



**Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO
Universidade Federal do Espírito Santo – UFES
Programa de Pós Graduação em Biotecnologia**

Érika Aparecida Silva de Freitas Sartore

**IDENTIFICAÇÃO DAS SÍNDROMES HEREDITÁRIAS DE
CÂNCER NO CAPARAÓ CAPIXABA**

Orientadora: Adriana Madeira Álvares da Silva, D.Sc.

Vitória – ES

2019

ÉRIKA APARECIDA SILVA DE FREITAS SARTORE

**IDENTIFICAÇÃO DAS SÍNDROMES HEREDITÁRIAS DE CÂNCER
NO CAPARAÓ CAPIXABA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Orientadora Profa. Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva

Vitória – ES

2019

TERMO DE APROVAÇÃO

ÉRIKA APARECIDA SILVA DE FREITAS SARTORE

IDENTIFICAÇÃO DAS SÍNDROMES HEREDITÁRIAS DE CÂNCER NO CAPARAÓ CAPIXABA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) do Ponto Focal Espírito Santo da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Apresentada em 16 de setembro de 2019

BANCA EXAMINADORA

Professora Adriana Madeira Álvares da Silva

Universidade Federal do Espírito Santo

(Orientadora)

Prof. Dr. Marco Cesar Cunegundes Guimarães

Universidade Federal do Espírito Santo

(Examinador Interno)

Profa. Dra. Flávia Errera

Universidade Federal do Espírito Santo

(Examinador Interno)

Prof Dr. Marcelo dos Santos

Universidade Federal do Rio Grande do Norte

(Examinador Externo)

Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes

Faculdade de Odontologia da USP

(Examinador Externo)

Prof. Dr. Leonardo Oliveira Trivilin

Universidade Federal do Espírito Santo

(Suplente)

Prof. Dr. Teodiano Freire Bastos Filho

Universidade Federal do Espírito Santo

(Suplente)

AGRADECIMENTOS

Desafio tão grande quanto escrever essa tese foi, o de utilizar somente duas páginas para escrever o quanto eu sou grata a todas as pessoas que fizeram parte desta minha trajetória nestes 4 anos de doutorado. Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para seguir sempre em frente.

Gratidão a minha orientadora e amiga Professora Dra. Adriana Madeira Álvares da Silva por todos estes anos de confiança e por acreditar em mim quando nem eu mesma acreditava, por compartilhar inúmeros valores que vão muito além do conhecimento acadêmico, pela disponibilidade, carinho, paciência, pelas experiências, lições de vida, compreensão e amizade, por sua ética e apoio em todos os momentos.

Desejo igualmente agradecer a todos os meus companheiros e amigos de laboratório, CRR, do campo e da vida... Minha eterna gratidão. Vou citar em ordem alfabética para não faltar ninguém; Anderson, Aline, Arícia, Bruno, Carlos César, Caio, Cíntia, Ester, Flavia Vitorino, Gabriela, Gabriely Assis, Ivana, Joaquim, Júlia, Juliana Kruger, Leonardo Trivilin, Lucas, Mayara, Tamires, Wagner, Vitor, enfim, todos vocês cujo carinho, apoio, amizade, estiveram presentes em todos os momentos felizes, difíceis, quando a falta de animo falou mais alto. "Vocês são merecedores de cada órgão que penhorei na luta para terminar minha tese". Mas no final das contas, um pedacinho do meu coração cheio de gratidão vai a todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado.

Aos meus filhos Hugo e Letícia minha razão de lutar e tentar ser para eles um espelho em força e garra.

A minha irmã Cristina, pela amizade, carinho e companheirismo de sempre; por estar sempre torcendo pelas minhas conquistas. Pelo apoio e incentivo incondicional. Obrigado!

Aos meus pais que a seu modo torceram por mim e me ajudaram como puderam.

Já dizia Chico Xavier "Deus nos concede, a cada dia, uma página de vida nova no livro do tempo. Aquilo que colocarmos nela, corre por nossa conta". Sei que escrevi a cada dia de convivência lindas histórias que vou contar para sempre.

Agradeço também à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo pelo apoio concedido.

Não poderia também deixar de mencionar minha gratidão ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela formação humana, profissional e pessoal que me foi concedida através de todos os docentes e pela atenção e carinho de nossa secretária Miriam, sempre tão solícita e gentil, além do contato amigo dos alunos.

Gratidão também ao Professor Dr. José Cláudio Casali da Rocha pelos ensinamentos e por nos atender a todo o momento e estando em qualquer lugar.

Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer agradecer e principalmente viver...

Dalai Lama

RESUMO

As síndromes hereditárias de câncer não são comumente detectadas na prática clínica, mesmo nas mais frequentes como a de mama e ovário hereditário e as síndromes intestinais. Nas síndromes hereditárias de câncer com múltiplos tumores como em Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like (LFS/LFL) identificação é ainda mais difícil e os pacientes são tratados como casos esporádicos de câncer. Existem 4 critérios estabelecidos para a identificação clínica das famílias, mas é importante a elaboração de critérios para a realização de triagens em nível populacional. Assim, a proposta do trabalho foi o desenvolvimento de um método de triagem simples para aplicação populacional com foco na LFS/LFL. O método de triagem propõe a seleção das famílias a partir de prontuários e aplicação de critérios para várias síndromes hereditárias de câncer e os critérios de Li e Fraumeni, Chompret, Eeles e Birch para LFS/LFL. Foram identificadas 66 famílias com câncer hereditário, sendo 34 SLFS/LFL. O método de triagem somado aos critérios de Birch foram os mais eficientes no reconhecimento das famílias em nível populacional em comparação com os outros critérios. Foi observada uma prevalência populacional de 103:100.000, maior que o esperado para a população brasileira. Esses dados sugerem um possível efeito fundador na região e evidenciam a importância da realização de treinamentos no reconhecimento da doença e da importância da criação de métodos para a realização de investigações populacionais realizadas fora do âmbito oncológico desde a atenção básica.

Palavras chaves: Câncer Familiar; Síndrome Hereditária de Câncer; Síndrome de Li-Fraumeni; Triagem Oncogenética.

Abstract

Hereditary cancer syndromes are not commonly detected in clinical practice, even in the most common ones such as hereditary breast and ovarian cancer and intestinal syndromes. In hereditary cancer syndromes with multiple tumors as in Li-Fraumeni / Li-Fraumeni-Like (LFS/LFL) identification is even more complex and patients are treated as sporadic cancer cases. There are 4 established criteria for the clinical identification of families, but it is important to develop criteria for population-level screening. Thus, the purpose of this work was the development of a simple screening method for population application focusing on the LFS/LFL. The screening method proposes the selection of families from medical records and application of criteria for LFS/LFL such as Li and Fraumeni, Chompret, Eles and Birch. We identified 66 families with hereditary cancer, 34 with LFS/LFL. The screening method plus Birch criteria were the most efficient in recognizing affected families at the population level compared to the other criteria. Besides, a population prevalence of 103: 100,000 was observed, higher than expected for the Brazilian population. These data suggest a possible founding effect in evaluated region and highlight the importance of conducting training in recognition of disease and the importance of creating methods for conducting population investigations carried out outside the oncological scope since primary care.

Keywords: Familial Cancer; Hereditary Cancer Syndrome; Li-Fraumeni Syndrome; Oncogenetic Screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação dos éxons (cilindros) 1 a 11 do gene <i>TP53</i> e Representação da proteína p53 e seus domínios	23
Figura 2 - Mapa da região do Caparaó Capixaba	32
Figura 3 - Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil de amplificação do DNA em indivíduos do estudo (19 a 22.).....	36
Figura 4 - Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil dos fragmentos produzidos por digestão com a enzima de restrição <i>Hha I</i> que reconhece a mutação específica R337H	36
Figura 5 - Método de triagem populacional para câncer hereditário e identificação da síndrome de LF, LFL	38
Figura 6 - Distribuição dos pacientes com câncer nos 11 municípios do Caparaó Capixaba	39
Figura 7 - A análise das médias de idade a cada geração	43
Figura 8 - Heredograma do paciente 1A.....	44
Figura 9 - Heredograma do paciente 2A.....	45
Figura 10 - Heredograma do paciente 5A.....	46
Figura 11 - Heredograma do paciente 6A.....	47
Figura 12 - Heredograma do paciente 7A.....	48
Figura 13 - Heredograma do paciente 9A.....	49
Figura 14 - Heredograma do paciente 11A.....	50
Figura 15 - Heredograma da família 12 A.....	51
Figura 16 - Heredograma da 13 A.....	52
Figura 17 - Heredograma da família 14 A.....	53
Figura 18 - Heredograma da família 15 A.....	54
Figura 19 - Heredograma da família 17A.....	55
Figura 20 - Heredograma da família 18.....	56
Figura 21 - Heredograma da família 19 A.....	57

Figura 22 - Heredograma da família 25 A.....	58
Figura 23 - Heredograma da família 26 A.....	59
Figura 24 - Heredograma da família 27 A.....	60
Figura 25 - Heredograma 29 A.....	61
Figura 26 - Heredograma da família 30 A.....	62
Figura 27 - Heredograma da família 33 A.....	63
Figura 28 - Heredograma da família 1B	68
Figura 29 - Heredograma da família 6B	65
Figura 30 - Heredograma da família 11B	66
Figura 31 - Heredograma da família 13B	67
Figura 32: Heredograma da família 14B	68
Figura 33 - Heredograma da família 16B	69
Figura 34 - Heredograma da família 17B	70
Figura 35 - Heredograma da família 18B	71
Figura 36 - Heredograma da família 22B	72
Figura 37 - Heredograma da família 23B	73
Figura 38 - Heredograma da família 26B	74
Figura 39 - Heredograma da família 32B	75
Figura 40 - Heredograma da família 33B.....	76
Figura 41 - Heredograma da família 37B	77
Figura 42 - Heredograma da família 38B	78
Figura 43 - Heredograma da família 39B	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas para câncer Hereditário.....	17
Tabela 2 - Ações preventivas propostas de acordo com o protocolo de rastreamento estabelecido pelo NCCN (BICH et al., 1994).....	26
Tabela 3: Distribuição populacional no Caparaó Capixaba - IBGE 2010.....	31
Quadro 1: Detalhamento dos 4 critérios utilizados para síndrome de Li-Fraumeni	33
Tabela 4: Par de <i>primers</i> utilizado na amplificação na reação de PCR.....	35
Tabela 5: Perfil dos probandos e familiares avaliados da região do Caparaó Capixaba com diagnóstico clínico de câncer hereditário.....	41
Tabela 6: Distribuição dos tipos tumorais/localizações anatômicas, por idade, entre os pacientes triados.....	40
Tabela 7: Tabela de classificação das famílias segundo os critérios de Li e Fraumeni, Birch, Eeles e Chompret (LI et al. ,1988, BIRCH et al. ,1994, EELES 1995, CHOMPRET et al.,2001). A Tabela mostra a sobreposição de famílias nos critérios de classificação	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SLF: Síndrome de Li- Fraumeni

LFL: Li- Fraumini Like

OMS: Organização Mundial de Saúde

RB: Retinoblastoma

INCA: Instituto Nacional do Câncer

RCV: Risco Cumulativo Vital

HNPCC: Câncer colorretal hereditário sem polipose

SL: Síndrome de Lynch

MMR: Mismatch Repair System

FAP: Polipose Adenomatosa Familiar

SNC: Sistema Nervoso Central

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

PEDEAG: Plano Estratégico de Desenvolvimento da Agricultura Capixaba

UBS: Unidade Básica de Saúde

PSF: Posto de Saúde da Família

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 Aspectos gerais e fatores de risco do câncer	13
1.2 Mecanismos da tumorigênese	15
1.3 Câncer Hereditário: Conceito e Epidemiologia	16
1.4 Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer	18
1.4.1 Câncer de Mama e Ovário Hereditários	18
1.4.2 Síndrome de Cowden	19
1.4.3 Síndrome de Lynch.....	19
1.4.4 Polipose Adenomatosa Familiar	20
1.4.5 Câncer Gástrico Difuso Hereditário.....	20
1.4.6 Síndrome de Li-Fraumeni - gene <i>TP53</i>	22
1.4.7 Mutação R337H – SLF	26
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral.....	28
2.2 Objetivos Específicos	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	29
3.1 Casuística e Aspectos Éticos	29
3.2 Caracterização regional	29
3.3 Seleção de Pacientes	31
3.4 Elaboração dos Heredogramas.....	34
3.5 Coleta de Sangue e Extração do DNA	34
3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	35
3.7 Gel de Identificação	36
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Casos de câncer familiar no Caparaó Capixaba.....	39
4.1.1 Triagem oncogenética	39
4.2 Heredogramas	43
4.3 Resultados da avaliação da mutação R337H.....	80
5.4 Resultado da avaliação molecular.....	80
6. DISCUSSÃO	81
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	87
10. APÊNDICES E ANEXOS	115

1. INTRODUÇÃO

O câncer pode ser definido como crescimento desordenado de células que sofrem algum tipo de alteração em seu DNA, tornando-se malignas. A doença pode ser identificada de acordo com o tipo de célula de onde se originou e tem ainda como característica a capacidade de colonizar outros tecidos saudáveis causando metástase (SIEGEL et al., 2019).

Segundo a *American Cancer Society* - ACS, o câncer de mama é o tipo mais comum de tumor maligno no mundo sendo ainda, considerado uma das principais causas de morte prematura em mulheres (SIEGEL et al., 2017).

No Brasil, assim como em todo o mundo, a ocorrência de diferentes tipos de câncer é crescente, a ciência relaciona tal evento muitas vezes à longevidade, aos novos hábitos de vida da população juntamente a modelos de consumo alimentar e ainda a fatores da própria genética, associados ou não a urbanização acelerada e a fatores de risco para a doença (PARSA, 2012).

Fatores de risco podem ser encontrados no espaço físico, na genética ou ainda nos hábitos e costumes próprios de uma determinada cultura ou sociedade (FERRER; GREEN; BARRETT, 2015).

São fatores de risco adotados para o câncer, o tabagismo, alimentação, peso corporal, sedentarismo, hábitos sexuais, fatores ocupacionais, bebidas alcoólicas, exposição solar, radiações, uso de medicamentos e histórico familiar (COLDITZ et al., 2012; FERRER; GREEN; BARRETT, 2015).

A base para a malignidade dos tumores pode ser de originada a partir de mutações, que podem ser herdadas e desta forma estarem presentes nas linhagens germinativas, ou através de mutações que podem ser adquiridas devido à exposição aos diferentes fatores de risco durante a vida. Assim as mutações germinativas estão presentes em todas as células de um indivíduo, ao passo que mutações somáticas se localizam em certo número de células em um tecido específico (MILHOLLAND et al., 2017).

Em sua maioria os diferentes tipos de câncer em humanos não apresentam uma uniformização hereditária determinada. Diferentes estudos mostram que pelo menos

10% a 15% se desenvolvem por uma predisposição genética herdada, o que determina que células de indivíduos com tal predisposição apresentem uma mutação germinativa pré-existente que demanda poucas ocorrências para o aparecimento da carcinogênese (KENNEDY; SHIMAMURA, 2019).

Na espécie humana algumas neoplasias agrupam-se de forma visível em grupos familiares onde a herança biológica é visível, a exemplo dos cânceres de mama e o colorretal, tornando essenciais estudos genéticos para deliberação dos riscos, de forma a orientar melhor o grupo familiar quanto a abordagem terapêutica e o aconselhamento genético (VAINCHENKER; KRALOVICS, 2017).

As síndromes de câncer hereditário são alterações genéticas, nas quais neoplasias malignas tornam-se mais incidentes em indivíduos de uma mesma família. Elas ocorrem por transmissão vertical por meio de um padrão de herança mendeliano em geral do tipo autossômico dominante, ou seja, 50% de risco de transmissão para a prole em cada gestação, independentemente do sexo. Os genes associados às síndromes de câncer hereditário tendem a pertencer mais frequentemente ou ao grupo dos genes supressores de tumor, ou ao grupo de genes reparadores de erros no DNA. Mais raramente, as síndromes estão relacionadas ainda à modificações em oncogenes quando inadequadamente ativados (ALVARENGA et al., 2003).

A Síndrome de Li-Fraumeni é uma destas síndromes de predisposição ao câncer hereditário causada, pela mutação do gene *TP53*. Pacientes portadores desta mutação em geral apresentam um alto risco cumulativo de desenvolver múltiplas neoplasias malignas e ter uma história familiar de tumores de início precoce.

Na LFS, as mutações do gene *TP53* causam a perda da função da proteína p53, levando a eventos a posteriores que permitem o desenvolvimento de vários tipos diferentes de tumores (CORREA, 2016).

Sendo assim, o presente estudo foi realizado com a finalidade de delinear os casos de câncer hereditários na região do Caparaó Capixaba através de um critério pré-estabelecidos de triagem e identificação das principais síndromes hereditárias nas famílias acometidas.

1- REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Aspectos gerais e fatores de risco do câncer

O câncer é um grupo de doenças com um grande impacto na sociedade, sendo a principal causa de morte na maioria dos países. Em todo o mundo, o câncer representa uma a cada sete mortes. Estima-se que em 2019, mais de 14 milhões de pessoas serão diagnosticadas com câncer e aproximadamente 9,6 milhões morreram em consequência da doença (OMS, 2018).

Cerca de aproximadamente 75% dos tipos de câncer que ocorre nas populações ocidentais podem ter suas causas no modo de vida, a exemplo da alimentação, o excesso de peso e a exposição ao tabaco, álcool e outras drogas (BAGNARDI et al., 2015).

No Brasil, o envelhecimento projetado e aumento do tamanho da população propaga um aumento no número absoluto casos de câncer, associando os mesmo a uma exposição contínua a carcinógenos ambientais ou do próprio organismo gerando efeito cumulativo com ação em tecidos mais suscetíveis levando a alterações e formação de neoplasias (IKEHATA; ONO, 2011).

Ainda no Brasil pode ser observado o aumento considerável na incidência de tumores associados ao nível socioeconômico mais alto, tais como mama, próstata, cólon e reto e ao mesmo tempo, taxas de incidência relativamente altas de tumores associados à pobreza tais como, colo do útero, pênis, estômago e cavidade oral. Estes dados evidenciam que a exposição a diferentes fatores de risco ambientais decorrentes aos processos de industrialização, produção agrícola e ocupação tais como, agentes químicos, físicos, biológicos e também por variantes genéticas de alta e de baixa penetrância podem ser os grandes influenciadores deste aumento (OMS, 2018).

Estudos recentes mostram também a influência do status socioeconômico médio a alto, nos hábitos de vida, como o tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas e uma alimentação rica em proteína animal, que promovem uma ação pontual e sistemática na mucosa colorretal pela produção de carcinógenos e atuação no desenvolvimento do

câncer colorretal. Com relação ao câncer de mama, demonstram que particularidades do modo de vida, como o sedentarismo e a obesidade, aparecem como potenciais fatores de risco para o desenvolvimento desta neoplasia (MATAFOME et al., 2013).

A importância dos fatores ambientais para o câncer humano teve seu reconhecimento na década de 60, com base em estudos geográficos, migratórios e ocupacionais. O câncer ambiental pode ser definido como aquele em que o meio ambiente tem colaboração direta ou indireta na sua formação. No meio ambiente são encontradas grande variedade de agentes carcinogênicos humanos. Modificações do ambiente por alteração, seja nos hábitos individuais, seja nas práticas industriais têm contribuído para um aumento gradativo da mortalidade por câncer em todo o mundo (RÊGO, 2014).

No câncer, mais importante que as aplicações terapêuticas são os esforços de diagnóstico e prevenção. Segundo estimativas, mais de 60 mil produtos químicos naturais e sintéticos são usados na vida diária e mil novas substâncias químicas são lançadas no mercado a cada ano. Além disso, entre mais de 100 mil produtos químicos com toxicidade potencial, apenas cerca de 6 mil foram testados para verificação da carcinogênese em laboratório na maioria produtos utilizados na Agricultura conhecidos como agrotóxicos (ROSSI, 2015).

