio de regulação negativa, talvez em conjunto com o domínio central ou com o domínio de poliprolina, para manter a p53 em uma forma inativa até que modificações como a fosforilação e a acetilação ativem alostericamente a proteína <sup>(5)</sup> (ver fig.1B).

Vogelstein e colegas apontaram que uma das mais notáveis características da estrutura da p53 é a sua correlação com o local de mutação. Assim, os resíduos mais freqüentemente mutados no câncer estão, em sua grande maioria, na região central que se liga ao DNA ou muito próximos dela <sup>(2)</sup>.

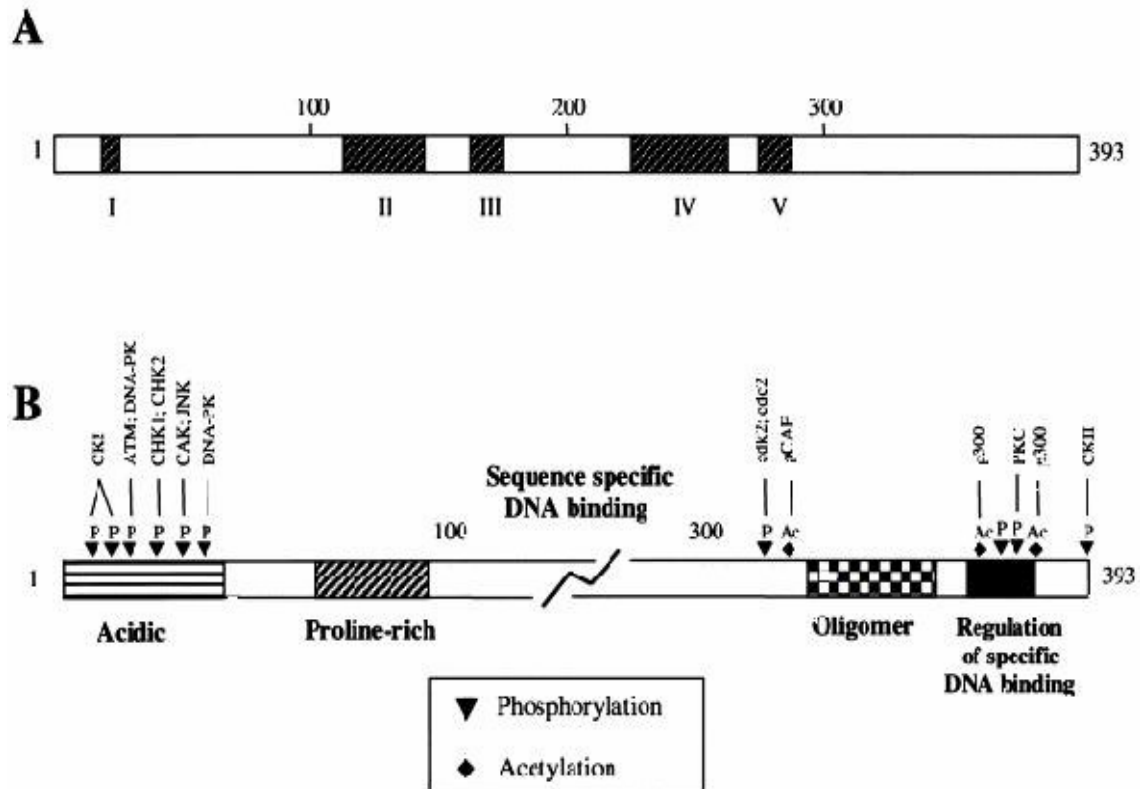


Figura 1: Domínios estruturais e funcionais da proteína p53: (A) A proteína p53 humana consiste de 393 aminoácidos e tem cinco domínios altamente conservados, que estão indicados pelas regiões sombreadas. (B) A p53 também tem muitos domínios funcionais incluindo o domínio ácido ou de transativação, um domínio rico em prolina (postula-se que seja necessário para a regulação da apoptose), domínio de ligação à seqüência específica de DNA, um domínio de oligomerização e um domínio C-terminal. Em resposta às várias formas de estresse celular a proteína é modificada no período pós-tradução por Quinases e acetilases <sup>(5)</sup>.

#### 5.4 Atividade Biológica da p53

A ativação da p53 frequentemente resulta na parada do ciclo celular, presumivelmente para permitir o reparo do DNA antes da replicação e mitose. O primeiro mecanismo pelo qual a p53 controla negativamente o ciclo celular é através da ativação transcricional da p21<sup>WAF1/CIP1</sup>. Em células normais a p21 inibe as quinases dependentes de ciclina (CDK), evitando a fosforilação (inativação) do Rb, o que conseqüentemente pára o ciclo celular na fase G1/S. A Gadd45 é também induzida pela p53 em resposta ao dano do DNA; ela interage com várias proteínas relacionadas com o ciclo celular, como a Cdc2 e a PCNA, e contribui para o reparo do DNA e para a parada do ciclo celular na fase G2/M, contribuindo com a p53 na manutenção da estabilidade genômica <sup>(2;5)</sup> (ver fig. 2).

Em alguns tipos de célula, a ativação da p53 resulta em apoptose ao invés de parada do ciclo celular <sup>(5)</sup>. Experimentos bioquímicos e farmacológicos sugeriram que a p53 leva a célula à apoptose através de três mecanismos: (1) indução transcricional de genes relacionados com a oxi-redução; (2) formação de oxigênio reativo; e (3) degradação oxidativa dos componentes mitocondriais, culminando com a morte celular <sup>(2)</sup>. Essa ativação da morte celular programada pela p53 ainda é pobremente entendida, mas um número de genes efetores “downstream”, conhecidos por serem regulados pela p53, são indutores pró-apoptose. Um exemplo é o gene bax, cuja superexpressão é suficiente para induzir a morte celular, no entanto não é necessário para a apoptose



dependente da p53, pelo menos em alguns tipos de células (ver fig. 2). O fator de crescimento insulina “like” ligante a proteína 3 (IGF-BP3) é também regulado pela p53 e pode ativar a apoptose, bloqueando seletivamente rotas de sobrevivência das células mitóticas. Outros genes regulados pela p53 que contribuem para a apoptose são: KILLER/DR5, FAZ/APO1, Noxa, ei24/PIG8 e Puma <sup>(5)</sup>.