Além da exposição ambiental, a idade e o histórico familiar também representam fatores de risco significativos para o desenvolvimento de câncer, em especial quando se trata do câncer de caráter hereditário. No caso do câncer colorretal, por exemplo, diferentes familiares de primeiro grau, com idade inferior a 50 anos pode representar um aumento de risco relativo aproximadamente 1,7%, variando de 1,34% a 2,19% quando confrontados com famílias sem histórico da doença (HANSFORD et al., 2015).

A maioria dos tipos de câncer em humanos não exhibe padrão hereditário definido, contudo, pelo menos 10% a 15% se desenvolve por uma predisposição genética herdada, indicando que tais indivíduos possuam uma mutação germinativa pré-existente que demanda poucos eventos imediatos para o aparecimento da neoplasia (KENNEDY; SHIMAMURA, 2019).

Nos tumores esporádicos fica claro que o reconhecimento dos fatores de risco pode levar ao desenvolvimento de ações de prevenção e tratamento. Já em tumores hereditários, essa analogia é menos clara, porém é sabido hoje que alguns fatores de

risco são importantes como moduladoras da penetrância dos genes de predisposição, em especial a relação com a idade de acometimento do tumor (GARNIS; BUYS; LAM, 2004).

Desta forma, as famílias expostas a riscos devem ser orientadas quanto à detecção do fator hereditário e também na redução de fatores de risco ambientais, em especial a obesidade, ao risco do uso de álcool e tabaco, exposição a radiações, com incentivo à alimentação e nutrição saudável, prática de atividades físicas e atividades que levem ao equilíbrio mental (DANTAS et al., 2009; IKEHATA; ONO, 2011).

Embora os fatores de risco para câncer de origem ambiental e hereditário sejam diferentes, do ponto de vista molecular as alterações de uma célula saudável em tumoral incluem mecanismos de perda de controle do ciclo celular, reparo e outros que são comuns tanto nos tumores esporádicos quanto nos tumores hereditários (PARSA, 2012).

1.2 Mecanismos da tumorigênese

O nosso organismo é composto por um conjunto de células que possuem uma rede molecular coordenada com capacidade de controlar a sua diferenciação, proliferação, produção de metabólitos e apoptose celular, de forma a manter a homeostase e o controle de todo o nosso organismo.

A tumorigênese é fruto do descontrole da homeostase celular e o ganho de malignidade da célula. Ocorre através de mutações genéticas e/ou epigenéticas nas principais classes de oncogenes e supressores de tumor que levam à proliferação exagerada, geralmente acompanhada de uma instabilidade genética ao qual capacita as células a ativarem mecanismos de evasão da apoptose e da detecção pelo sistema imune, o que culmina na obtenção de capacidade celular nos mecanismos de invasão de tecidos e órgãos vizinhos (SHORT; WILLIAMS, 2017).

Mutações ocorridas no genoma celular podem levar ao desenvolvimento do câncer por mutações pontuais ao qual existe a troca de aminoácidos e mutações tipo *frame-shift* ou em “*stop*” códons, responsáveis pela formação de proteínas truncadas ou desorganizadas na sua sequência (BASU, 2018).

Diversas mutações somáticas e germinativas em genes supressores de tumor levam ao surgimento e progressão do câncer, isso é visto, por exemplo, em mutações no gene *TP53*, ao qual leva à produção de uma proteína incapaz de checar e reparar problemas durante o processo de divisão celular, favorecendo a carcinogênese e progressão tumoral (BASU, 2018).

Alterações epigenéticas são caracterizadas pelo processo de modificação do epigenoma, seja ele por metilação do DNA, acetilação de histonas, dentre outros processos. No entanto, a maioria dos processos de regulação biológica é feito pela metilação do DNA, por ter caráter estável e ser somaticamente hereditária. A metilação consiste na adição ou remoção do grupo metil no carbono 5 de citosinas localizada dentro de uma ilha CpG.

Primeiro estudo divulgado demonstrando uma ligação entre metilação do DNA e câncer foi feito em 1983, nesse estudo, os pesquisadores Feinberg e Vogelstein viram uma hipometilação de algumas regiões do DNA de células tumorais em comparação com células normais, demonstrando que essas regiões contribuíam para progressão de metástase de alguns pacientes. Outro estudo realizado em 1989 por Greger e colaboradores, com o gene supressor de tumor RB (retinoblastoma), revelaram uma hipermetilação da região gênica do DNA consequente inativação do RB. Desta forma deu-se um start pela procura de correlacionar o surgimento e progressão do câncer com eventos epigenéticos (OLIVEIRA et al., 2010).

1.3 Câncer Hereditário: Conceito e Epidemiologia

A predisposição hereditária ao câncer pode ser definida como uma grande probabilidade de desenvolvimento de tumor fundamentada na presença de mutações ou alterações germinativas que predisõem os portadores a um risco maior de câncer em detrimento dos demais indivíduos da população. Estudos recentes mostram que mutações germinativas em genes de reparo e genes supressores de tumor são as principais causas de tumores hereditários (SUNG et al., 2017).

Pesquisadores ponderam que entre 10 a 15% dos tumores sejam de caráter hereditário (LYNCH; SNYDER, 2012; SMITH, 2012; FOULKES; SHUEN, 2013).

Em geral, famílias com câncer hereditário apresentam características específicas de manifestação de tumores. De acordo com Rossi (2010), os fatores mais expressivos e que podem levar a suspeita da presença de uma síndrome de predisposição hereditária de câncer são a idade jovem do diagnóstico, múltiplos tumores, tumores bilaterais, presença de tumores raros, padrão de herança autossômica dominante na análise do heredograma e, em alguns casos, a origem étnica de algumas neoplasias malignas (HARTGE et al., 1999; LYNCH et al., 2009; ROSSI, 2010; MANRIQUE; SULLCAHUAMAN-ALLENDE; LIMACHE-GARCIA, 2013). As características podem ser observadas na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1: Características clínicas para câncer Hereditário

Critérios para Câncer hereditário (MANRIQUE; SULLCAHUAMAN-ALLENDE; LIMACHE-GARCIA, 2013)
Dois ou mais familiares diagnosticados com câncer; Um membro da família diagnosticado com câncer antes dos 50 anos de idade
Vários membros da família afetados pelo mesmo tipo de câncer Um familiar afetado por mais de um tipo de câncer
Um ou mais membros da família afetados com um câncer raro

A observação dos critérios de tumores hereditários demonstra que a maioria das características apresentadas ocorre em parte das famílias com casos de câncer, evidenciando a importância de analisar a probabilidade de o indivíduo acometido ser portador de câncer hereditário. Tal observação se torna importante na identificação dos demais familiares em risco para a inserção em programas prevenção de câncer (LYNCH, 2012; MACDONALD, 2011; SUNG et al., 2017). Para que esse primeiro reconhecimento é fundamental a conscientização dos profissionais de saúde sobre a importância que do histórico familiar. Isto é determinante no diagnóstico do paciente e geralmente é determinado pelo diálogo com escuta acolhedora e humanizada durante a consulta com a equipe multidisciplinar (CAMPACCI, 2013).

Com relação às principais neoplasias que acometem as famílias com síndromes hereditárias de câncer podemos relacionar tumores colorretais e de mama, que estão também entre os mais incidentes da forma esporádica. Dados do INCA mostram que o câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente na população feminina brasileira e, o câncer colorretal o terceiro, tanto para a população feminina quanto para a masculina (INCA, 2016).

1.4 Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer

1.4.1 Câncer de Mama e Ovário Hereditários

O câncer de mama e ovário podem ser hereditários em 10 -15% dos casos. A principal síndrome relacionada com o aparecimento da doença é a “Síndrome de Predisposição Hereditária ao Câncer de Mama e Ovário” e mutações nos genes BRCA1 E BRCA 2 podem ser as principais causadoras do desenvolvimento da doença (LYNCH et al., 2003; KOBAYASHI; OHNO; MATSUURA, 2013).

No entanto, a literatura relata que mutações germinativas em outros genes como *PTEN*, *TP53*, também podem estar relacionadas com o câncer de mama hereditário (LYNCH, 2003).

Portadores de mutação germinativa no gene *BRCA1* têm um risco cumulativo vital de desenvolver câncer de mama de 40 a 80% até os 80 anos de idade (RICH et al., 2006; CASS et al., 2003). Além disso, o risco para câncer de ovário nessas pacientes também é expressivamente maior e pode chegar até 40% aos 80 anos de idade (PAL; VADAPARAMPIL, 2012; CASS et al., 2003; ANTONIOU et al., 2006).

A herança de mutações nos genes *BRCA* é autossômica dominante, caracterizada por uma transmissão vertical onde a doença é apresentada em cada geração. Pode ser herdada por homens e mulheres; o portador de uma mutação tem um risco de 50% de transmissão à mutação para seus filhos. Atualmente, o câncer de mama se espalha escala epidêmica e é um importante problema de saúde pública que afeta negativamente a qualidade de vida de vários milhões de pacientes e suas famílias em todo o mundo (BERLINGER; FAY, 2007).

1.4.2 Síndrome de Cowden

É uma doença genética de herança autossômica dominante com características fenotípicas como lesões cutâneas típicas e maior predisposição a diversas neoplasias como pólipos intestinais hamartomatosos, doenças fibrocísticas da mama e tumores malignos na tireoide, na mama e no endométrio (EELES, 1995; PERRIARD; SAURAT; HARMS, 2000).

O gene associado a essa síndrome é o *PTEN* que atua no ciclo celular como supressor de tumor controlando a proliferação celular (LACHLAN, 2013). A mutação no gene *PTEN* é encontrada em aproximadamente 80% dos indivíduos com diagnóstico clínico para a Síndrome de Cowden (PILARSKI; ENG, 2004).

Ainda que a maioria dos tumores que se desenvolvem na síndrome de Cowden seja benigna, a prevalência de malignidade é maior do que na população em geral, sobretudo em carcinomas mamários e tireoidianos. Esta síndrome foi descrita pela primeira vez por Lloyd e Dennis, em 1963, e denominada Síndrome de Cowden (MALLORY, 1995) em referência a sua paciente Rachel Cowden, que faleceu de carcinoma mamário. Weary e colaboradores (1972), reportaram cinco casos adicionais e sugeriram a denominação síndrome de múltiplos hamartomas (SMH).

1.4.3 Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch (SL) ou HNPCC (*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*) é uma síndrome de predisposição hereditária ao câncer colorretal e é considerada uma das síndromes hereditárias mais comuns na espécie humana, com incidência entre 1:660 e 1:2000 indivíduos (HEMMINKI et al., 1998). A SL apresenta caráter autossômico dominante e é causada principalmente por mutações germinativas nos genes do sistema MMR (*mismatch repair system*) de reparo de danos ao DNA (principalmente nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*). Indivíduos portadores da SL apresentam um risco de desenvolvimento de CCR de 60% a 80% (versus 5% que é o risco para a população em geral) (HEMMINKI et al., 1997) e, além disso, possuem um aumento no risco de desenvolver tumores diversos como o câncer de endométrio

(RCV de 40% a 60%, versus risco populacional de 3%); câncer gástrico (RCV aproximado de 19%); câncer do trato biliar (RCV de 17,5%); trato urinário (RCV de 10%); e RCV de 10% a 12% para câncer de ovário, além de um risco aumentado para câncer de mama, pâncreas, intestino delgado, sistema linfático, sistema hematopoiético e cérebro (PINHO et al., 2003; LIM et al., 2013).

A SL não apresenta características fenotípicas clínicas evidentes até ao desenvolvimento de CCR, desta forma, o seu diagnóstico deve ser realizado com base na história familiar oncológica e nas características clínico-patológicas de indivíduos que apresentem este tumor (LYNCH; CHAPELLE, 1999).

Para ajudar na identificação e classificação das famílias em risco e gerar uma padronização internacional no diagnóstico clínico da SL, foram instituídos alguns critérios clínicos, dentre os quais se sobressaem os critérios de Bethesda e de Amsterdam (BROOKS-WILSON et al., 2004; SHAW et al., 2004).

1.4.4 Polipose Adenomatosa Familiar

Outra síndrome de predisposição hereditária de câncer importante e que representa 1% de todos os casos de câncer colorretal é a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), ocasionada pela presença de mutações germinativas no gene *APC*. A FAP apresenta como característica o surgimento de diversos pólipos adenomatosos no cólon ou no reto. Pacientes portadores Polipose Adenomatosa Familiar apresentam o risco de 15% para a formação de adenoma aos 10 anos de idade e, esse risco pode aumentar para 90% aos 30 anos de idade. Pacientes portadores de FAP têm grande chance de desenvolver a doença ao longo da vida, pois a mesma tem penetrância praticamente completa. Iniciando com o aparecimento de pólipos benignos que progridem para adenocarcinoma por volta dos 35 anos de idade (DE LA CHAPELLE, 1996; LYNCH; SMYRK, 1996; MACDONALD, 2011).

1.4.5 Câncer Gástrico Difuso Hereditário

O primeiro caso de câncer gástrico hereditário descrito foi o da família de Napoleão Bonaparte onde seis membros de sua família (um avô, seu pai, um irmão e três irmãs) morreram de câncer gástrico (GC) (GURZU et al., 2015).

A síndrome de câncer gástrico difuso possui padrão de herança autossômico dominante e está associada a mutações germinativas no gene *CDH1*. Esse gene *CDH1* tem a função de codificar uma E-caderina, uma molécula de adesão célula-célula e sua disfunção apesar de ainda não possuir os mecanismos bem estabelecidos, sabe-se que em 70% dos casos de carcinomas gástricos estão presentes disfunções dessa molécula (GALLAGHER; PHILLIPS; BULOW, 2006).

Geralmente, os indivíduos afetados possuem o diagnóstico de câncer gástrico difuso em idade jovem, antes dos 40 anos de idade, com um risco cumulativo vital de 40% para mulheres de desenvolvimento de carcinoma lobular de mama (WILL et al., 2008; SCHULMANN et al., 2007).

O câncer gástrico (CG) é a terceira causa mais comum de mortalidade relacionada ao câncer em todo o mundo. Os dois principais subtipos, GC difuso (DGC) e GC do tipo intestinal, distinguem-se por fatores moleculares, epidemiológicos e morfológicos (HANSFORD et al., 2015).

1.4.6 Síndrome de Li-Fraumeni - gene *TP53*

A síndrome de Li-Fraumeni (LFS) é uma síndrome de predisposição ao câncer causada por uma mutação do gene *TP53*, localizado no cromossomo 17 em 17p13.1. O gene possui 11 éxons e codifica uma proteína com 5 domínios (Figura 2). A síndrome tem um padrão de herança autossômica dominante com alta penetrância. Pacientes com LFS apresentam um alto risco cumulativo de desenvolver múltiplas neoplasias malignas e ter uma forte história familiar de malignidades em idade precoce. A proteína p53, codificada pelo *TP53*, tem um conjunto complexo de funções de preservação do genoma iniciadas durante episódios de estresse celular e danos ao DNA. A LFS, as mutações do gene *TP53* causam a perda da função da p53, levando a eventos que promovem o desenvolvimento de vários tumores malignos. Os tumores do componente da LFS incluem sarcomas de tecido mole, osteosarcoma, câncer de mama pré-menopausa, tumores cerebrais e carcinomas corticais supra-renais (CORREA, 2016).

O gene *TP53* foi descrito pela primeira vez em 1979, por seis grupos de pesquisadores independentes. Inicialmente acreditava-se ser um oncogênese, por se encontrar super expresso em células tumorais. Posteriormente, compreendeu-se que a região onde o *TP53* está localizado possui uma intensa atividade supressora tumoral. Sua comprovação foi confirmada através do modelo “*two-hits*” desenvolvida por Knudson, que se fundamenta nos passos necessários para a perda de função de um supressor tumoral. Desta forma, para um oncogene desencadear uma transformação maligna, só é necessária uma única mutação em um alelo, enquanto que para um gene supressor tumoral perder sua função, deve haver mutação nos dois alelos (BURNETT, 2011).

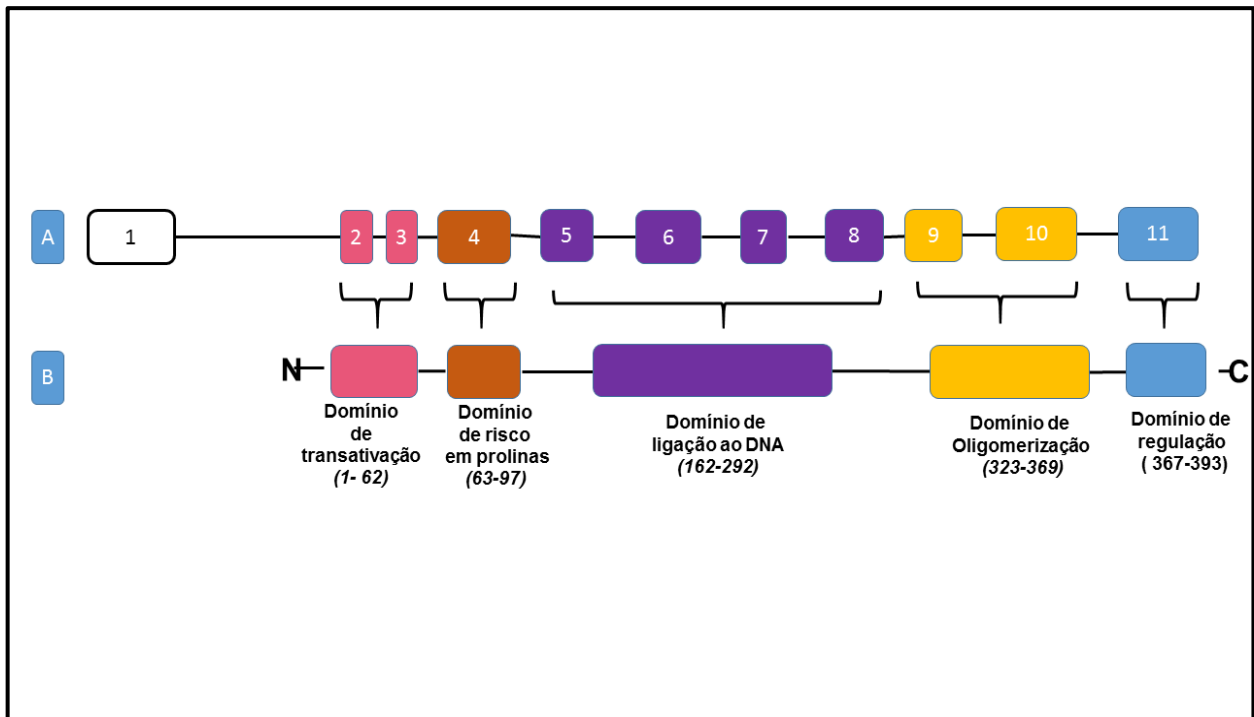


Figura 1: Legenda: (A): Representação dos éxons (cilindros) 1 a 11 do gene *TP53*; (B): Representação da proteína p53 e seus domínios. As diferentes cores correspondem aos domínios da proteína e seus respectivos éxons codificantes. Ilustração adaptada de Donehower, 2002.

O domínio inicial (aminoácidos 1 a 62), ou amino terminal, é o domínio de transativação, no qual se encontra o sítio de ligação à proteína MDM2. É acompanhado por um domínio rico em resíduos de prolina (aminoácidos 63 a 97) e pela região central da p53 (aminoácidos 102 a 292), que abriga o domínio de ligação ao DNA. O domínio de ligação ao DNA é alvo de mais de 90% das mutações somáticas localizadas nos tumores humanos esporádicos e das mutações germinativas na LFS/LFL. O domínio de oligomerização é essencial na configuração espacial da proteína p53, responsável pela multimerização da proteína, que se unirá em tetrâmeros, e o domínio final é o de regulação.