Recentemente descobriu-se que a p53 selvagem também tem atividade supressora de transcrição, suprimindo alguns promotores celulares, o que pode ser importante para a resposta apoptótica, o controle do ciclo celular e outras funções biológicas importantes. Por exemplo, a Bcl-2 é suprimida pela p53 selvagem e a perda dessa supressão pela mutação ou inativação da p53 pode levar a uma superexpressão da Bcl-2 e a uma resposta apoptótica prejudicada. A expressão do proto-oncogene c-myc é também suprimida pela p53 selvagem e quantidades aumentadas de c-myc promovem a progressão do ciclo celular. Portanto, a não supressão do c-myc pela mutação da p53 pode levar a uma sinalização e crescimento celular impróprios, contribuindo assim para a formação do tumor. Genes como o MAP 4 e o stathmin, ambos envolvidos com a polimerização dos microtúbulos, são também suprimidos pela p53 selvagem. A MAP4 parece suprimir a apoptose <sup>(5)</sup>.

Existem quatro evidências que sugerem que a supressão transcricional mediada pela p53 seja importante para a apoptose dependente de p53: (1) as três proteínas conhecidas que inibem a apoptose dependente de p53 (Bcl-2, adenovirus E1B-19K e WT-1) inibem a supressão mediada pela p53, mas não a transativação; (2) algumas formas mutantes de p53 que ocorrem naturalmente e que são incapazes de induzir apoptose são também defeituosas na supressão transcricional, mas mantêm sua habilidade de transativar genes; (3) p53 mutante com falta de domínio rico em prolina é defeituosa em trans-supressão e apoptose, mas é ainda funcional para transativação e (4)

hipóxia pode induzir apoptose em parte por ativar seletivamente a função transsupressora da p53. Em resumo, a supressão transcricional mediada pela p53 representa outra atividade biológica importante, aparte da transativação, pela qual a p53 pode negativamente regular o crescimento celular <sup>(5)</sup>.

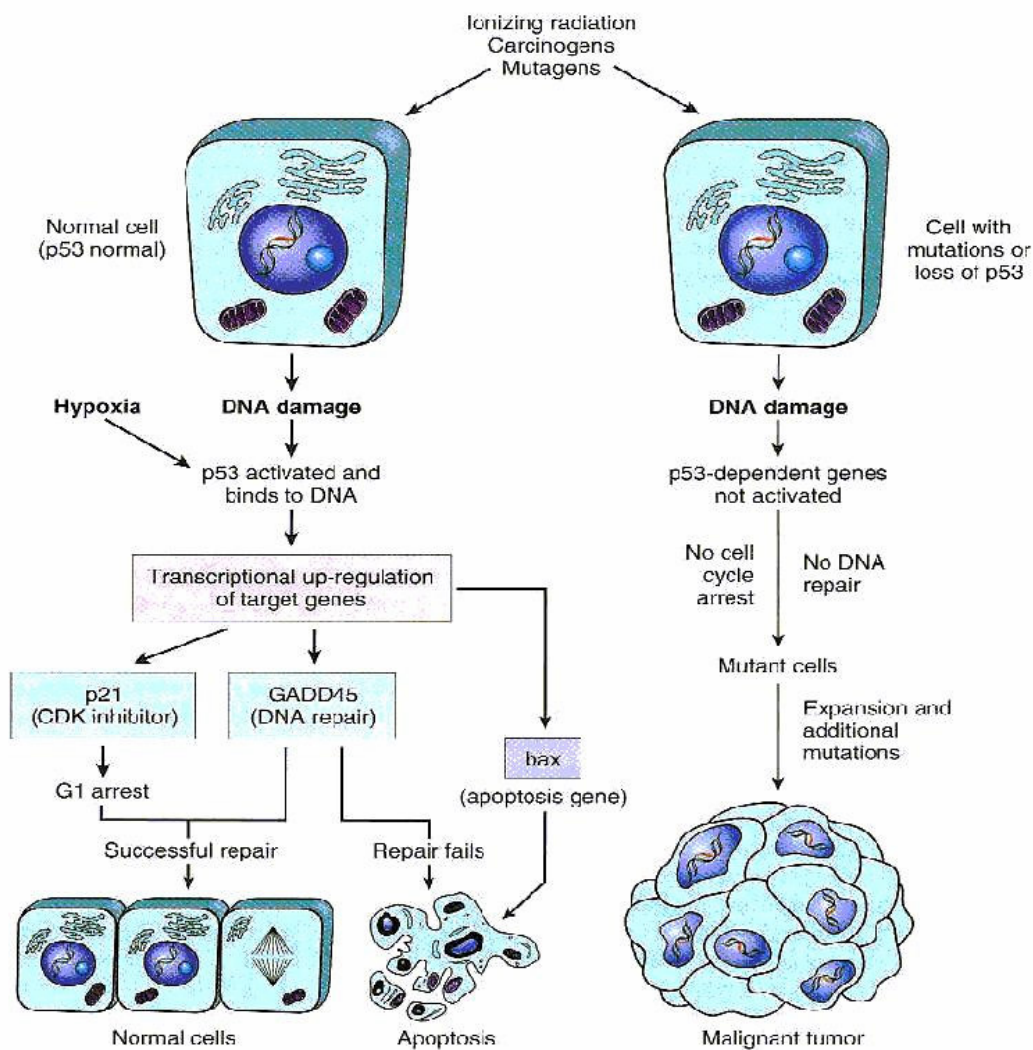


Figura 2: O papel da p53 na manutenção da integridade do genoma: A ativação da p53 selvagem por agentes que lesam o DNA ou por hipóxia leva a célula à parada do ciclo celular em G1 e induz o reparo do DNA, por uma regulação transcricional do inibidor de quinase dependente de ciclina p21 e pelo gene Gadd4545, respectivamente. O reparo do DNA permite a célula continuar o ciclo celular; se não houver o reparo do DNA, a ativação do gene bax pela p53 promove a apoptose. Em células com perda ou mutação da p53, o dano do DNA não induz a parada do ciclo celular e o reparo do DNA, conseqüentemente as células com dano genético proliferam dando origem eventualmente a neoplasias malignas <sup>(14)</sup>.

### 5.5 Regulação da atividade da p53

A proteína p53 é encontrada em baixos níveis e em estado latente em células normais. Várias formas de estresse, como drogas que lesam o DNA, radiação ionizante, radiação ultravioleta, hipóxia ou hiperproliferação, rapidamente induzem ao aumento da proteína p53, com pouco ou nenhum efeito em nível de RNAm. Isso é resultado do aumento da tradução do RNAm p53 e da estabilização da proteína, a qual tem uma relativa pequena meia vida (~10-20 min). Provavelmente, o aumento da meia-vida seja resultado da modificação pós-tradução que altera a interação da p53 com proteínas que a degradam, como a Mdm2. O proto-oncogene Mdm2 é um alvo transcricional e um supressor da função da p53, criando assim uma auto-regulação negativa. A Mdm2 liga-se ao N-terminal da p53 e bloqueia sua interação com a maquinaria transcricional da célula. A Mdm2 ainda medeia a exportação nuclear da p53 e a leva à destruição proteolítica mediada pela ubiquitina <sup>(5)</sup>.

A conversão da p53 da forma latente para a ativa, a qual tem a capacidade de se ligar a seqüências específicas de DNA e de transativação, é pouco entendida. É descrita a ativação alostérica do tetrâmero p53 latente, onde a latência é imposta através da interação entre o C-terminal com o domínio central, assim o tetrâmero fica com uma conformação que não se liga especificamente ao DNA. As modificações pós-tradução

ou a interação de outras proteínas com o tetrâmero p53, que rompem a interação entre esses domínios, podem alostericamente ativar a p53. Alguns fatores têm sido identificados por contribuírem com a ativação da p53, incluindo fosforilação, glicosilação, acetilação, interação entre proteínas, ligação ao DNAss, “splicing” alternativo e “truncation” do C-terminal e do N-terminal <sup>(5)</sup>.

A fosforilação da p53 pode ser um importante mecanismo para a regulação de sua atividade supressora de tumor e um grande número de proteínas quinases fosforilam a p53 in vitro (ATM, ATR, CHK1 e 2). Além disso, tem sido mostrado que a fosforilação da p53 in vivo é regulada pelo dano ao DNA. A fosforilação de resíduos do N-terminal da p53 efetivamente inibe a sua interação com Mdm2, o que contribui para a regulação da estabilidade da p53 in vivo. Da mesma forma, a fosforilação da Mdm2 em resposta ao dano do DNA pode inibir sua ligação a p53. Muitas observações suportam a noção de que a fosforilação de serinas dentro do N-terminal da p53 é funcionalmente importante. A ser20 fica adjacente ao domínio que se associa com a Mdm2 e a fosforilação desse resíduo impede a interação entre a p53 e a Mdm2. A quinase responsável pela modificação da ser20 é provavelmente a CHK2, que age “downstream” a ATM, durante dano do DNA induzido por radiação ionizante. Consistente com esses achados, pacientes com LFS tem sido identificados com p53 selvagem e mutação germinativa com perda de função na CHK2 <sup>(5)</sup>.

Em adição a fosforilação, a acetilação parece influenciar na ativação e na função da p53. Muitas lisinas (K320 e K382) tornam-se seletivamente acetiladas in vivo em resposta ao dano do DNA. É provável que mecanismos regulatórios da p53 se sobreponham e a fosforilação dos resíduos do N-terminal da p53 facilite a acetilação em locais do C-terminal, formando uma cascata de ativação em resposta ao dano do DNA <sup>(5)</sup>.

## 5.6 Mutação da p53

A mutação hereditária do gene TP53 é uma descoberta comum na LFS. Essas mutações são consideradas como um fator predisponente de carcinogênese e, geralmente, ocorrem numa região altamente conservada do TP53 <sup>(3)</sup>.

### 5.6.1 Tipos de mutação

As mutações no TP53 ocorrem por deleção, inserção, “truncation” ou mutação de pares de base do tipo “missense” ou “nonsense” e tumores freqüentemente seguem a perda de heterozigidade, na qual o alelo selvagem é deletado.

Mais de 85% das mutações são substituição de um aminoácido, resultando na produção de uma proteína “missense”. A natureza da mutação parece ser tecido-específica, com carcinomas tendo uma freqüência maior de mutação de pares de base que sarcomas <sup>(5)</sup>. As mutações “missense” resultam em efeitos dominantes negativos, com uma grande redução dos tetrâmeros funcionalmente ativos. Tais mutações são comuns no cólon, cérebro, pulmões, mama, pele, bexiga, entre outros <sup>(2)</sup>. Mais de 90% das mutações da p53 ocorrem na seqüência específica de ligação ao DNA no domínio central e são codificadas pelos éxons 4, 5, 6, 7, 8 e 9 e 50% alteram os códons 175, 248, 249, 273 ou 282 dentro desse domínio (regiões chamadas de “hot spot”) <sup>(5)</sup> (ver fig.3). Em geral, as mutações dentro do domínio central podem ser classificadas naquelas em que os aminoácidos contactam diretamente o DNA (ex: aminoácidos 248 e 273) e naquelas em que há alteração da conformação da p53, assim evitando a sua ligação específica ao DNA (ex: aminoácidos 143 e 175) <sup>(5)</sup>.

Deleção de um ou de ambos os alelos TP53 reduz a expressão dos tetrâmeros, resultando em diminuição da expressão dos genes inibidores do crescimento celular. Esse mecanismo é encontrado em tumores ocasionais de vários tipos. Mutações

“nonsense” e mutações do tipo “splicing” que originam proteínas truncadas, não permitem a oligomerização, portanto também resultam em uma redução de tetrâmeros (mutações desse tipo são mais comuns nos pulmões e esôfago) <sup>(2)</sup>.