Diversas na sequência do DNA do gene *TP53* foram descobertas em estudos de populações que não exibem a alteração relacionada ao aumento de risco em indivíduos portadores. Estas alterações são denominadas polimorfismos. Trinta e seis polimorfismos foram descritos no gene *TP53* (IARC) (PETITJEAN et al., 2007). Estes

polimorfismos foram identificados na população humana, em frequências alélicas divergentes nas diferentes origens étnicas.

Os mecanismos pelos quais esses polimorfismos poderiam afetar a função da proteína p53 abrangem aumento da mutabilidade devido à alteração da sequência do DNA, aumento de eventos de processamento gênico, ou *splicing*, e alteração da estabilidade transcricional e expressão tecido específica (PETITJEAN et al., 2007).

No Brasil, uma mutação relacionada ao éxon 10 do gene *TP53* (situado na região correspondente ao domínio de oligomerização da proteína), no códon 337 foi descrita em várias famílias aparentemente não relacionadas. A mutação foi identificada primeiro em crianças com carcinoma adrenocortical da região de Curitiba, Paraná (ACHATZ, 2005). Mais tarde outras pesquisas confirmaram a alta frequência dessa mutação na população das regiões Sul e Sudeste do Brasil e seu razoável impacto na epidemiologia do câncer no Brasil (ACHATZ, 2005). Além disso, considerando a elevada frequência da mutação *p.R337H* nas regiões Sul e Sudeste do Brasil, a presença de um efeito fundador foi investigada e confirmada (CUSTÓDIO et al., 2013).

Os critérios de diagnóstico para Síndrome de Li-Fraumeni Clássica, Li-Fraumeni like e de suas variantes são: Li-Fraumeni Clássico: Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e familiar de primeiro ou segundo graus que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.

Para Li-Fraumeni like segundo critérios proposto por Birch e colaboradores (1994): Câncer na infância ou sarcoma, Tumor do sistema nervoso central ou câncer adrenocortical antes dos 45 anos e familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, tumor do sistema nervoso central, câncer adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade e familiar de 1º ou 2º graus com qualquer câncer antes dos 60 anos.

Li-Fraumeni like Eeles (1995): Tipo 1- presença de dois familiares de primeiro ou segundo graus com câncer típico da SLF em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, câncer adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático) e o Tipo 2- sarcoma em qualquer idade no probando com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo): câncer de mama

em idade inferior a 50 anos de idade e/ou câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni antes dos 60 anos de idade ou sarcoma em qualquer idade.

Li-Fraumeni Like segundo Chompret e colaboradores (2002), Sarcoma, tumor do SNC, câncer de mama ou câncer adrenocortical antes dos 36 anos e familiar de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos ou; familiar com múltiplos tumores primários em qualquer idade; diversos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar; câncer adrenocortical em qualquer idade e independente da história familiar.

Em razão da imensa diversidade de tumores que pode surgir no decorrer da vida diante da SLF, cada família deve ser avaliada de forma criteriosa, buscando informações precisas e também a realização exames periódicos de imagem para pesquisar o aparecimento de novos tumores (GARRITANO et al., 2010).

De acordo com o protocolo de rastreamento estabelecido pelo National, Comprehensive Cancer Network – NCCN (2005), as ações preventivas abrangem (Tabela 2) (BICH et al., 1994).

Tabela 2- Ações preventivas propostas de acordo com o protocolo de rastreamento estabelecido pelo NCCN (BICH et al., 1994):

Ações preventivas para identificação de Câncer- NCCCN
Treinamento para o autoexame da mama mensal a partir dos 18 anos;
Exame clínico das mamas semestral a partir dos 20-25 anos ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama ocorrido em familiar jovem;
Mamografia e ressonância magnética das mamas anual a partir dos 20-25 anos ou 5 a 10 anos antes do tumor de mama ocorrido em familiar jovem;
Orientar sobre a possibilidade de mastectomia, avaliando caso a caso, levando em consideração a proteção, redução de risco e opções de reconstrução;
Orientar sobre limitações no rastreamento de diversas lesões associadas à LFS, devido ao maior risco para o desenvolvimento de mais de um tumor primário, o screening deve ser realizado em pacientes Li-Fraumeni que sobreviveram a um primeiro câncer com bom prognóstico;
Exame clínico anual com foco na detecção de tumores raros e novos tumores primários, incluindo avaliação neurológica e dermatológica;
Considerar a inclusão de colonoscopia a cada 2-5 anos a partir de 25 anos;
Acompanhamento direcionado à história familiar de câncer;

1.4.7 Mutação R337H – SLF

O gene *TP53* apresenta alta penetrância e expressividade variada. A alta prevalência da mesma muta o germinativa específica na região do *TP53* que codifica o domínio de oligomeriza o (no éxon 10) com a troca de uma arginina por uma histidina (R337H – CGC para CAC no códon 337) foi verificada em alta prevalência numa popula o da região do Sul Brasil, a mesma muta o havia sido descrita em 1998 em apenas uma família na França e ocorre em uma região do gene em que poucas muta oes germinativas foram descritas (IARC) (BOUGEARD et al., 2008; MIGDEN, 2018).

Em rela o   penetrância, ela ocorre em características dominantes e possui dois conceitos, um individual e outro populacional. No conceito individual, diz-se que o gene penetrou quando a característica se manifesta, e que não houve penetrância

quando a característica não se manifesta. Já no conceito populacional, a penetrância é dada em porcentagem, ou seja, das pessoas que herdaram a característica genética, um número, geralmente elevado em porcentagem manifestam, ou a chance em porcentagem de manifestação até determinada idade. A penetrância demonstra o quanto de modificação da expressão gênica existe em relação ao ambiente e características de fundo genético.

A síndrome de Li-Fraumeni está associada a uma mutação na linhagem germinativa no gene supressor tumoral *TP53*, e os portadores são predispostos a um amplo espectro de cânceres ao longo de suas vidas (MIGDEN, 2018).

Em resposta aos sinais de estresse, a proteína p53 ajuda na estabilidade genômica por vários mecanismos. Ele pode manter a divisão celular na fase G1 / S, permitindo assim ativar os sistemas de reparo de DNA para fixar o dano antes de continuar com o ciclo celular (PETITJEAN, 2007). Se o dano ao DNA se mostrar irreparável, a proteína p53 induz apoptose ou senescência celular, impedindo a proliferação de células tumorais.

A razão pela qual a mutação germinativa R337H ocorre na população brasileira ainda é desconhecida, mas foi indicação da presença de efeito fundador comum a estas famílias.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar triagem populacional para câncer hereditário na região do Caparaó Capixaba e estudar as famílias com síndrome de Li-Fraumeni/Li-Fraumeni-Like do ponto de vista clínico pela confecção de heredogramas e realizar avaliação de molecular da presença da mutação R337H.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar triagem das famílias atendidas nas UBS's e PSF's e comunidades do Caparaó Capixaba com identificação dos casos hereditários de câncer;
- Confeccionar os heredogramas das famílias incluídas na proposta e descrever as principais síndromes hereditárias encontradas clinicamente;
- Classificar as famílias nos critérios descritos na literatura para a Síndrome de Li-Fraumeni e Li-Fraumeni-Like;
- Verificar a presença do haplótipo fundador brasileiro nos portadores da mutação *TP53* p R337H.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística e Aspectos Éticos

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa CEP/CCS/UFES, sob parecer nº 2.741.268. Todos os indivíduos assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

A casuística foi composta de famílias com câncer que foram triadas a partir dos registros das Unidades Básicas de Saúde e Posta de Saúde da Família e nas comunidades de 11 cidades da região do Caparaó Capixaba.

3.2 Caracterização regional

O Território do Caparaó-ES está localizado no sudoeste do Estado do Espírito Santo, perfazendo uma área de 3.920,70 Km², o que corresponde a 8,5% da área estadual. As cidades selecionadas para a realização do projeto foram escolhidas devido ao pequeno número de habitantes, facilidade de acesso a partir da UFES de Alegre, por estarem na região Sul do Estado ou estarem inseridas na Região do Caparaó e com Índice de Desenvolvimento Humano – IDH mais baixo que a média do Estado. São elas: Alegre; Guaçuí; Iúna; São José do Calçado; Muniz Freire; Jerônimo Monteiro; Ibitirama; Dores do Rio Preto; Divino de São Lourenço; Irupi e Ibatiba.

A região possui uma vocação agrária com aproximadamente 38% da população vivendo na área rural e 72% na área urbana, porém parte da população da área urbana também trabalha no campo, na qual um dos principais problemas apontado pelo novo PEDEAG 2010-2025 é o educacional. Dentro do IDH, o principal fator determinante para sua diminuição é a educação. Nessa região há falhas de caráter educacional do cidadão que se traduz pela baixa perspectiva e oportunidade de melhoria de vida, com aumento da vulnerabilidade da população e das mazelas urbanas como o uso de drogas lícitas e ilícitas e ausência de estímulo à qualificação profissional. Os índices de

analfabetismo da população no Território Caparaó, segundo dados do Censo Demográfico, indicaram que 18,4% da população de 15 anos e mais era analfabeta, taxa superior àquela apresentada pelo Estado (10,9%) e pelo Brasil (13,6%). No meio rural essas taxas são ainda maiores, com o analfabetismo atingindo 22,7% das pessoas. A média de anos de estudo era 5,8 (6,9 na zona urbana e 3,8 na zona rural).

Segundo dados do Instituto de Pesquisas do Espírito Santo (IPES), o indicador sobre mortalidade infantil (número de óbitos em crianças de até um ano de idade por mil nascidos vivos), no Território Caparaó é de 18,2, enquanto o do Estado do Espírito Santo é de 15,9.

Segundo o Diagnóstico Socioeconômico (BANDES, 2005), citando dados do Instituto Capixaba de Pesquisa, Assistência Técnica e Extensão Rural (INCAPER), a participação da atividade cafeeira na receita das propriedades rurais no Território Caparaó está em torno de 75,6%, o que a coloca como a maior participação do Estado na geração de renda das propriedades rurais, no que se refere a esta cultura. Quanto à produção pecuária, as entrevistas (PTDRS – subsídio, 2006) a apontaram como a segunda maior atividade no Território, atrás somente do café. Em alguns municípios do Território, especialmente ao sul, sua importância é maior que esta cultura (Consórcio Caparaó/Agência 21, 2006; LEITÃO, 2009).

Em relação ao rendimento familiar, não foi verificada aumento de renda, pelo contrário, houve um agravamento desta situação traduzido pelos dados oficiais apresentados pelo governo do Estado do Espírito Santo (2009) que mostram que 81,25% das famílias dos municípios dessa região tinham, renda mensal familiar de até dois salários mínimos; e esses dados mostram a necessidade de atenção a essas populações, em especial aquelas que relacionam educação e saúde.

O Território Caparaó apresenta terras que são divididas em pequenas propriedades, dedicadas, em sua maioria, à agricultura familiar, destacando-se o cultivo do café arábica e a pecuária leiteira. Segundo Leitão (2009), há 5.740 agricultores familiares no Território Caparaó, constatando-se grande concentração nos municípios de Muniz Freire, Alegre e Lúna. Mais da metade do total de famílias assentadas no Território encontram-se no município de Guaçuí e mais de um quarto em Alegre, distribuindo-se, entre os outros municípios, o restante das famílias. Os municípios

apresentam algumas atividades rurais não agrícolas, como turismo, agroindústria, artesanato e hospedaria.

A população dos municípios que compõem o Caparaó de acordo com o censo IBGE 2010 está organizada na tabela abaixo (Tabela 3):

Tabela 3: Distribuição populacional no Caparaó Capixaba - IBGE 2010:

Município	População/Habitantes
Alegre	30.784
Guaçuí	27.851
Iúna	27.328
Ibatiba	22.366
Muniz Freire	18.397
Irupi	11.723
Jerônimo Monteiro	10.879
São José do Calçado	10.408
Ibitirama	8.957
Dores do Rio Preto	6.399
Divino de São Lourenço	4.516

A região foi passagem de tropeiros, que, em busca de melhores pastagens e comércio em geral, faziam rota vindas do Sul do país e de Minas gerais (GHEDINI, 2015). Outra questão pertinente à região é a geografia que desfavorece o deslocamento e a construção de estradas, fato esse que determinou por muitos anos um isolamento geográfico que pode ter sido responsável pelo menor IDH.

3.3 Seleção de Pacientes

Como critérios de inclusão, foram incluídos no estudo os indivíduos que preencheram pelo menos um dos critérios para câncer hereditário, considerando a idade jovem de acometimento da doença, bilateralidade do tumor, mais de um tumor primário no mesmo indivíduo, ocorrência de tumores entre parentes de primeiro ou segundo grau (história na família), qualquer caso de tumor adrenocortical infantil, qualquer caso (mesmo que um) de tumor cerebral, pancreático ou ósseo em idade

abaixo de 45 anos. Quando pelo menos um dos critérios foi preenchido, a família foi investigada.

Como critérios de exclusão, foram excluídos os indivíduos com câncer de próstata e mama em idade avançada – acima de 60 anos sem agregação familiar, casos com câncer de colo uterino com confirmação positiva para HPV sem agregação familiar, casos de câncer de cabeça e pescoço ou pulmão em fumantes e/ou etilistas sem agregação familiar.

Os indivíduos integrantes do estudo para câncer hereditário foram selecionados segundo sua história familiar de câncer ou pela ocorrência de tumores com triagem ativa nas Unidades Básicas de Saúde (UBS's) ou Postos de Saúde da Família (PSF's) dos municípios do Caparaó e diretamente nas comunidades rurais na mesma localidade.

Foram incluídos no estudo indivíduos provenientes de 38 comunidades rurais e Postos de Saúde de 11 cidades da região avaliada (Figura 3). As equipes de saúde receberam treinamento na identificação de câncer hereditário, o que incluiu aulas teóricas sobre câncer hereditário e esporádico, fatores de risco para a confecção dos heredogramas e análise dos prontuários para a identificação dos casos.

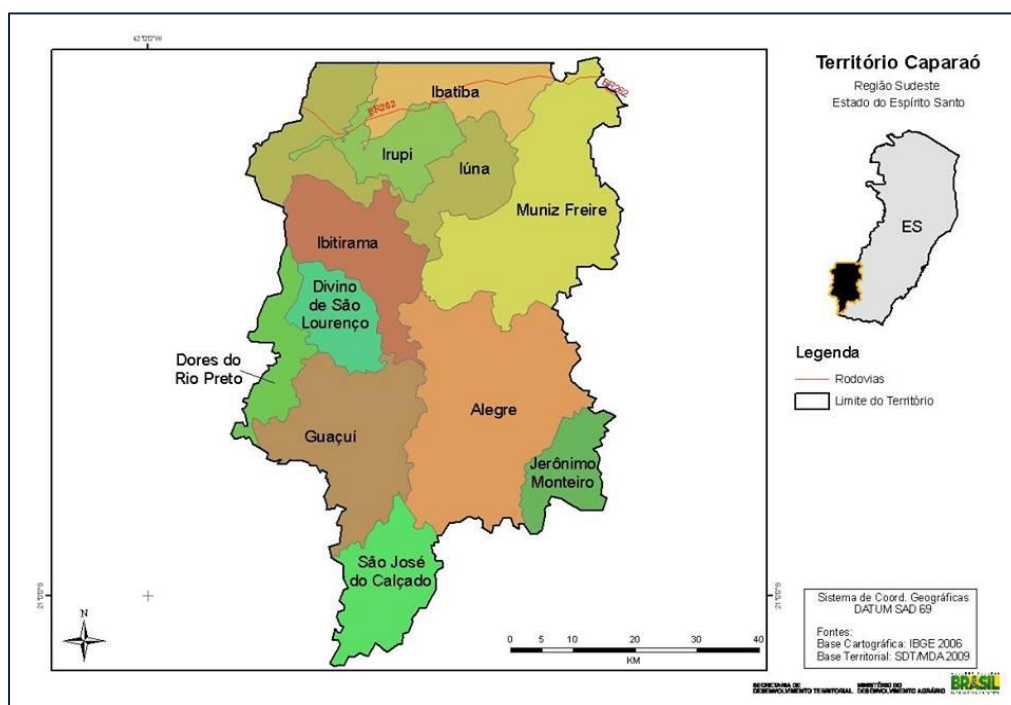


Figura 3: Mapa da região do Caparaó Capixaba. Fontes: Base Cartográfica: IBGE, 2006; Base Territorial: SDT/MDA, 2009.

Todos os casos foram individualmente avaliados quanto à possibilidade de hereditariedade da doença. Com a ajuda dos agentes comunitários de saúde foram construídos os heredogramas e apontados os indivíduos que tiveram a doença. A triagem contou com a colaboração direta dos agentes comunitários que selecionaram os prontuários de todos os indivíduos com câncer ou história de câncer na família. A partir dessas fichas, foram observados os critérios de inclusão ou exclusão e as fichas foram divididas em dois grupos, os excluídos e os incluídos.

Os indivíduos incluídos foram triados classificados quanto aos critérios para síndrome de Li-Fraumeni de acordo com o Quadro 1.

Quadro 1: Detalhamento dos 4 critérios utilizados para síndrome de Li-Fraumeni

Clássico Li e Fraumeni	<p>Sarcoma na infância ou em idade jovem (antes dos 45 anos) E</p> <p>Parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) E</p> <p>Parente de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) ou sarcoma em qualquer idade.</p>
Birch	<p>Câncer na infância ou sarcoma, tumor do sistema nervoso central ou câncer adrenocortical antes dos 45 anos E</p> <p>Parente de primeiro grau ou segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (sarcoma, câncer de mama, tumor do sistema nervoso central, câncer adrenocortical ou leucemia) em qualquer idade E</p> <p>Parente de primeiro ou segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos.</p>
Eeles	<p>LFL-E1 presença de dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama, tumor SNC, leucemia, tumor adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático).</p> <p>LFL-E2: sarcoma em qualquer idade no probando com dois dos seguintes tumores (podendo estar presentes no mesmo indivíduo) câncer de mama <50 anos e/ou tumor SNC, leucemia, tumor adrenocortical, melanoma, câncer de próstata, câncer pancreático aos <60 anos ou sarcoma em qualquer idade.</p>
Chompret	<p>Sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical antes dos 36 anos E</p> <p>Parente de primeiro grau ou segundo grau com câncer antes dos 46 anos OU</p> <p>Parente com múltiplos tumores primários em qualquer idade. Múltiplos tumores primários, incluindo dois tumores que sejam do tipo sarcoma, tumor do sistema nervoso central, câncer de mama ou câncer adrenocortical, com o primeiro tumor diagnosticado antes dos 36 anos, independente da história familiar. Câncer adrenocortical em qualquer idade e independente da história familiar.</p>

Após esse procedimento, somente as famílias com indício de doença hereditária, ou que preenchiam pelo menos um dos critérios de inclusão foram convidadas a comparecerem à unidade de saúde para participarem de uma palestra explicativa sobre câncer e fatores de risco. Os indivíduos que aceitaram participar do estudo assinaram o TCLE e foram avaliados em um momento reservado, na qual foram colhidos os dados da família com a história completa e análise dos dados e exames apresentados.

Essa etapa contou com a participação do médico da unidade de saúde, enfermeiros e do agente de saúde daquela família. Os heredogramas foram completados e os pacientes orientados e encaminhados segundo a necessidade.

3.4 Elaboração dos Heredogramas

Para a elaboração do heredogramas a família foi convidada a participar de uma entrevista na qual foram pesquisadas a ocorrência de tumores, idade de acometimento, lateralidade do tumor e ascendência e descendência do probando ou caso índice. A história da família quanto à ocorrência de câncer foi registrada em papel para posterior análise em conjunto com o médico geneticista. Participaram do momento da entrevista, a família investigada, o médico da UBS (em alguns casos), a agente comunitária de saúde e a equipe de pesquisa.