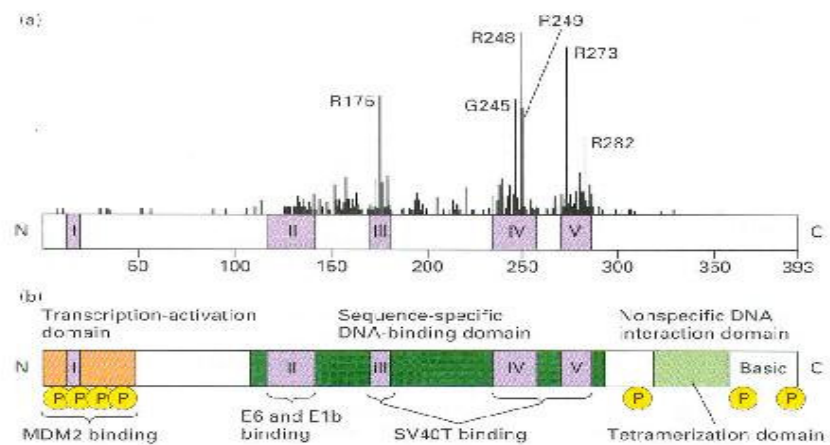


Figura 3: Proteína p53 mostrando as regiões chamadas “hot spot”: códons 175, 248, 249, 273 e 282. <sup>(15)</sup>

### 5.6.2. Efeitos biológicos da mutação

Há três mecanismos pela qual a mutação da p53 contribui para a progressão do tumor: (1) perda da função supressora de tumor da p53 selvagem; (2) inibição dominante negativa da função da p53 selvagem e, possivelmente, dos membros da família da p53 (p73/p63), através da oligomerização com p53 mutante em células heterozigóticas e (3) ganho de função que confere uma vantagem de crescimento seletiva para células que expressam a p53 mutante <sup>(5)</sup>.

A perda da função supressora de tumor da p53 comprometeria seriamente a habilidade da célula em responder ao estresse genotóxico. Os tumores humanos que são nulos para a p53 representam uma verdadeira perda de função e essa alteração é claramente suficiente para promover tumorigênese <sup>(5)</sup> (ver fig. 4 A).

Na maioria dos tumores que se originam da mutação da p53 há uma estabilidade protéica aumentada e a proteína está acumulada em altos níveis. Essas mutações geralmente ocorrem no domínio central, deixando a p53 incapacitada de se ligar a seqüência específica de DNA. No entanto, a forma mutante da p53 que é capaz de oligomerização, pode hetero-oligomerizar com a p53 selvagem e efetivamente bloquear a p53 selvagem de se ligar ao DNA, conseqüentemente inibindo sua função supressora de tumor. Esse comportamento dominante negativo tem sido observado *in vitro* em camundongos transgênicos e em casos humanos com p53 mutante em células germinativas. Por exemplo, camundongos que expressam uma p53 com uma mutação “missense”, em adição ao alelo p53 selvagem, têm uma maior incidência de desenvolver tumor. Sendo assim, tumores humanos que são heterozigotos para p53 selvagem e mutante podem originar-se por um mecanismo dominante negativo. Nesses casos, a expressão de uma p53 mutante dominante negativa poderia resultar em um fenótipo que seria indistinguível daquele visto em células nulas em p53. Alternativamente, tem sido proposto que uma redução na dosagem da p53, através da mutação ou perda de um alelo, poderia promover tumorigênese <sup>(5)</sup> (ver fig. 4B).

A alta freqüência de mutação “missense”, ao contrário da “truncation” e da deleção, distingue a p53 de outros tumores supressores (ex: Rb). De fato, a p53 mutante exibe um ganho de função, não dividida com a p53 selvagem, que promove crescimento celular e tumorigenicidade. Esse ganho de função pode ser demonstrado pelo aumento da freqüência de imortalização e transformação maligna exibida pelas células com p53 mutante. A proteína p53 mutante ativa uma série de promotores celulares e virais que não são regulados pela p53 selvagem. A lista de promotores celulares ativados pela p53 mutante inclui: c-myc, MDR1, EGFR, PCNA, VEGF, 1L-6, BFGF, HSP70 e BAG-1. Nenhum desses genes contém seqüência de consenso de ligação a p53 e se acredita que

a regulação da transcrição desses promotores pela p53 mutante seja mediada através de sua interação com outros fatores. È conhecido que a p53 mutante necessita do domínio ácido N-terminal para o seu ganho de função <sup>(5)</sup> (ver fig. 4C).

Em resumo, muitos modelos têm sido propostos para definir os mecanismos pela qual p53 mutante promove tumorigenicidade. É provável que a ativação transcricional dos genes que afetam a proliferação (EGFR, c-myc), quimioresistência (Mdr1), angiogênese (VEGF) ou sobrevivência da célula (BAG-1) significativamente contribui para a oncogenicidade da p53 mutante. Ainda, a interação proteína-proteína alterada (Mdm2, MBP1 e Topo I) pode ter um papel indireto na promoção de uma instabilidade genômica e tumorigênese <sup>(5)</sup>.



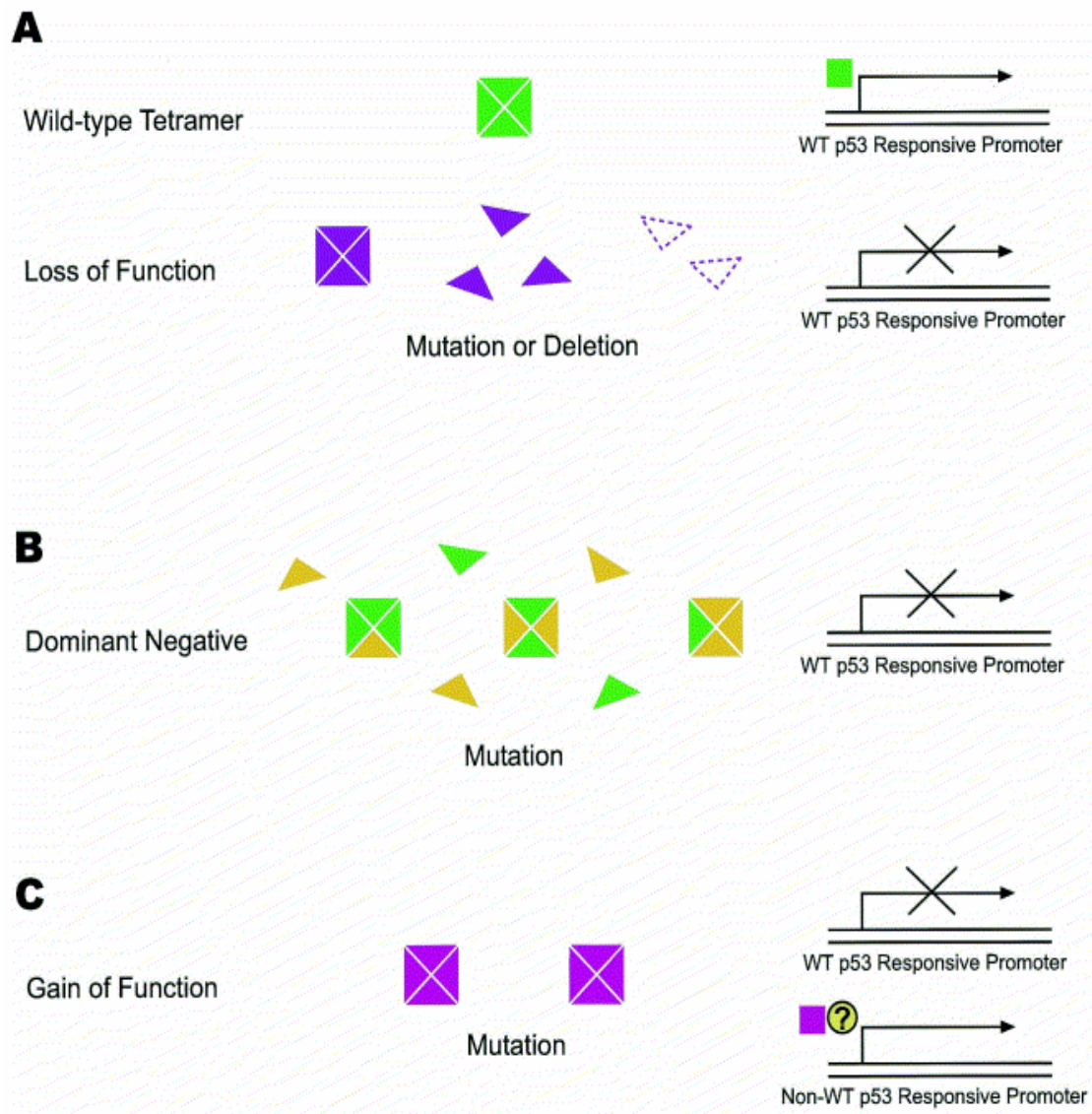


Figura 4: Mecanismos propostos para o papel da p53 mutante na tumorigênese: (A) Perda de função: a p53 selvagem (verde) é transcricionalmente ativada em resposta ao estresse e induz a expressão de genes alvos “downstream”, tal como o  $p21^{cip1}$ . Uma mutação inativadora (violeta) ou deleção da p53 (linha pontilhada em violeta) resulta numa completa perda de função que elimina a resposta da p53 mediada pelo estresse. (B) Transdominante negativo: algumas p53 mutantes (amarelo) oligomerizam-se com a p53 selvagem (verde) e inibem a ativação transcricional de uma maneira transdominante negativa. (C) Ganho de função: outras p53 mutantes (fúcsia) possuem novas funções (ganho de função) não divididas com a p53 selvagem. As p53 mutantes não transativam os genes alvo da p53 selvagem, e sim transativam genes como o MDR1 e c-myc<sup>(5)</sup>.

## 5.7 Outras Mutações

Santibanez e colegas sugerem que a mutação na p53 possa ser o evento primário em algumas, mas não em todas as famílias com LFS <sup>(16)</sup>. A mutação germinativa da p53 tem sido detectada em aproximadamente 70% das famílias afetadas <sup>(5;17)</sup>. A falha na detecção da mutação na outra metade das famílias com LFS sugere que a análise da sequência, a qual é limitada a região codificadora do gene TP53, negligenciou outros eventos genéticos que estão fora da região codificadora ou que alterações em outros genes, que não o TP53, podem também levar a LFS <sup>(18)</sup>.

A mutação da CHK2 é a segunda mutação mais frequentemente relatada na LFS. Bell e colegas identificaram mutação da CHK2 em células germinativas em pacientes com LFS e sugeriram que é uma proteína supressora de tumor <sup>(19)</sup>. A CHK2 é uma proteína quinase que é fosforilada e ativada em resposta as lesões do DNA e está envolvida com a parada do ciclo celular em G1. A parada do ciclo celular é inibida pela p53 mutante, indicando que a CHK2 age upstream a p53. In vitro, a CHK2 fosforilou CDC25C em serina-216, que é um sítio envolvido com a regulação negativa do CDC25C, fosforilou a p53 em serina-20 e dissociou os complexos pré formados da p53 com a Mdm2. In vivo, a expressão ectópica da CHK2 selvagem leva ao aumento da estabilização da p53 depois da lesão do DNA, ao passo que a expressão da CHK2 mutante impede a fosforilação da p53 em serina-20 e a estabilização da p53. Assim em

resposta ao dano do DNA, a CHK2 estabiliza a proteína supressora de tumor p53, levando a célula à parada do ciclo celular <sup>(19,20)</sup>.

A p53 pertence a uma rota e perturbações que ocorram “upstream” ou “downstream” nessa rota podem ter um impacto negativo na supressão de tumor dependente da p53. Um regulador dessa via é o p19<sup>ARF</sup>, que ativa a p53 antagonizando seu regulador negativo Mdm2. Geralmente, há uma correlação inversa entre p53 e p19<sup>ARF</sup>; células tumorais que mantêm o p53 selvagem são freqüentemente alteradas na expressão do 19ARF (deleção ou metilação do gene), enquanto que os tumores que têm defeito no p53 (mutação, deleção, ou superexpressão da Mdm2) tipicamente expressam altos níveis de p19<sup>ARF</sup>. Células com escassez de p19<sup>ARF</sup> e com p53 selvagem são geralmente normais para a ativação funcional do p53 durante o dano do DNA, mas não em resposta a sinais hiperproliferativos induzidos por oncogenes, como o c-myc. Presumivelmente, na falta do p19<sup>ARF</sup>, a atividade do p53 é suprimida pela Mdm2, enquanto a resposta ao dano do DNA parece normal, devido a modificações pós-tradução que interferem com a interação entre p53 e Mdm2. Similarmente a superexpressão de Mdm2, que ocorre em 20% dos sarcomas de tecido mole humano, muitos dos quais mantem o alelo p53 selvagem, inibe a função da p53 escondendo o domínio ácido e levando a p53 a degradação. A interrupção da sinalização “downstream” a p53 pode ocorrer através do silenciamento de fatores pró-apoptóticos, como Apaf-1. Assim a maioria dos tumores, se não todos, são funcionalmente defeituosos na supressão de tumor, ou pela mutação do gene p53 ou pela alteração na via do p53 <sup>(5)</sup>.