Os indivíduos triados com câncer hereditário e que tiveram avaliação para possível síndrome de Li-Fraumeni no heredograma foram encaminhados para coleta de sangue, extração do DNA e foi avaliado quanto à presença de uma mutação específica, a mutação R337H.

3.5 Coleta de Sangue e Extração do DNA

A coleta de sangue foi realizada em local apropriado nas UBS's, (Unidades Básicas de Saúde) por profissionais habilitados. Os participantes foram orientados a fazerem jejum de, no mínimo, 12 horas antes da coleta, que foi realizada entre 7 e 8 horas da manhã. Foram coletadas amostras de 10 mL, por punção venosa, em

seringas descartáveis e transferido a para um tubo com anticoagulante EDTA (ácido etilenodiaminotetracético), para realização de análise molecular. Em seguida foi realizada a extração de DNA pelo método *salting out* (Johnn e Rosen, 1991).

3.6 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O DNA extraído foi utilizado para a realização da reação de PCR para identificação da mutação no gene *TP53* éxon 11. Para tal procedimento foi utilizado na reação o par de primers abaixo (Tabela 4) que amplifica um segmento de 145 pb. A partir de 100ng de DNA genômico, na presença da enzima *Taq Platinum DNA polymerase* (Invitrogen®). As condições da reação de PCR foram: 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs; 1,2mM de cada primer; 1,25 U de *Taq Platinum DNA polymerase* (Invitrogen®); 2,5uL de tampão de reação para Taq Platinum 10X (concentração final 1X) e água em quantidade suficiente para 25uL.

Tabela 4: Par de *primers* utilizado na amplificação na reação de PCR

Éxon	Primer direto	Prime reverse	Fragmento (pb)
11	5'-atctctcctccctgcttctg-3'	5'-aggctgtcagtggggaacaa-3'	100

Os fragmentos amplificados de DNA (Figura 4) foram submetidos à reação de digestão com a enzima de restrição *HhaI* que reconhece a mutação específica R337H clivando as amostras não mutadas.

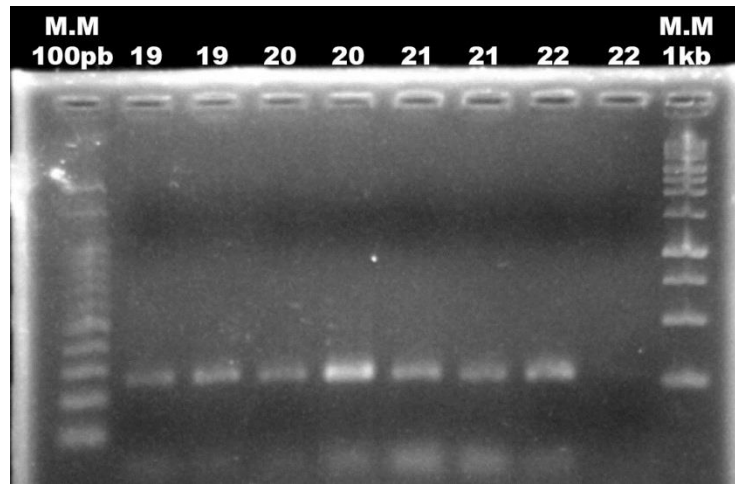


Figura 4. Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil de amplificação do DNA em indivíduos do estudo (19 a 22).

3.7 Gel de Identificação e análise molecular

O produto da digestão foi aplicado em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio, submetido à eletroforese (120 volts, por 30 minutos aproximadamente) e visualizado sob luz ultravioleta (UV). O padrão de banda heterozigota para a mutação R337H foi identificado através do aparecimento de três bandas no gel. O padrão normal é identificado quando aparecem duas bandas no gel (Figura 5).

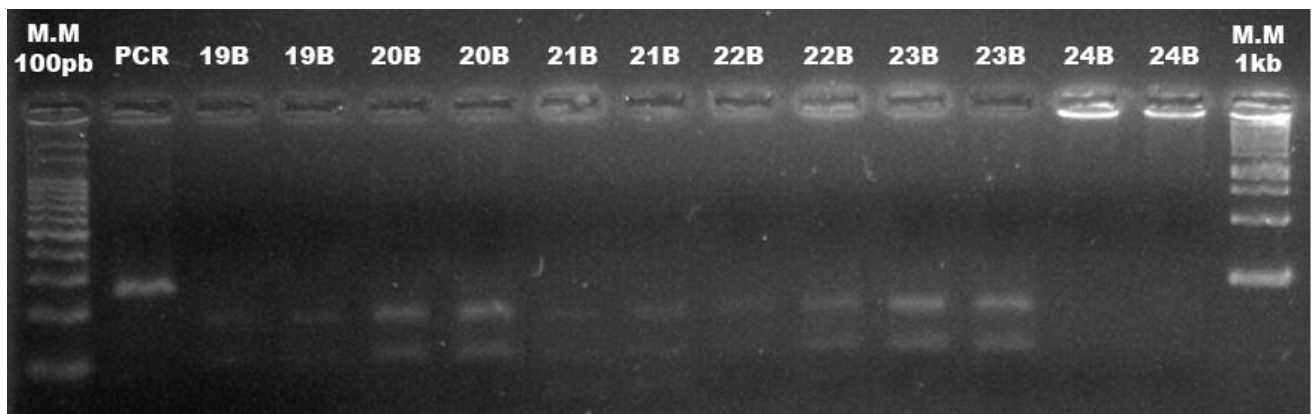


Figura 5: Fotografia do gel de agarose mostrando o perfil dos fragmentos produzidos por digestão com a enzima de restrição *Hha I* que reconhece a mutação específica R337H. Indivíduos do estudo (19 a 24). Ladder 100 pb e 1 Kb. M.M- Marcado; PCR - amostra amplificada sem a enzima de restrição.

Para confirmação dos resultados obtidos para a análise da mutação R337H, o DNA dos pacientes foi encaminhado para o Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Pequeno Príncipe de Curitiba que realiza rotineiramente a avaliação da mutação para o Estado do Paraná .

Foram selecionados ainda 3 pacientes para a realização de painel de 20 genes no laboratório Personal BH.

APC	BRIP1
ATM	CDH1
BARD1	CDK4
BRCA1	CDK2NA
BRCA2	CHEK2
MLH1	PTEN
MSH2	RAD51C
MSH6	RAD51D
MUTYH	STK11
PALB2	TP53

A metodologia usada no exame foi NGS- Sequenciamento de Segunda Geração por Multiplex. O DNA foi extraído de sangue periférico ou saliva de forma automatizada (QIASymphony). A técnica principal para o preparo da biblioteca de DNA é utilizando-se a tecnologia de PCR multiplexado com molecular barcode (QiaSeqDNA V3). No caso de regiões não adequadamente cobertas na primeira técnica, foi preparado por PCR convencional seguido de Nextera ou Sanger. O sequenciamento de segunda geração é realizado na plataforma Illumina e o sequenciamento de Sanger é realizado em um sequenciador automático ABI 3500. O resultado final foi uma cobertura de 100% das bases com profundidade acima de 50x nos exons e 5pb de região intrônica adjacente. Quando variantes patogênicas foram encontradas, os achados são confirmados por sequenciamento Sanger. A chamada de variante é feita através do transcrito de referência a partir da base A do códon de iniciação ATG alinhado contra o genoma de referência GRCh37/hg19.

3.8 Análises Estatísticas

Para associação entre o tipo de critério e o critério associado, foi utilizado o teste do qui-quadrado com nível de significância de $p < 0,05$. Como as variáveis continham mais de três categorias, a análise da razão 2x2 continuou com a correção de Bonferroni, considerando o nível de significância para $p < 0,008$. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SPSS, versão 15.0 para Windows (IBM, Munique, Alemanha).

4. RESULTADOS

4.1 Casos de câncer familiar no Caparaó Capixaba

4.1.1 Triagem oncogenética

Na triagem oncogenética foram avaliados 72 postos de saúde e 23 comunidades rurais de 11 cidades do Caparaó Capixaba. Um total de 299 pacientes provenientes de 66 famílias foram triados utilizando protocolo adaptado pelo estudo e os critérios descritos na literatura, a maioria sem parentesco e residente segundo relato no país a pelo menos 3 gerações. Todas as famílias apresentavam pelo menos um dos critérios clínicos para inclusão no estudo. O Fluxograma abaixo mostra a aplicação do método de triagem utilizado (Figura 6).

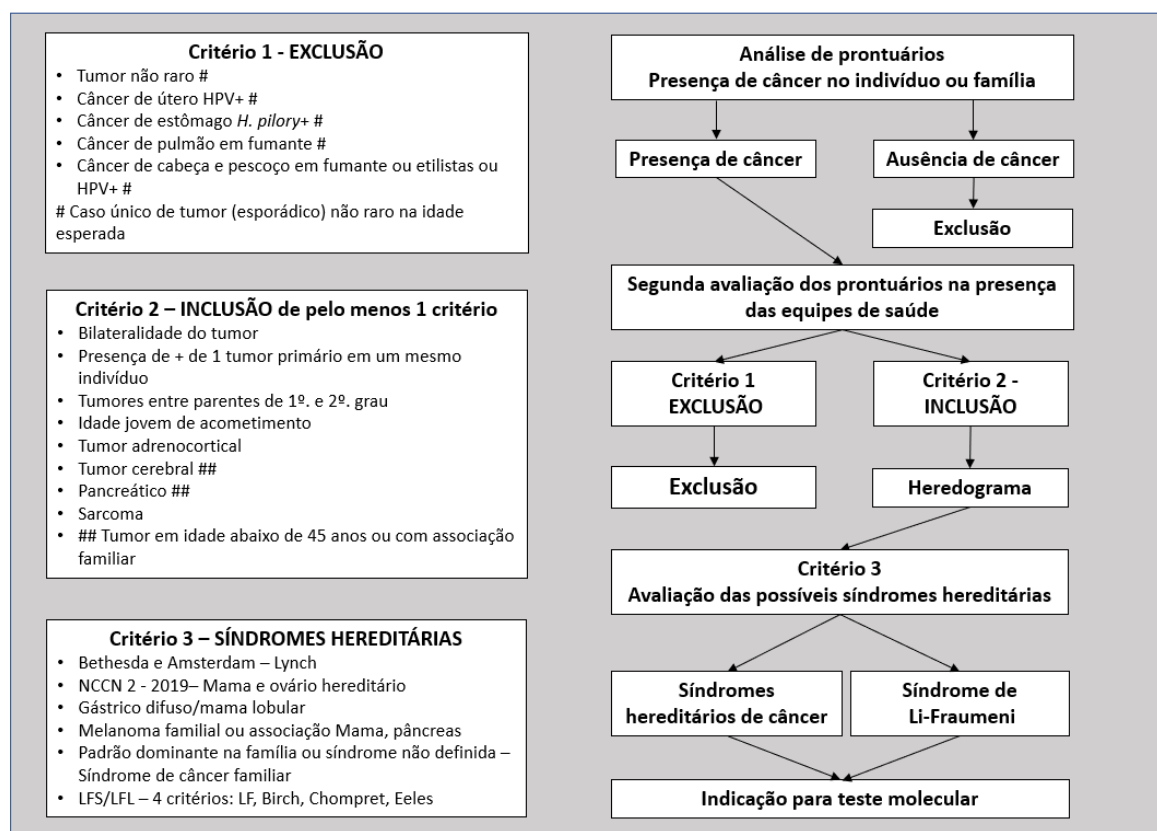


Figura 6: de método de triagem populacional para câncer hereditário e identificação da síndrome de LF, LFL.

Entre os indivíduos com câncer familiar 139 (48,9%) eram mulheres, 145 (51,1%) eram homens distribuídos geograficamente entre os 11 municípios do Caparaó Capixaba, no qual os municípios de Alegre ($n=55$), Muniz Freire ($n=49$) e Ibatiba ($n=33$) foram os que mais contribuíram para a amostra (Figura 7) .

Em relação à origem étnica, as 66 famílias pertencentes ao estudo, se declararam de origem europeia (portuguesa, espanhola e italiana), africana e indígena nas seguintes e respectivas proporções: 96,96%, 1,52% e 1,52%. Nenhum dos indivíduos selecionados na triagem populacional conhecia a condição hereditária da doença, assim como os profissionais de saúde que orientaram os tratamentos desses indivíduos.

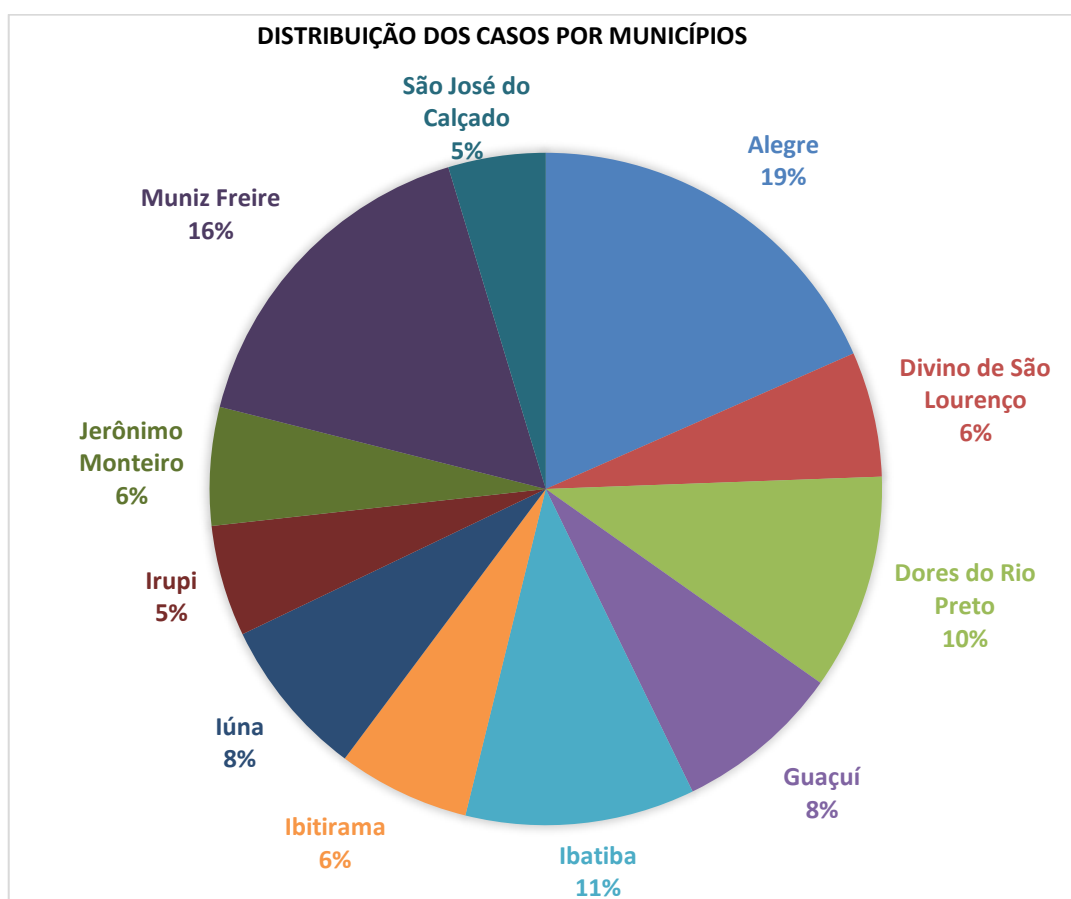


Figura 7: Distribuição dos pacientes com câncer nos 11 municípios do Caparaó Capixaba.

Em relação à distribuição dos tipos tumorais/localizações anatômicas, foram identificados 20 tipos de tumores, os quais os mais predominantes foram, o câncer de mama com 20,4% seguido de sarcomas com 14,6%, intestino com 9,6% e SNC com 7% dos indivíduos.

Tabela 6: Distribuição dos tipos tumorais/localizações anatômicas, por idade, entre os pacientes triados.

Tipo/Localização	0-15 anos		16-30 anos		31-45 anos		≥46 anos		Total
	N	(%)	n	(%)	n	(%)	N	(%)	
Mama	1	4,5	6	18,2	13	22,0	10	16,1	30
Estômago	0	0	1	3,0	3	5,1	6	9,7	10
Sistema Nervoso Central	2	9,1	3	9,1	8	13,6	5	8,1	18
Leucemia/Linfoma	4	18,2	1	3,0	5	8,5	7	11,3	17
Pulmão	0	0	2	6,1	5	8,5	5	8,1	12
Próstata	0	0	0	0	4	6,8	5	8,1	9
Trato Genital Feminino	0	0	1	3,0	0	0	1	1,6	2
Cabeça e pescoço	5	22,7	3	9,1	1	2	0	0	9
Pele Não Melanoma	0	0	1	3	2	3,4	4	6,5	7
Esôfago	0	0	0	0	1	1,7	2	3,2	3
Adrenocortical	1	4,5	0	0	0	0	0	0	1
Melanoma	1	4,5	0	0	1	2	4	6,5	6
Pâncreas	1	5	0	0	2	3,4	1	1,6	4
Tireoide/Hipófise	0	0	1	3	3	5,1	3	4,8	7
Renal	1	5	1	3,0	2	3,4	1	1,6	5
Bexiga	0	0	3	9,1	2	3,4	3	4,8	8
Ósseo (Osteosarcoma)	6	27,3	10	21,2	7	8,5	5	4,8	27
Total	22	100,0	33	100,0	59	100,0	62	100,0	176

A comparação dos quatro critérios para par a par, considerando a aplicação de todos os critérios em todas as famílias avaliadas, verificou que o critério de Li e Fraumeni difere dos demais critérios, classificando uma quantidade menor de famílias que os demais critérios ($p > 0,008$ com correção de Bonferroni), quando se compara os critérios de Birch com Li-Fraumeni, se tem o resultado de maior número de famílias classificadas ($p = 0,000$). Os demais critérios quando comparados uns com os outros não mostram diferenças na classificação de famílias (Tabela 7).

Classificação por mais de 1 critério						
Critérios	0	1	2	3	4	p*
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
LFS/LFL	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)	7 (87.5)	
Birch	0 (0)	13 (54.2)	2 (100.0)	0 (0)	1 (12.5)	<0.0001**
Eeles	0 (0)	6 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.005**
Chompret	0 (0)	4 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.005**
No LF	13 (100.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total	13 (100)	24 (100)	2 (100)	0 (100)	8 (100)	

*p-value for the qui-square test. **5% significance, adjusted by Bonferroni ($p < 0.008$).

Tabela 7: Tabela de classificação das famílias segundo os critérios de Li e Fraumeni, Birch, Eeles e Chompret (LI et al. ,1988, BIRCH et al. ,1994, EELES 1995, CHOMPRET et al.,2001). A Tabela mostra a sobreposição de famílias nos critérios de classificação.

A cada geração avaliada, foi observada a média da idade de acometimento com ocorrência de antecipação do aparecimento dos casos a cada geração. Na análise foram incluídas 5 gerações com as seguintes médias de idade: geração 1 – 60 anos ($\pm 13,51$), geração 2 – 55 anos ($\pm 15,58$), geração 3 – 39 anos ($\pm 13,37$), geração 4 – 24 anos ($\pm 14,77$), geração 5 - 12 anos ($\pm 18,00$). Os dados das médias nas gerações estão dispostos no Gráfico 1. A análise das médias de idade a cada geração mostrou que existe uma antecipação de até 18 anos em cada geração. (Gráfico 1). Os dados da análise de antecipação não foram completos para todas as famílias, especialmente nas primeiras gerações. Assim nem todas as idades foram computadas.