Mutações hereditárias dos genes TP53<sup>KIP2</sup>, P15<sup>INK4B</sup> e P16<sup>INK4A</sup>, que afetam o ciclo celular similarmente ao TP53, foram observadas em alguns tipos de cânceres. O TP53 participa da regulação negativa do ciclo celular, estimulando os inibidores das

quinases dependentes de ciclina (CDKs), incluindo TP53<sup>INK2</sup>, P15<sup>INK4B</sup> e P16<sup>INK4A</sup>, que bloqueiam a passagem da célula da fase G1 para S. A perda dessa regulação por mutações ou deleções resulta em proliferação celular<sup>(3)</sup>.

O BCL2 é um gene regulador da apoptose. Mutações têm sido demonstradas em uma profunda variedade de tumores, entretanto, variações germinativas deste gene não ocorreram em mais do que 12% de todos os pacientes com LFS<sup>(4)</sup>.

A mutação do gene supressor de tumor PTEN também pode ser responsável por cânceres humanos observados na LFS. O PTEN codifica uma fosfatase cujo alvo in vivo é o fosfoinositol trifosfato, um segundo mensageiro na via da quinase fosfatidilinositol, participando de rotas que levam a célula a um estímulo apoptótico. Sua mutação está relacionada a perda dessa propriedade e ao surgimento de um fenótipo neoplásico<sup>(17)</sup>.

## 6.0 PADRÃO DE HERANÇA

A grande maioria das mutações implicadas na LFS são mutações do tipo “missense” e apresentam um padrão de herança do tipo dominante negativo. O que ocorre nessa situação é que a simples presença de um alelo mutante interfere completamente na ação do alelo normal. Esse fenômeno é próprio de proteínas de constituição multimérica (proteínas formadas por mais de uma cadeia polipeptídica, como é o caso da proteína p53). A sub-unidade mutante da proteína apresentará um domínio de ligação intacto e funcional, mas sua atividade catalítica estará alterada, afetando o papel de todo o multímero <sup>(14)</sup>.

As conseqüências do alelo mutado, no surgimento de um fenótipo alterado, são devido à estequiometria da molécula p53, que é um tetrâmero.

Na LFS, pode haver mutação “missense” em um dos alelos do gene TP53 que codifica as proteínas que formam o tetrâmero, assim alterando a molécula protéica. Como é esperado 50% dos monômeros serão anormais e os outros 50% serão normais nos indivíduos heterozigotos. Em vista de que o tetrâmero da proteína p53 é formado pela disposição aleatória das diferentes cadeias polipeptídicas, a associação dessas

cadeias (normais ou mutadas) pode produzir 5 moléculas diferentes e na mesma proporção: (I) normal sem cadeias mutadas, (II) alterada com apenas uma cadeia mutada, (III) alterada com duas cadeias mutadas, (IV) alterada com três cadeias mutadas e (V) alterada com todas as cadeias mutadas (ver fig. 4B).

Como a presença de apenas uma cadeia mutada já é o suficiente para a perda de função da proteína p53 e para a formação de um fenótipo alterado, o indivíduo apresentará dentro de seu “pool” proteico 80% de moléculas anormais e 20% de moléculas normais.

A LFS também pode ser originada em uma minoria dos casos por uma deleção do gene TP53 ou por uma mutação “nonsense”. Em ambos os casos, não há síntese do produto proteico pelo alelo mutado, conseqüentemente o indivíduo apresentará apenas 50% da quantidade de proteínas e essas serão normais. Depara-se, portanto, com um defeito quantitativo, ao contrário das mutações “missense” em que o defeito é qualitativo. Nessa situação o indivíduo ainda apresenta o fenótipo normal, uma vez que para desenvolver o câncer é necessário uma mutação somática no alelo remanescente, como é proposto por Knudson na hipótese “de dois eventos”.

Os distúrbios da LFS não vão se manifestar todos no início da vida. Na verdade, alguns se expressam em épocas variáveis, ou só na terceira idade. É fato que, por haver uma mutação da linhagem germinativa, os indivíduos já se apresentam com a mutação ao nascimento, apesar de não demonstrarem nenhum fenótipo neoplásico. Uma explicação para o posterior aparecimento dos cânceres é o efeito acumulativo de diferentes mutações somáticas que vão ocorrendo ao longo da vida até que se atinja um limiar de expressão. Dessa forma, portadores de mutações do gene TP53, mas sem malignidades, são considerados como grupo de risco para o desenvolvimento de neoplasias futuras <sup>(3)</sup>.

## **7.0 DIAGNÓSTICO MOLECULAR**

### **7.1 Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Trata-se de um método de rotina, fácil, rápido e que requer pouca quantidade de DNA do paciente, sendo capaz de detectar 90% das mutações de pares de base <sup>(4)</sup>. Tal método exige apenas algumas células de qualquer fonte acessível e oferece o diagnóstico em poucas horas. Com o PCR, regiões específicas dos genes são amplificadas e isoladas do DNA de um paciente, e então a mutação pode vir a ser detectada. A análise do PCR usa a eletroforese de DNA desnaturado para se identificar “desigualdades” entre a amostra de um paciente e uma cópia normal da seqüência do gene ou seu RNAm. Essas desigualdades podem indicar um sítio em potencial de uma mutação responsável pelo espectro da LFS <sup>(21)</sup>.

### **7.2 Single-Strand Conformation Polymorfism (SSCP)**

Durante os últimos anos, o SSCP comprovou ser um método sensato e efetivo para se detectar mutações do DNA. A seqüência a ser analisada é amplificada pelo PCR e o produto dupla-fita é desnaturado pelo calor. Se o produto é rapidamente resfriado, as fitas simples dobram-se novamente sobre si mesmas numa conformação determinada pela seqüência primária da molécula de DNA. As diferentes conformações são estudadas sobre um gel de poliacrilamida. Em geral, as duas fitas de DNA têm um

diferente padrão de migração e a mutação de ponto é mostrada prontamente. O SSCP parece detectar no mínimo 85% das mudanças de seqüência de curtos segmentos (200-300 bp) de DNA. A sensibilidade poderá ser aumentada pela alteração do sistema de gel, através da adição de glicerol ou do resfriamento do gel durante a eletroforese <sup>(22)</sup>.