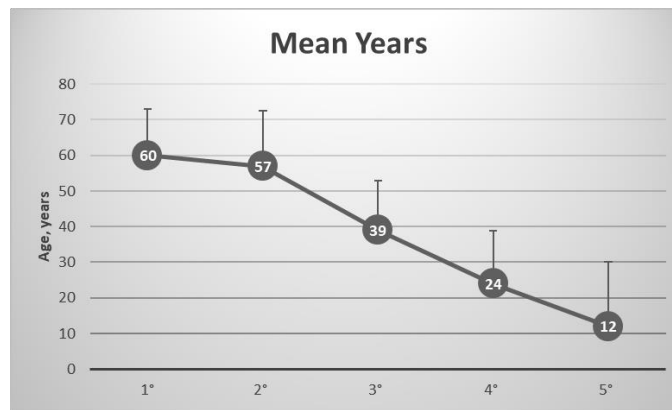


Gráfico 1: A análise das médias de idade a cada geração

A prevalência bruta pontual da doença, foi de 186:180.000 habitantes ou 103:10.000 habitantes. A comparação dos dados obtidos na região com os da prevalência populacional brasileira média esperada que é de 1:10.000 mostrou uma razão 103 vezes maior.

4.2 Heredogramas

Das 66 famílias triadas todas tiveram construído o heredograma. Destes, 34 famílias no qual o modelo de distribuição demonstrou um padrão de doença compatível com a síndrome de Li-Fraumeni, e estas foram encaminhadas para exame molecular para identificação da mutação R337H (descrito no tópico de análise molecular).

Estão representadas abaixo as 34 famílias avaliadas como sugestivas de Li-Fraumeni ou LFL.

Na família 1A, o heredograma apresenta características de câncer hereditário evidenciando várias gerações acometidas pela doença, idade precoce de aparecimento de tumor e mais de um tumor primário no mesmo indivíduo. Além do padrão hereditário observado, alguns pacientes também apresentavam exposição a fatores de risco ambientais como uso do tabaco, álcool e pele clara no câncer de pele (Figura 7).

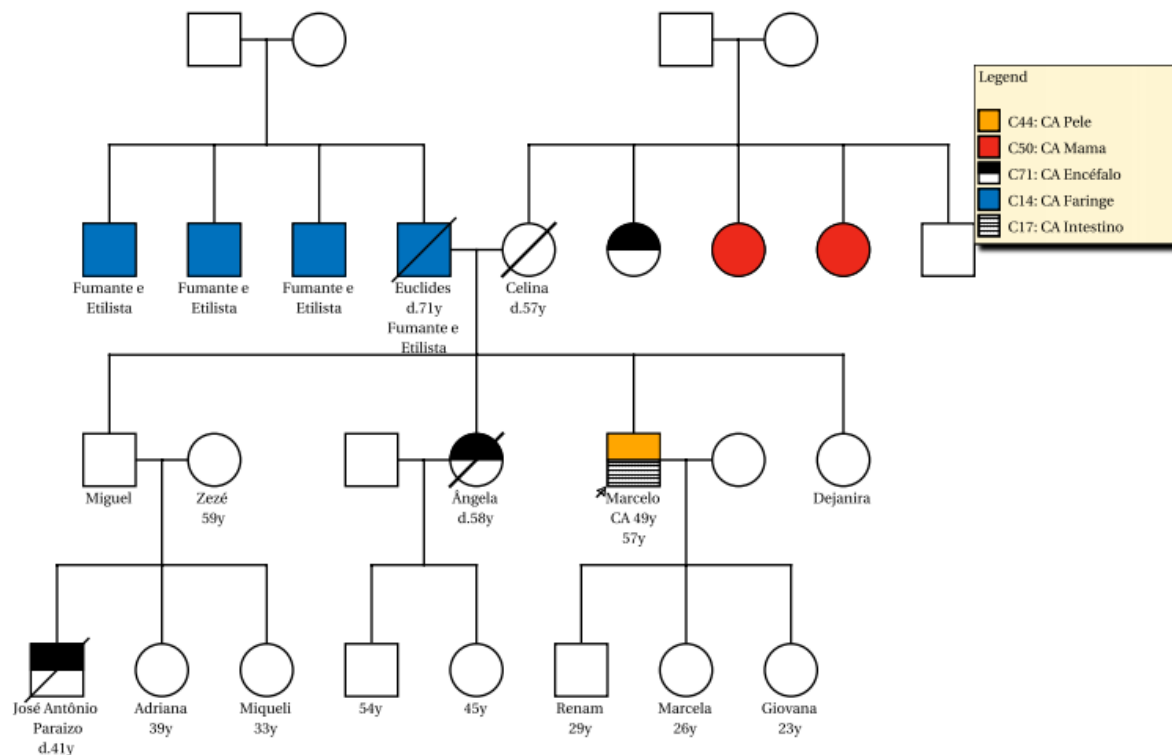


Figura 8: Heredograma do paciente 1A. Tumor do probando SNC >45 anos, parente de 2º grau com CA de mama em qualquer idade e parente de segundo grau com câncer antes dos 60 anos. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

A família 2A apresenta o probando do gênero feminino (indicado pela seta) com câncer de mama aos 36 anos, com duas tias maternas com tumor de mama em idade indeterminada e outra com câncer de útero aos 54 anos, apresenta ainda um familiar com tumor de medula óssea diagnosticado aos 6 anos de idade e uma sobrinha com câncer de mama aos 36 anos (Figura 8).

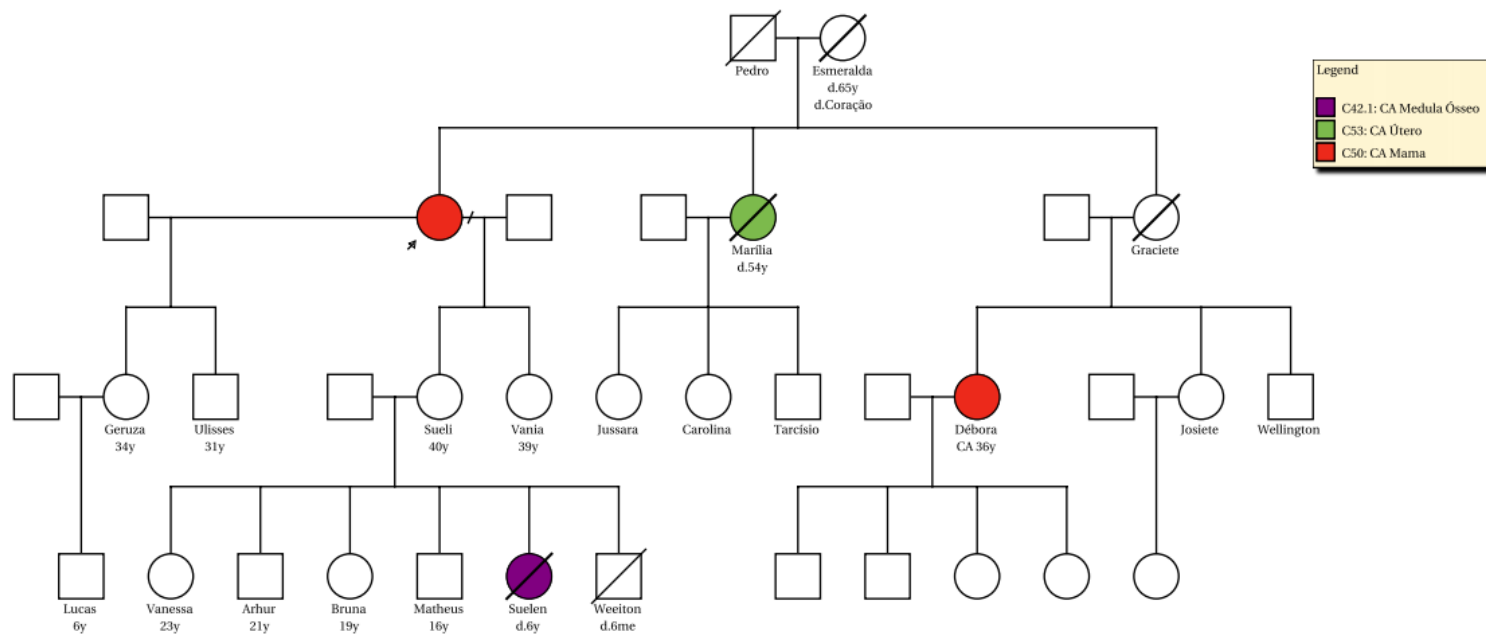


Figura 9: Heredograma do paciente 2A. Presença CA na Infância, parente de 2º grau com CA de mama <45 anos e parente de segundo grau com câncer antes dos 60 anos. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 5A apresenta características de câncer hereditário evidenciando mais de um tumor em idade jovem, tumor ósseo e de sistema nervoso central (Figura 11).

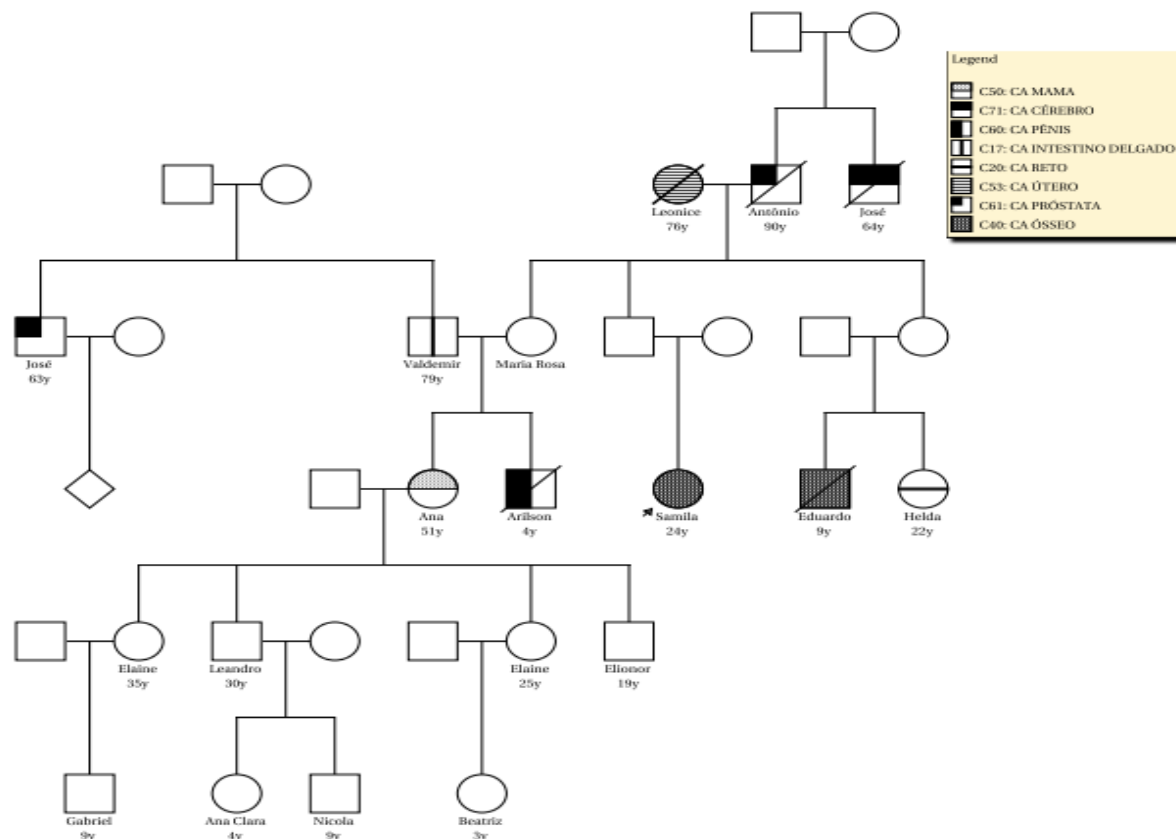


Figura 10. Heredograma do paciente 5A. Presença de sarcoma em idade jovem 26 anos, parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente com sarcoma na infância. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

A família 6A Apresentando tumor do sistema nervoso central antes dos 45 anos e parente de primeiro grau com tumor do sistema nervoso central antes dos 45 anos e parente de segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos. familiar (Figura 12).

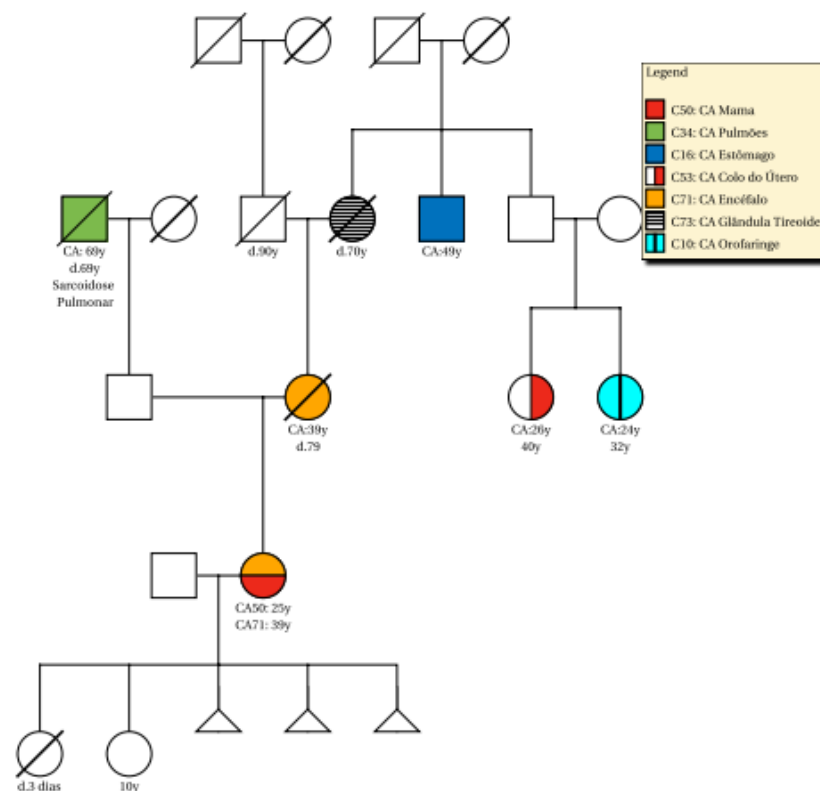


Figura 11: Heredograma do paciente 6A. A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Família 7A apresenta sarcoma em idade jovem 37 anos e parente de primeiro grau com CA de mama <45anos e parente de segundo grau com diagnóstico de câncer em idade jovem (mama com 18 anos). (Figura 13).

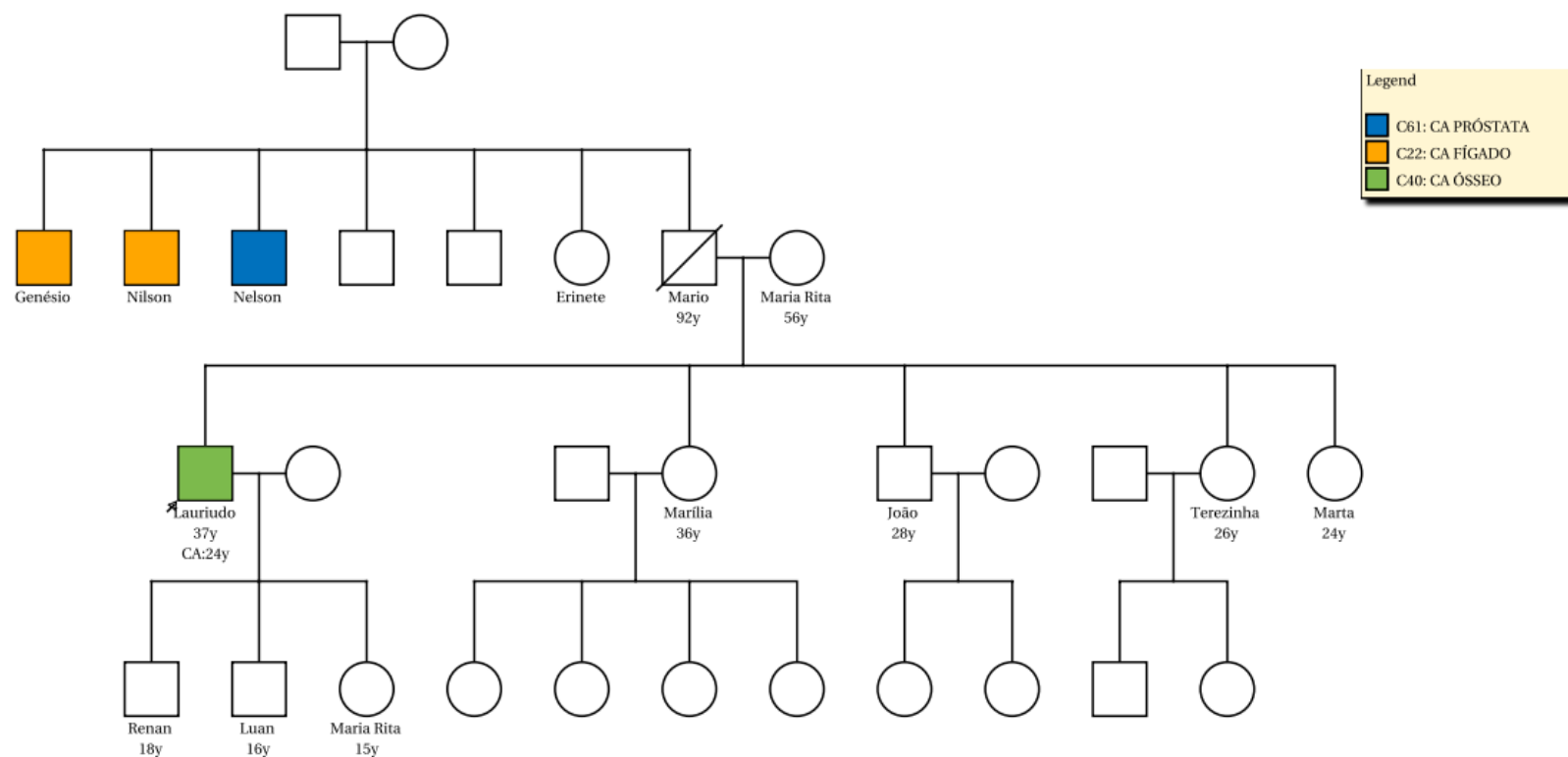


Figura 12: Heredograma do paciente 7A. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 9A Tumor do sistema nervoso central na infância (36 anos) e Parente de segundo grau com câncer antes dos 46 anos e parente com múltiplos tumores primários em qualquer idade (Figura 15).