### **7.3 Seqüenciamento**

A técnica mais prática e eficiente para se detectar uma mutação é a que usa seqüenciadores automáticos. Uma das estratégias para o seqüenciamento fluorescente automático baseia-se na incorporação de produtos de extensão de DNA de marcadores fluorescentes, usando tanto primers marcados 5' ou dideoxynucleotídeos marcados 3'. O método mais apropriado de marcação depende dos objetivos e das preferências pessoais.

Os seqüenciadores de DNA detectam a fluorescência dos quatros marcadores usados para identificar os nucleotídeos A, C, T e G. Cada marcador emite luz em um diferente comprimento de onda quando executados por um laser. As 4 cores e posteriormente as 4 bases podem ser detectadas e distinguidas por métodos de injeção capilar.



## **8.0 RASTREAMENTO E ACONSELHAMENTO GENÉTICO**

Uma vez que a LFS é uma manifestação rara, que epidemiologicamente não atinge uma população bem definida (como é o caso dos judeus Askenasi, na Doença de Tay Sacks) e pelo fato de que essa síndrome não demonstra manifestações clínicas previsíveis, nem um tratamento específico, os métodos de rastreamento da síndrome ainda não são rotina dentro da genética humana.

A detecção precoce da mutação da linhagem germinativa do TP53, em pacientes com tumor pode ser oferecida tanto para crianças, quanto para adultos, num contexto de suporte psicossocial, para confirmar a LFS em bases moleculares. Isto permitirá, ao menos, oferecer ao paciente uma contínua revisão clínica e, por vezes, diagnosticar futuros cânceres em estágio inicial <sup>(23)</sup>.

Entretanto, o aconselhamento genético é ainda uma das grandes dificuldades dentro da LFS. A diversidade fenotípica é muito intensa, variando de neoplasias de leves implicações clínicas até rabdmiossarcomas infantis e tumores cerebrais, dificultando em muito um planejamento para o futuro e impedindo que se faça suposições sobre o prognóstico. Além disso, herdar uma mutação do TP53 não é garantia de que o câncer se desenvolva, uma vez que este se originará pelo acúmulo de mutações somáticas durante a vida.

Assim, muito mais deve ser conhecido sobre a patogênese da doença para que se possa fazer um aconselhamento efetivo para as famílias com predisposição molecular ao câncer.

## **9.0 TRATAMENTO**

### **9.1 Tratamento suporte e tratamento específico**

Antes de se iniciar um tratamento específico, se possível todos os pacientes devem ter seu diagnóstico de câncer confirmado por histopatologia tecidual. Uma equipe de geneticistas, oncologistas, pediatras e cirurgiões deve estar envolvida, realizando uma série de cuidados que permitam situar o paciente em sua nova condição e adaptar-se física, psicológica e socialmente a ela.

Atualmente, dispõem-se das seguintes alternativas para o tratamento do câncer: cirurgia, radioterapia, quimioterapia, hormonioterapia, imunoterapia e bioterapia. A decisão da melhor conduta terapêutica dependerá do local, do tipo, da extensão, do número e principalmente da condição clínica do paciente. O principal objetivo da terapêutica ainda é oferecer alívio dos sintomas, com uma melhor qualidade de vida.

Entretanto, muitos desafios permanecem para ser resolvidos. Pesquisadores apresentaram dados ligando as mutações específicas do TP53 com um aumento da resistência do tumor à determinados quimioterápicos e também ao aumento das recidivas. Domínios entre os códons 163-195 e 236-256 contêm seqüências do tipo zinc-finger e parecem estar relacionadas a uma pior resposta dos pacientes aos diversos quimioterápicos e a um aumento da taxa de recidiva <sup>(2)</sup>.

## 9.2 Expectativa para o futuro

Tratamentos efetivos e específicos para a LFS ainda não estão descritos, entretanto cientistas têm boas expectativas quanto ao desenvolvimento de novas terapias para o futuro <sup>(24)</sup>.

Um dos mais freqüentes ativadores do TP53, usados em sistemas experimentais, é o anticorpo monoclonal Pab<sup>421</sup>. O anticorpo promove a ativação da seqüência ligadora de DNA da p53 desencadeando sua função. Determinados peptídeos de cadeias curtas também têm a propriedade de ativar a p53 em sistemas experimentais. O mecanismo de ativação desses peptídeos pode ser simplesmente por competir na interação do domínio central ao domínio C-terminal <sup>(5)</sup>.

Ainda, a deleção de determinados aminoácidos do domínio C-terminal da p53 mutante pode abolir o ganho de função e também ativar a p53. Apesar da inibição da p53 mutante poder ser benéfica como terapia do câncer, o objetivo ideal seria não apenas abolir o ganho de função, mas também restaurar a função supressora de tumor. Na verdade, esforços iniciais oferecem provas de que isso pode ser possível e o anticorpo monoclonal Pab<sup>421</sup> tem algum potencial de restituir a função selvagem da p53 mutante <sup>(5)</sup>.

Além disso, peptídeos sintéticos correspondendo ao domínio C-terminal da p53 restituem a atividade da seqüência específica de ligação ao DNA. Esses peptídeos sintéticos são suficientes para restaurar a transativação, supressão de crescimento e funções apoptóticas. Esse mecanismo ocorre porque resíduos no C-terminal da proteína p53 podem ser acetilados resultando em ativação da p53 selvagem. A determinação do mecanismo de ativação da p53 através da regulação do C-terminal é de grande importância pelo desenvolvimento de terapêuticas baseadas na p53, que objetivam restaurar a função da p53 selvagem e/ou inibir o ganho de função da p53 mutante <sup>(5)</sup>.

### 9.3 Terapia gênica

Terapia gênica é a modificação das células dos pacientes afim de combater uma doença. Entre as diferentes estratégias de terapia gênica está a utilizada por Roth e colaboradores. Eles investigaram os efeitos da injeção em tumores (carcinoma de não-pequenas células) do gene TP53 usando para isso um agente retroviral. Após a injeção, a regressão tumoral ocorreu em 3 pacientes e o crescimento tumoral foi estabilizado em outros três <sup>(2)</sup>. Chen e colaboradores estudaram o efeito de produzir cópias simples de p53 selvagem exógena e injetou em tumores, obtendo supressão do fenótipo neoplásico <sup>(2)</sup>.

Entretanto, a terapia gênica da linhagem germinativa em humanos ainda não tem sido utilizada por conceitos éticos e pela limitação da tecnologia para manipulação das células de linhagem germinativa <sup>(25)</sup>.

## 10.0 CONCLUSÃO

TP53 é o gene mais comumente mutado dentro dos cânceres humanos, sendo que as conseqüências de suas alterações são profundas. Evidências sugerem que a proteína p53 exerce uma regulação na progressão do ciclo celular, assim como no mecanismo de morte celular programada, em resposta à lesão do DNA <sup>(24)</sup>.

A mutação germinativa do gene TP53 deve ser procurada em todos os tipos de cânceres que mostram alguma forma de apresentação familiar, em casos de tumores multifocais e em casos de neoplasias malignas secundárias. Este é o principal interesse da comunidade médica, tanto clínica quanto científica.

Pouco a pouco, vão se conhecendo os mecanismos do TP53 na gênese do câncer e com isto novas estratégias terapêuticas ganharão campo e poderão ser aplicadas no tratamento de muitas neoplasias malignas. Na verdade, o estudo de novas famílias ajudará a melhor entender os mecanismos moleculares envolvidos na LFS e permitirá identificação dos membros portadores de câncer e oferecer a eles medidas preventivas <sup>(26;27)</sup>.

## 11.0 BIBLIOGRAFIA

- 1) Burt EC, McGown G, Thorncroft M, James LA, Birch JM, Varley JM. Exclusion of the genes CDKN2 and PTEN as causative gene defects in Li-Fraumeni syndrome. *Br J Cancer* 80(1-2):9-10, Apr 1999.
- 2) Mckurick VA. *Mendelian Inheritance in Man. A Catalog of Human Genes and Genetic Disorders*, 11<sup>th</sup> ed. Baltimore and London, The Johns Hopkins University Press, 1994.
- 3) Güran E, Tuncab Y, Mirzaliolub NI. Hereditary TP53 Codon 292 and Somatic P16INK4A Codon 94 Mutations in a Li-Fraumeni Syndrome Family. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 113:145-151, Sep1999.
- 4) Stonea JG, Eelesa RA, Sodhaa N, Murdayb V, Sheridenc E, Houlston RS. Analysis of the Li-Fraumeni syndrome and the Li-Fraumeni-like families for germline mutations in Bcl10. *Cancer Letters* 147:181-85, Dec1999.
- 5) Cadwell C, Zambetti GP. The effects of wild-type p53 tumor suppressor activity and mutant p53 gain-of-function on cell growth. *Gene* 277:15-35, 2001.
- 6) Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie, et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. *Bull Cancer* 88(6):581-7, 2001.
- 7) Frebourg T. Li-Fraumeni. *Bull Cancer* 84(7):735-40, 1997.
- 8) DeVita VT, Hellman S, Rosenberg AS (eds). *Principles & Practice of Oncology*, 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia and New York, Lippincott-Raven, 1997.
- 9) Malkin D. p53 and Li-Fraumeni syndrome. *Cancer Genet Cytogenet* 66(2):83-92, 1993.

- 10) Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonent D, et al.. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 38:43-47, 2001.
- 11) Frebourg T, Fraumeni J, Yan Y, et al.. Germ-line p53 mutation in 15 families with Li-Fraumeni syndrome. *Am. J Hum Genet.* 56:608-615, 1995.
- 12) Hisada M, Garber JE, Fung CY, Fraumeni JF. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J. Nat. Cancer Inst.* 90:606-611, 1998.
- 13) Rozemuller EH, Kropveld A, Kreyveld E, et al. Sensitive detection of p53 mutation: analysis by direct sequencing and multisequence analyses. *Cancer Detect. Prev.* 25(2):109-16, 2001.
- 14) Cotran RS, Kumar V, Collins T(eds). *Robbins Pathologic Basis of Disease*, 6<sup>th</sup> edition. Philadelphia, W. B. Saunders, 1999.
- 15) Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J (eds). *Molecular Cell Biology*, 4<sup>th</sup> edition. New York, Freeman, 1999.
- 16) Santibanez-Koref MF, Birch JM, Hartley AL, et al.. p53 germline mutations in Li-Fraumeni syndrome. *Lancet* 338(8781):1490-1, Dec 1991.
- 17) Brown LTR, Sexmitha L, Malkin D. Identification of a novel PTEN intronic deletion in Li-Fraumeni and its effect on RNA processing. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 123:65-68, Nov 2000.
- 18) Stonzemberg MC, Brugieres L, Gardes M, et al.. Germ-line exclusion of a single p53 allele by premature termination of translation in a Li-Fraumeni syndrome family. *Oncogene* 9(10):2799-804, Oct 1994.
- 19) Tsunematsu Y. Li-Fraumeni syndrome. *Nippon Rinsho* 58(7):1442-7, Jul 2000.
- 20) Bell DW, Varley JM. Heterozygous Germ Line CHK2 Mutations in Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Genetics and Cytogenetics* 91:115, Oct 1996.



- 21) Thompson MW, McInnes RR, Willard HF (eds). Thompson & Thompson: Genética Médica, 5<sup>th</sup> ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 1993.
- 22) Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE (eds). Emery And Rimoin's Principles And Practice of Medical Genetics, 3<sup>th</sup> ed. New York, Churchill Livingstone, 1997.
- 23) Frebourg T, Abel A, Bonaiti-Pellie C et al. Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management. Bull Cancer 88(6):581-7, Jun 2001.
- 24) Fisher DE. The p53 tumor-suppressor: critical regulator of life & death in cancer. Apoptosis 6(1-2):7-15, Feb-Apr 2001.
- 25) Strachan T, Read AP (eds). Human Molecular Genetics. New York, BIOS Scientific Publishers Limited, 1996.
- 26) Leblanc T, Soussi. Li Fraumeni Syndrome and germ-line mutations of the p53 gene. Arch Pediatr 1(1):61-70, Jan 1994.
- 27) Malkin D, Jolly KW, Barbier N et al. Germine mutations of the p53 tumor-suppressor gene in children and young adults with second malignant neoplasms. N Engl J Med 326:1309-1315, May 1992.