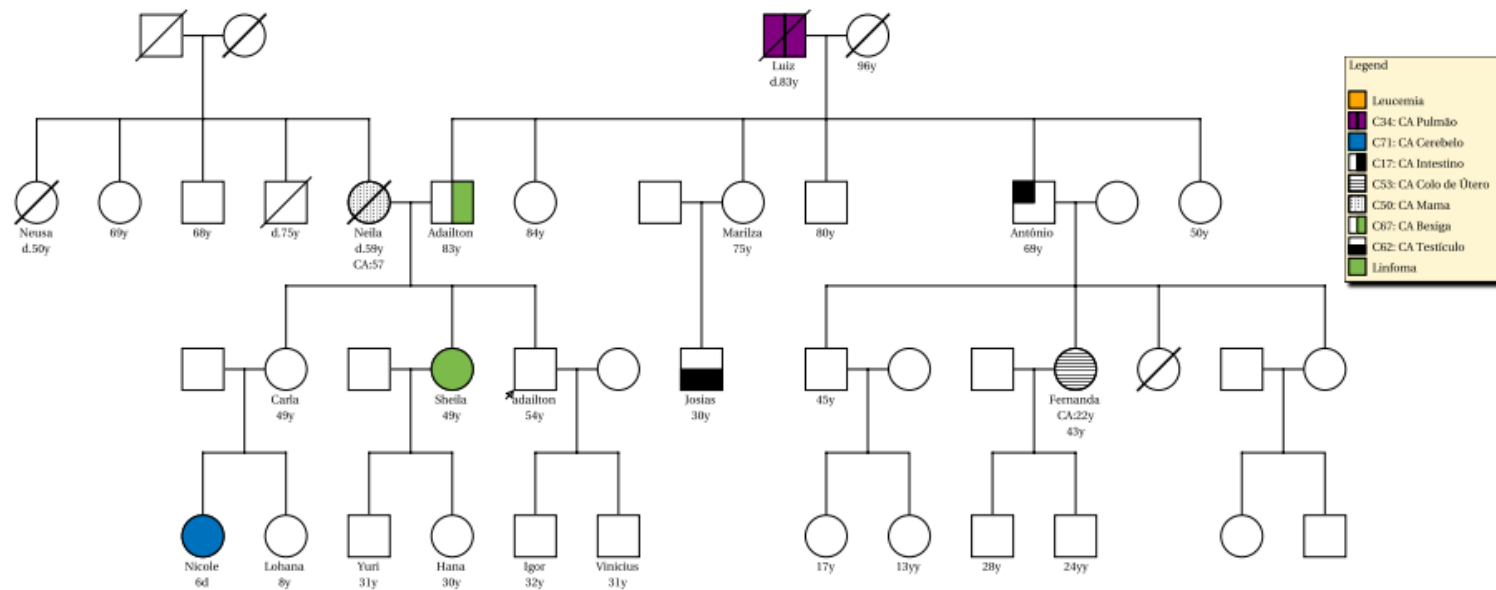


Figura 13: Heredograma do paciente 9A. O paciente índice não é portador de tumor, apresenta uma irmão acometida por linfoma aos 49 anos, um primo com tumor de testículo aos 30 anos, uma prima com câncer de útero aos 22 anos, sobrinha com tumor de SNC aos 6 anos, pai com tumor de bexiga e tio paterno com dois tumores distintos (Intestino 55anos e leucemia 69 anos) o avô paterno teve tumor de pulmão aos 83 anos, sendo fumante. O paciente-índice indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Família 11 A, Com sarcoma antes dos 45 anos, parente de 2º grau com CA de SNC e mama antes dos 45 anos e 3 parente de 2º grau com CA antes dos 60 anos . (Figura 17).

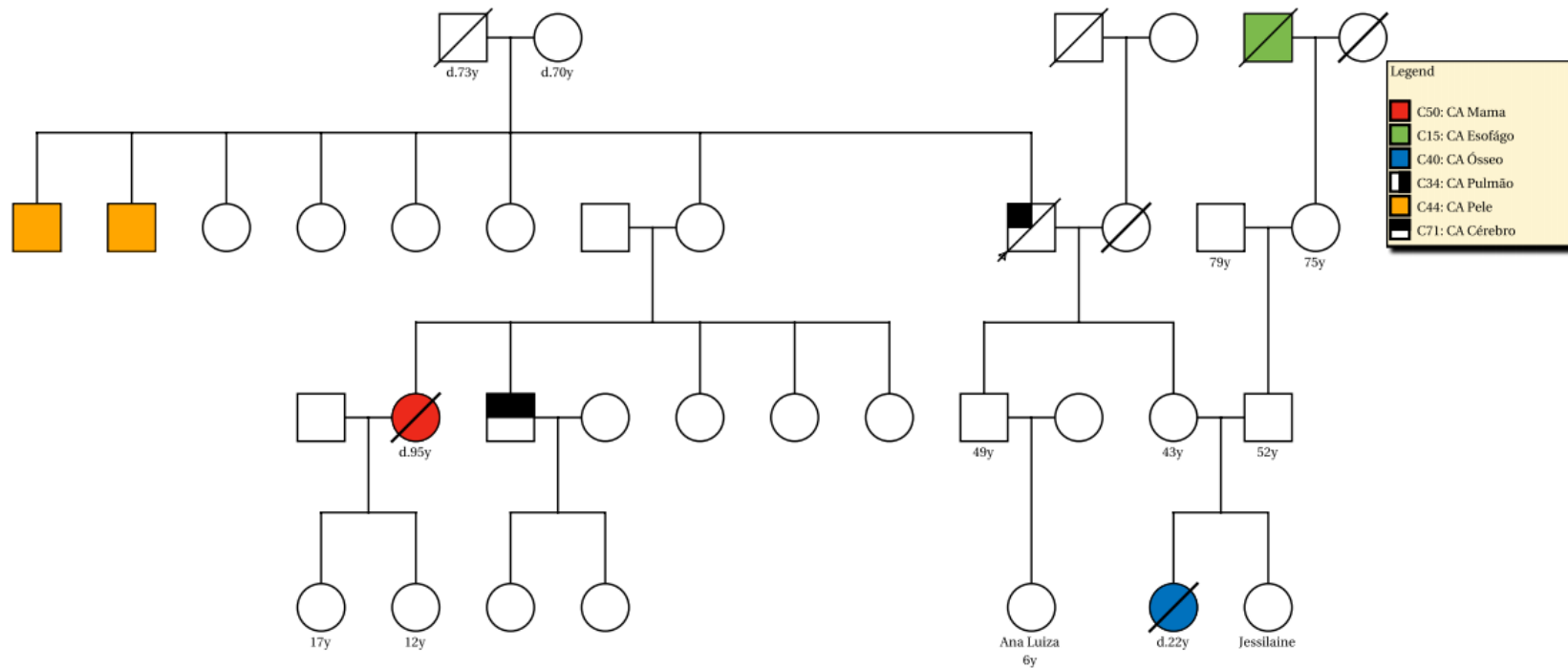


Figura 14: Heredograma do paciente 11A. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 12 A, Apresenta Sarcoma em idade jovem (29 anos) , e parente de segundo grau com CA de mama antes dos 45 anos e parente com CA antes dos 60 anos .(mama com 39 anos e outro com 42 anos). (Figura 18).

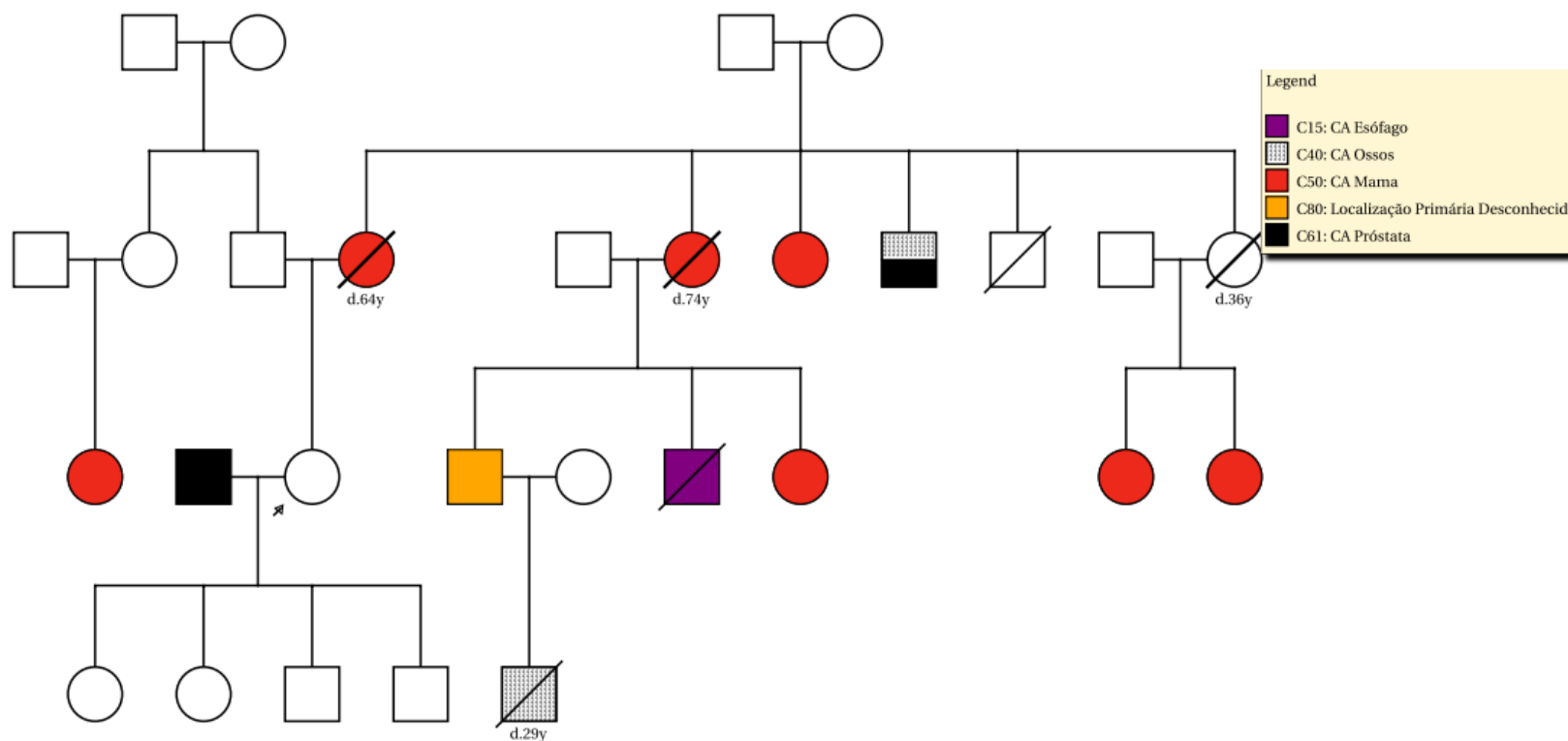


Figura 15: Heredograma da família 12 A. A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

A família 13 A apresenta sarcoma antes dos 45 anos, e parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente de primeiro ou segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parentes com sarcoma em idades diferentes (<45 anos) (Figura 19).

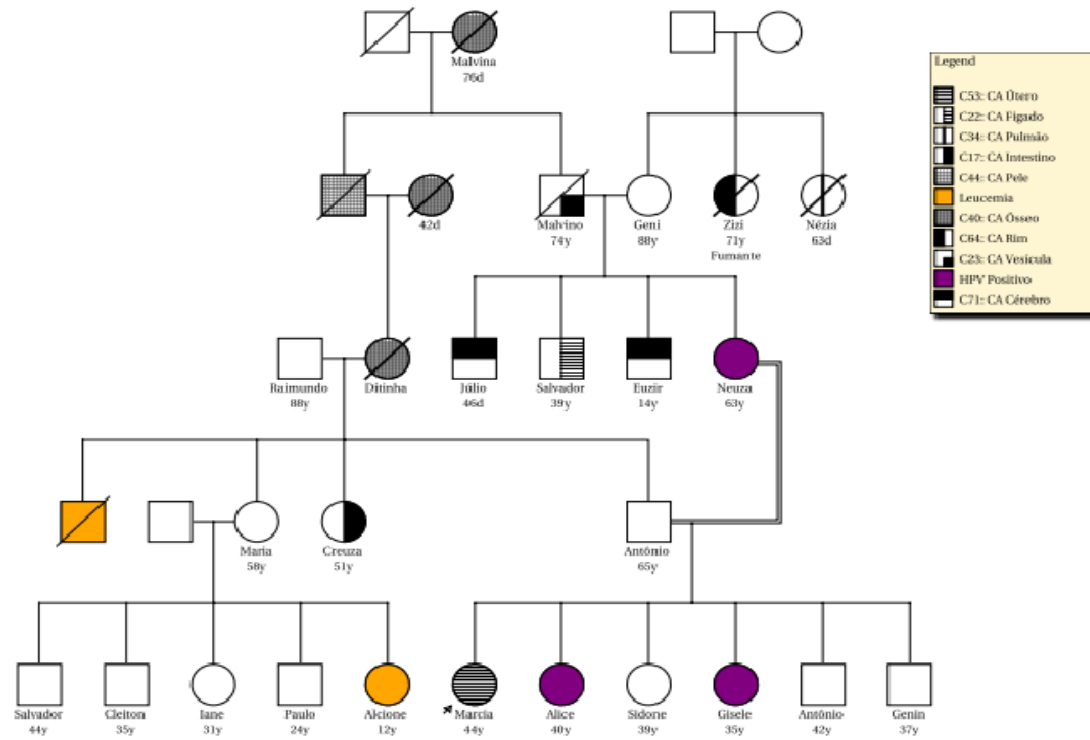


Figura 16: Heredograma da 13 A. A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 14A Apresenta presença de dois parentes de primeiro grau com tumor típico em qualquer idade (tumor SNC- 52 anos , melanoma 59 anos). (Figura 20).

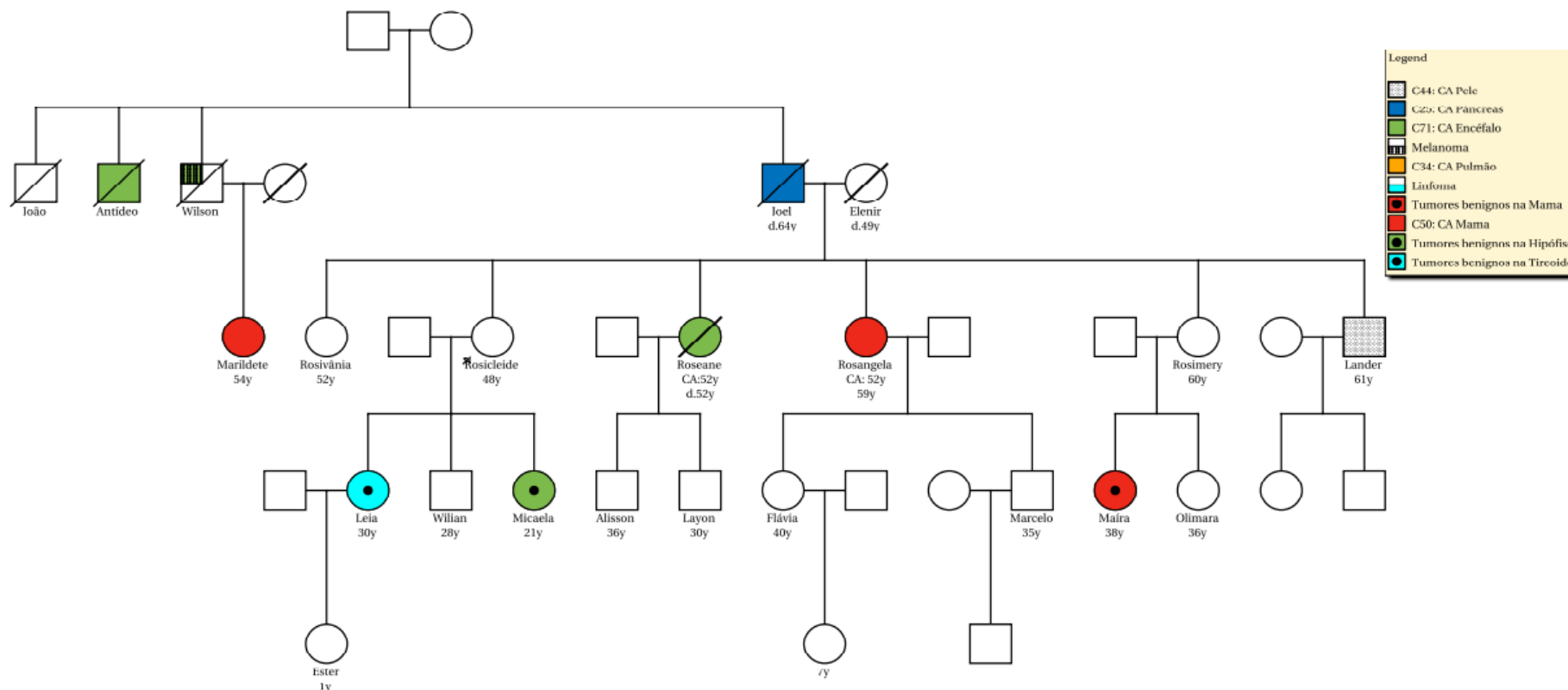


Figura 17: Heredograma da família 14 A. A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

A família 15 A . Apresentando Presença de dois parentes de primeiro ou segundo grau com tumor típico em qualquer idade (câncer de mama. (Figura 21).

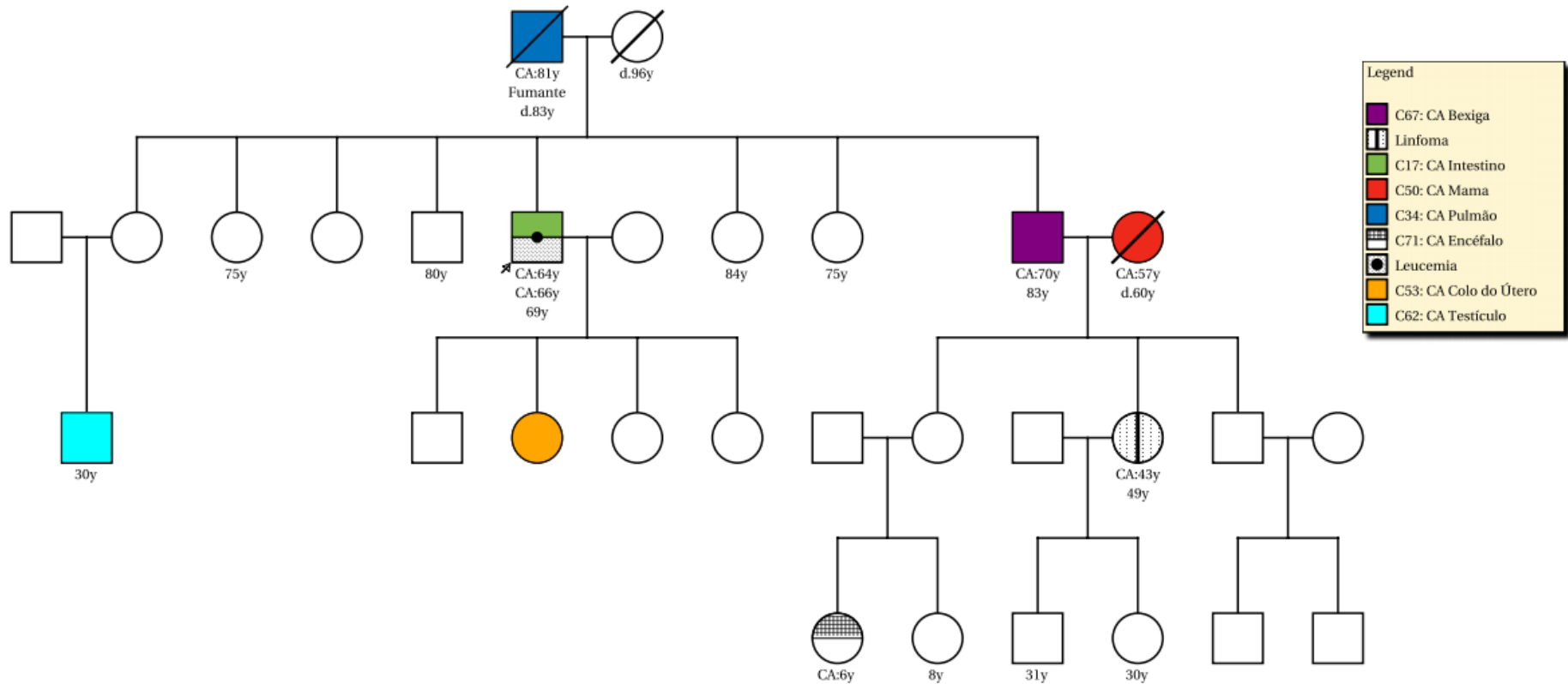


Figura 18: Heredograma da família 15 A. O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Família 17 A. Câncer na infância e parente de segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (CA de mama) e parente segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos. (Figura 23).

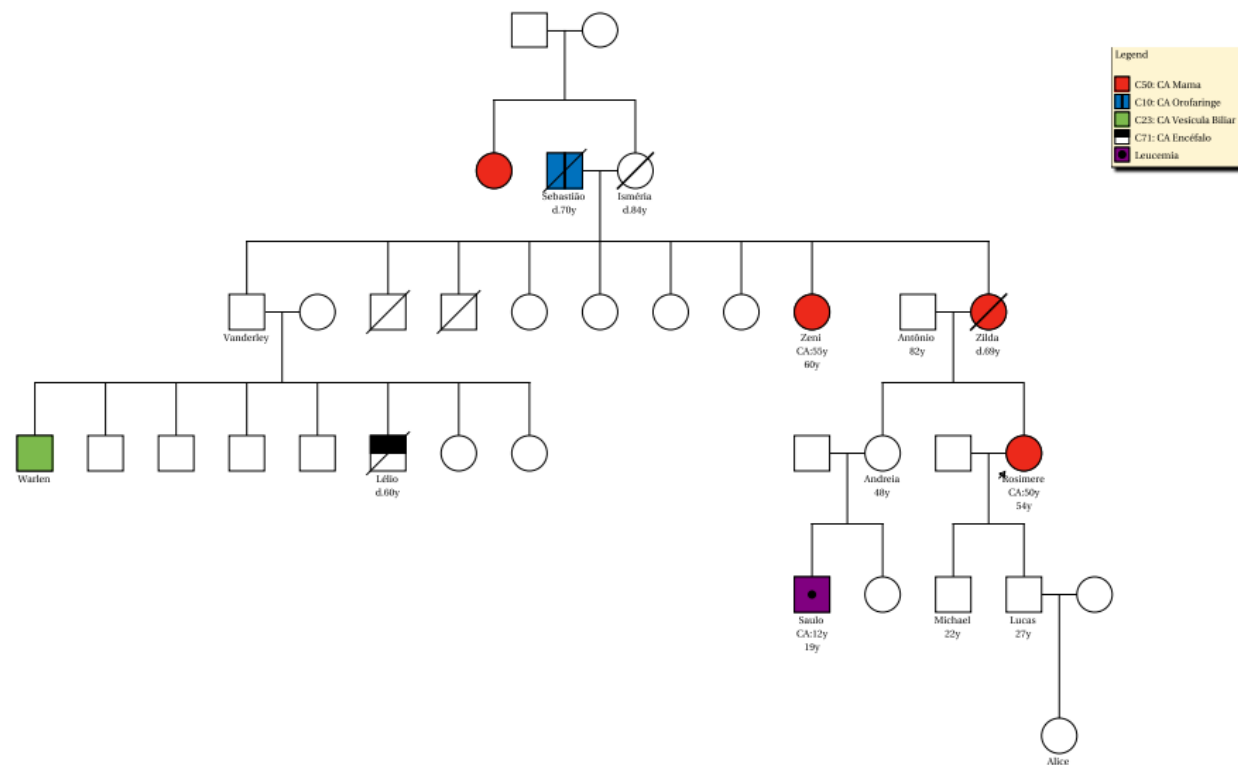


Figura 19: Heredograma da família 17A. A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na Família 18A. Probando e acometido por osteosarcoma mandibular (Neoplasia mesenquimal maligna, osteosarcoma clássico condroblástico) aos 19 anos (Figura 24).

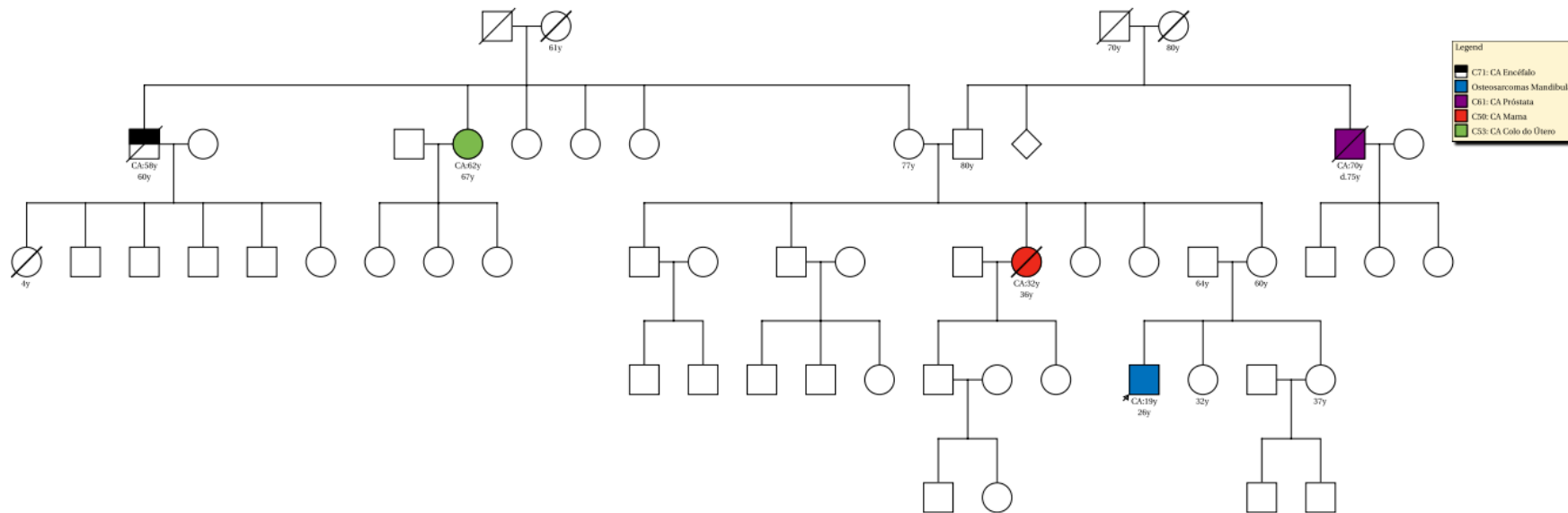


Figura 20: Heredograma da família 18A . O paciente-índice está indicado por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Família 19A Presença de 3 sarcomas em idade jovem (3 diferentes gerações-(sarcoma antes dos 45 anos e segundo grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni -sarcoma, qualquer idade e parente de segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos – Sarcoma (Figura 25).

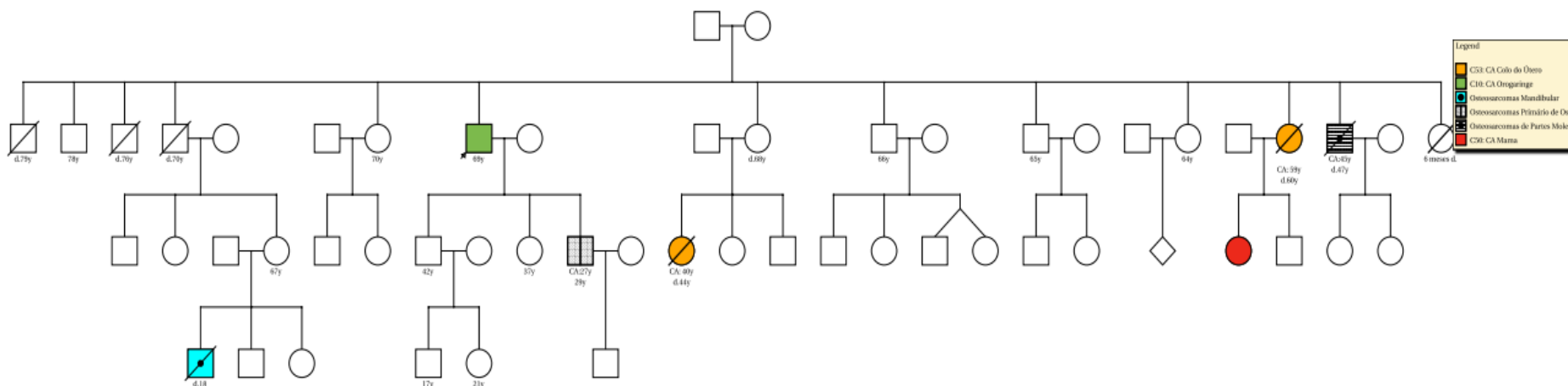


Figura 21: A paciente-índice está indicada por uma seta. E padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

A família 25A Sarcoma em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente de primeiro grau com qualquer câncer em (antes dos 45 anos) e parente de primeiro grau com sarcoma antes dos 60 anos. (Figura 28).

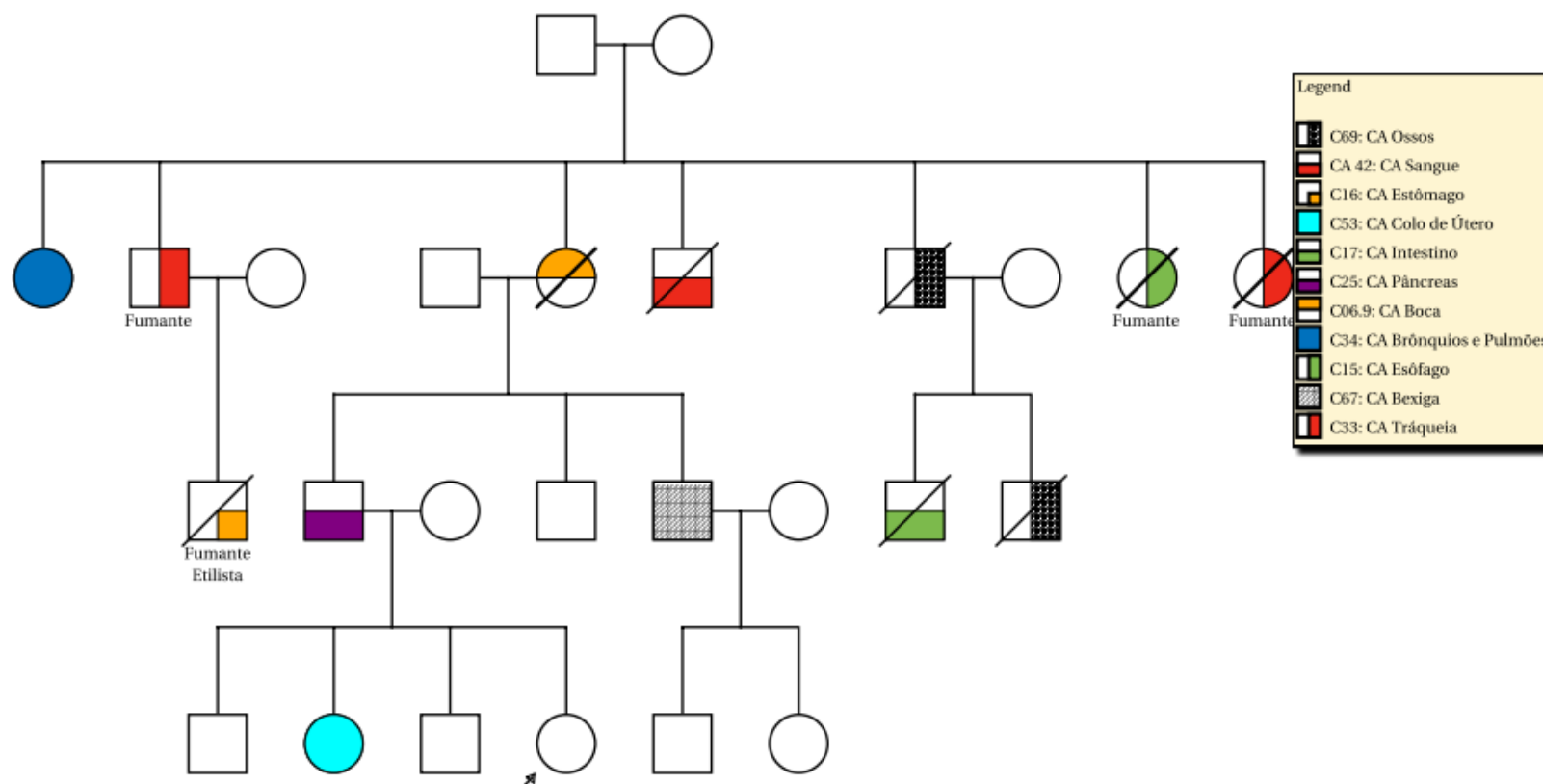


Figura 22: Heredograma da família 25 A. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma.

Na família 26A. Sarcoma idade jovem (antes dos 45 anos) e parente de segundo grau com qualquer câncer em idade jovem (mama <45 anos) e Parente segundo grau com diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) (Figura 29).

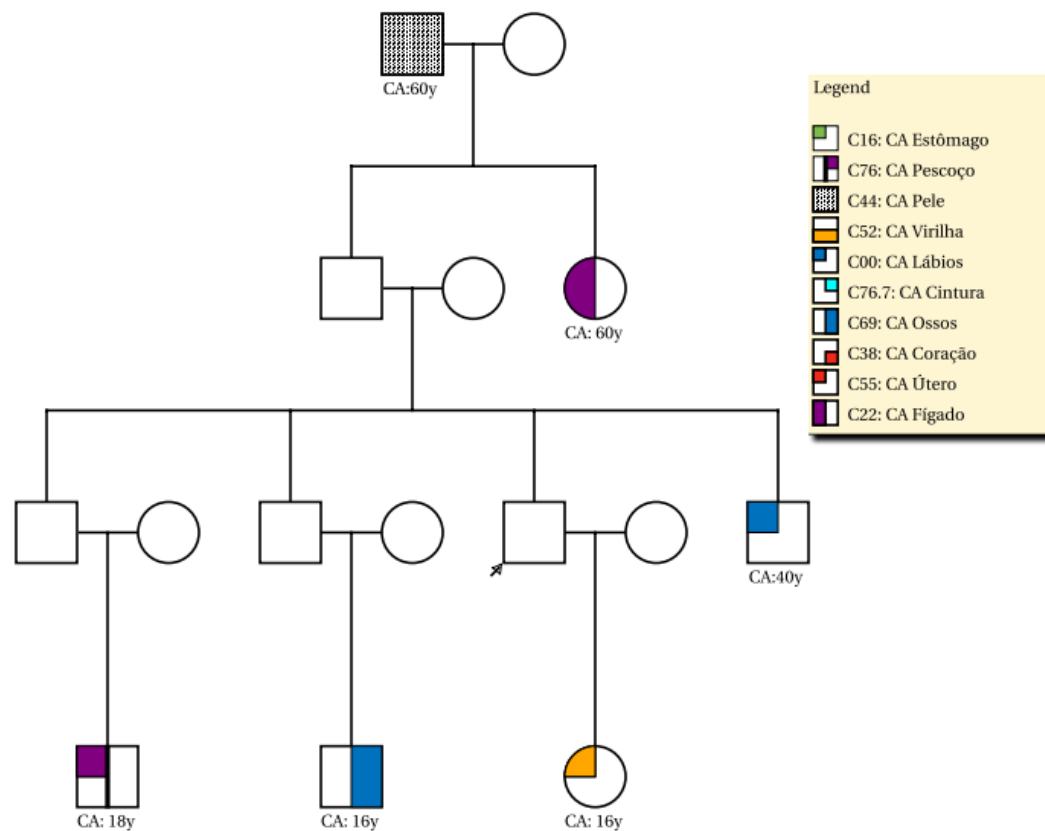


Figura 23: Heredograma da família 26 A. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 27A . Sarcoma idade jovem (antes dos 45 anos), e parente de segundo grau com câncer de mama, e segundo grau com qualquer câncer antes dos 60 anos. (Figura 30).

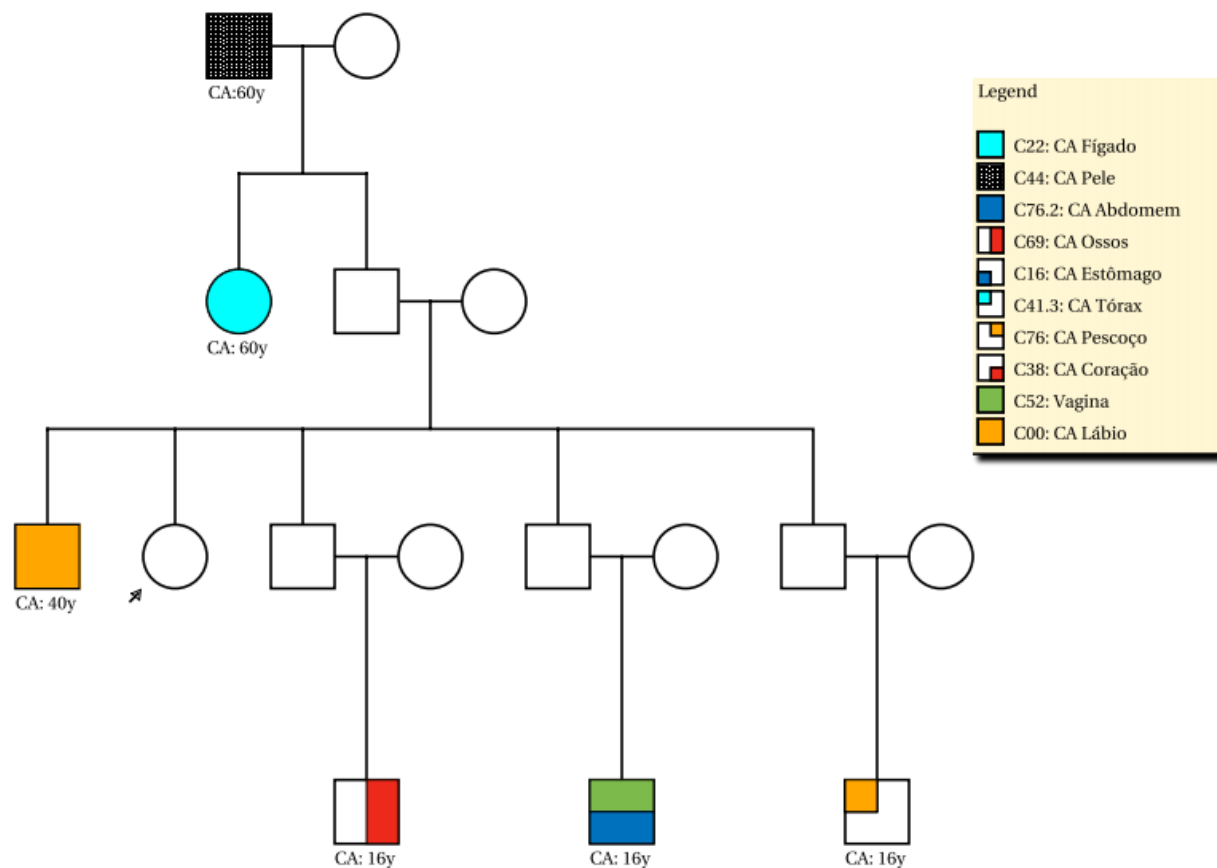


Figura 24: heredograma da família 27 A. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 29A observamos câncer ósseo e de mama em idade jovem, e um tumor de boca (paciente se declara não tabagista e não etilista) (Figura 32).

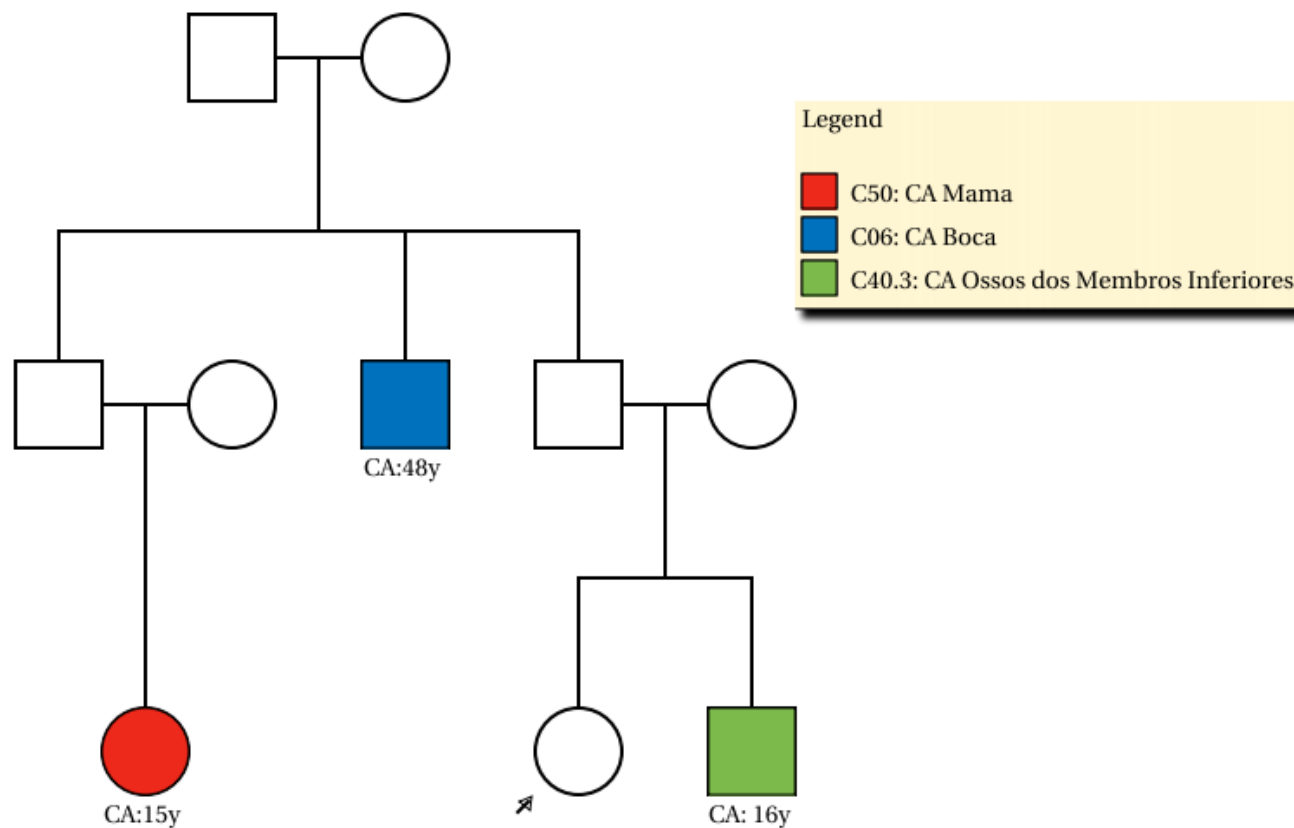


Figura 25: Heredograma 29 A. Probando não portador de tumor. Familiares com tumor em idade jovem. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Na família 30A. Sarcoma no probando com dois tumores nos parentes um câncer de mama <50 anos e tumor SNC 45 anos (<60 anos) (Figura 33).

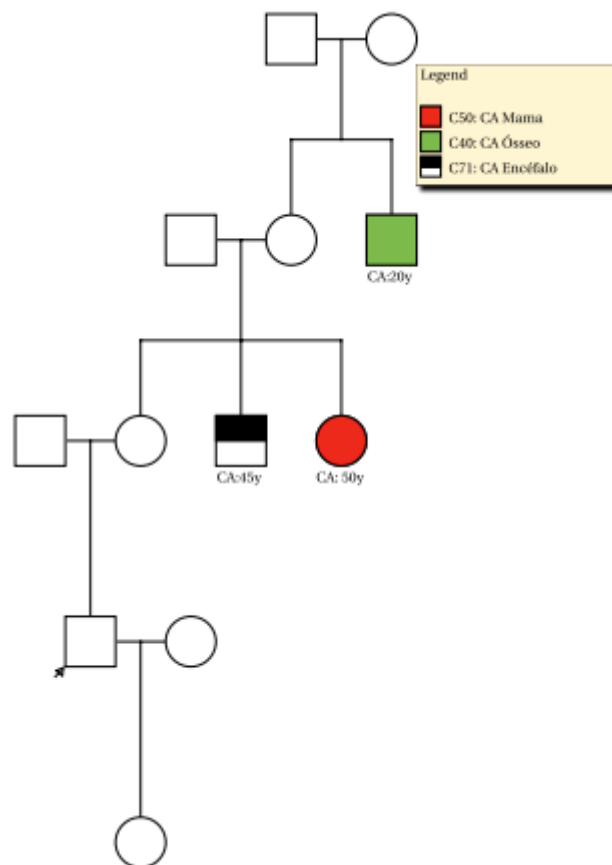


Figura 26: heredograma da família 30 A. Probando sem tumor e familiares com tumores ósseo, de mama e SNC. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Família 33A Sarcoma em idade jovem e parente de 2º grau com tumor típico de Li- Fraumeni com Ca mama antes dos 45 anos, e parente se 2º grau com CA antes dos 60 anos (leucemia) .(Figura 36).

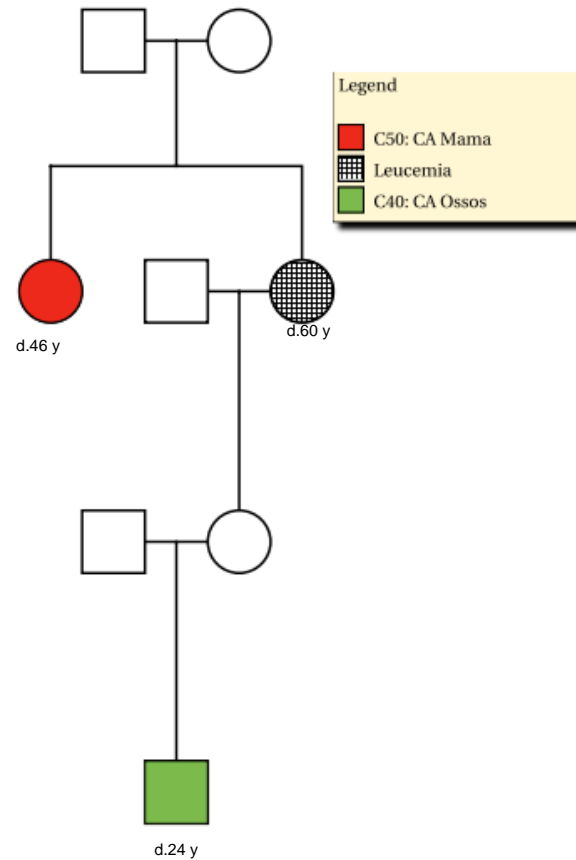


Figura 27: Heredograma da família 33 A. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 1B: Sarcoma, antes dos 36 anos e parente de segundo grau com câncer antes dos 46 anos. (Figura 37).

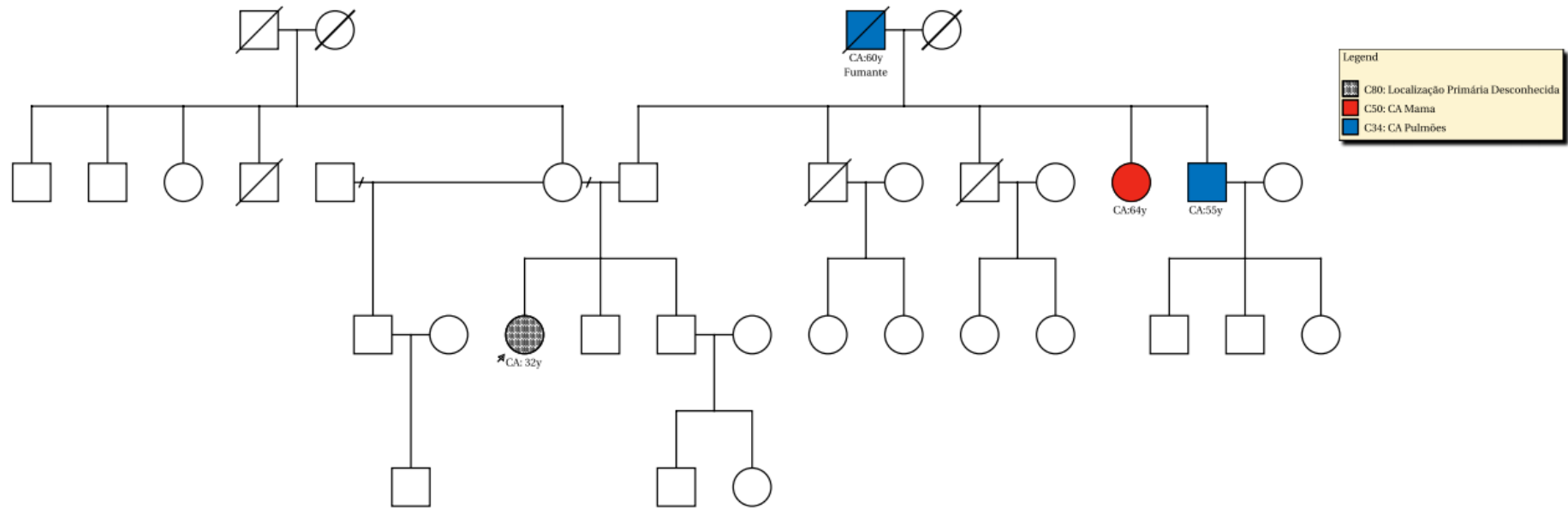


Figura 28: Heredograma da família 1B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 6B: Câncer na infância, 2 parentes de segundo grau com CA de mama com idade jovem .

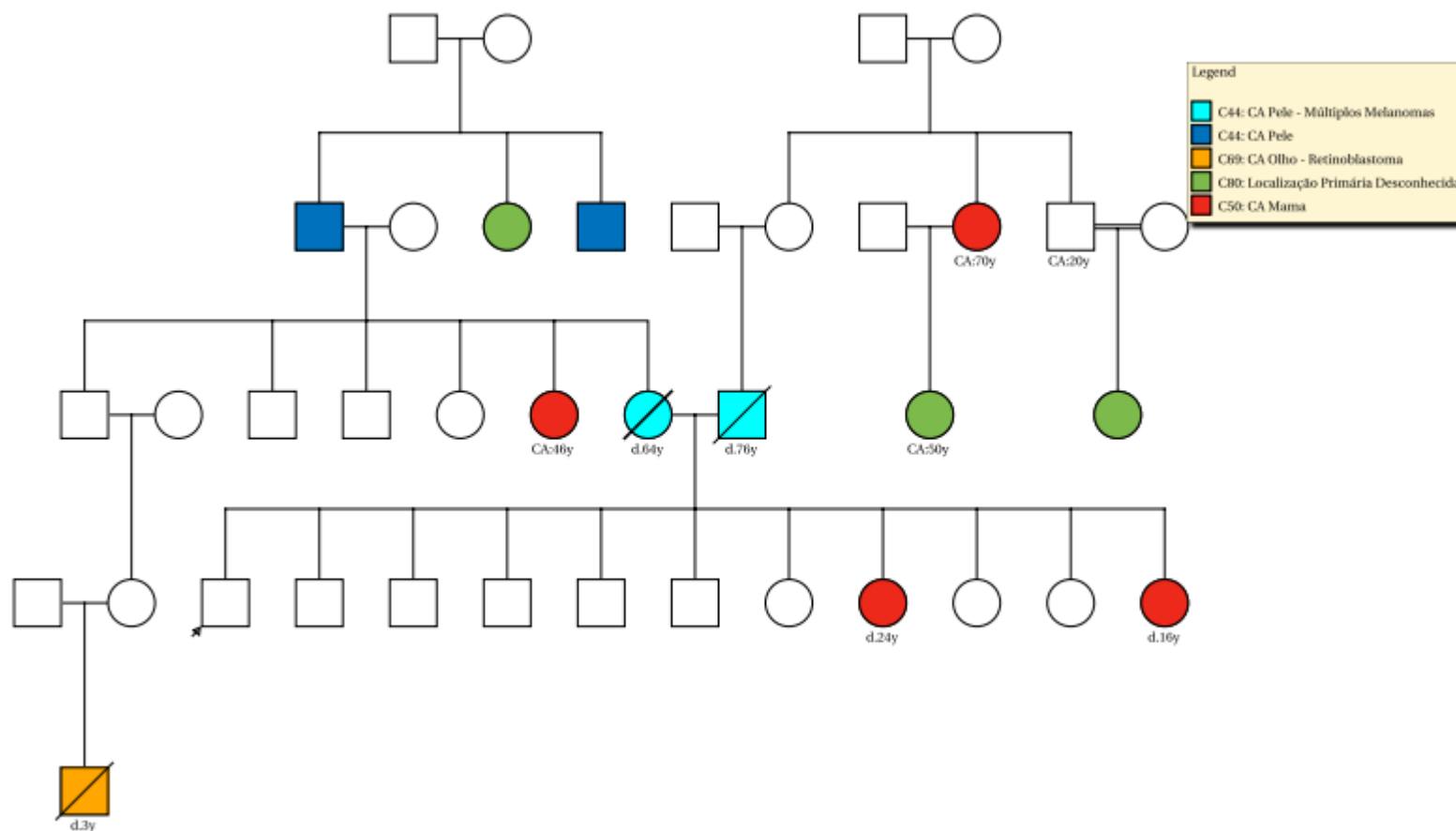


Figura 29: Heredograma da família 6B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 11B: Câncer adrenocortical em qualquer idade e independente da história familiar.

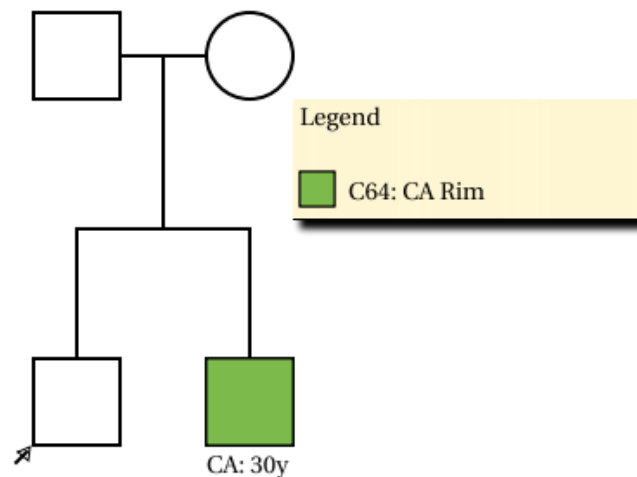


Figura 30: Heredograma da família 11B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 13B: 3 gerações com sarcoma, Sarcoma em idade jovem , sarcoma antes dos 45 anos e sarcoma antes dos 60 anos .

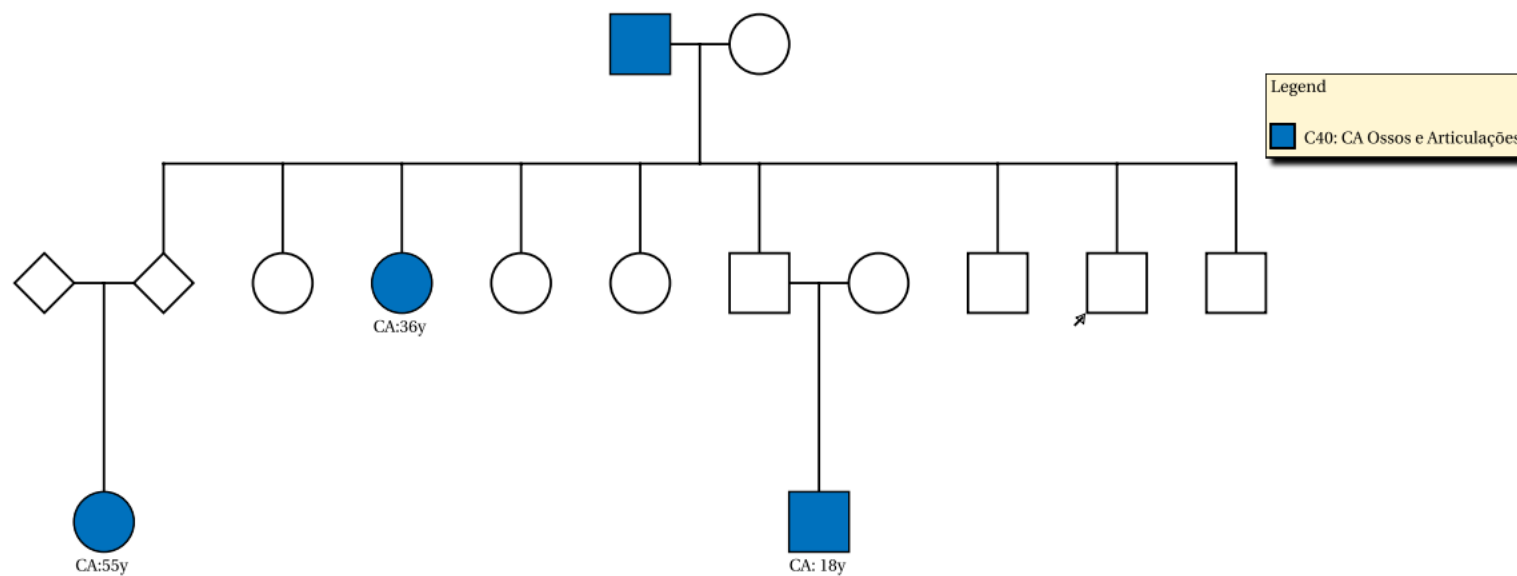


Figura 31: Heredograma da família 13B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 14B: Sarcoma em idade jovem (16 anos), parente de segundo grau com sarcoma antes dos 45 anos e parente de segundo grau com CA antes dos 60 anos.

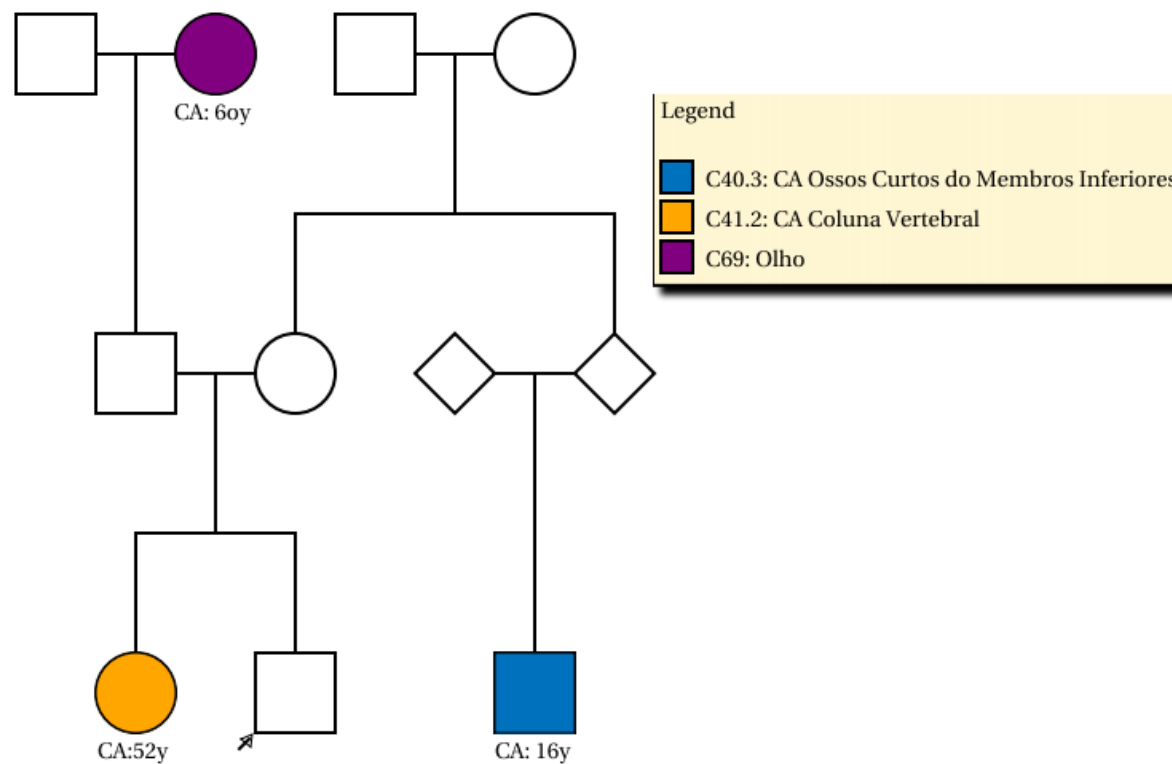


Figura 32: Heredograma da família 14B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 16B: Sistema Nervoso e parente de 1º grau com CA (Leucemia).

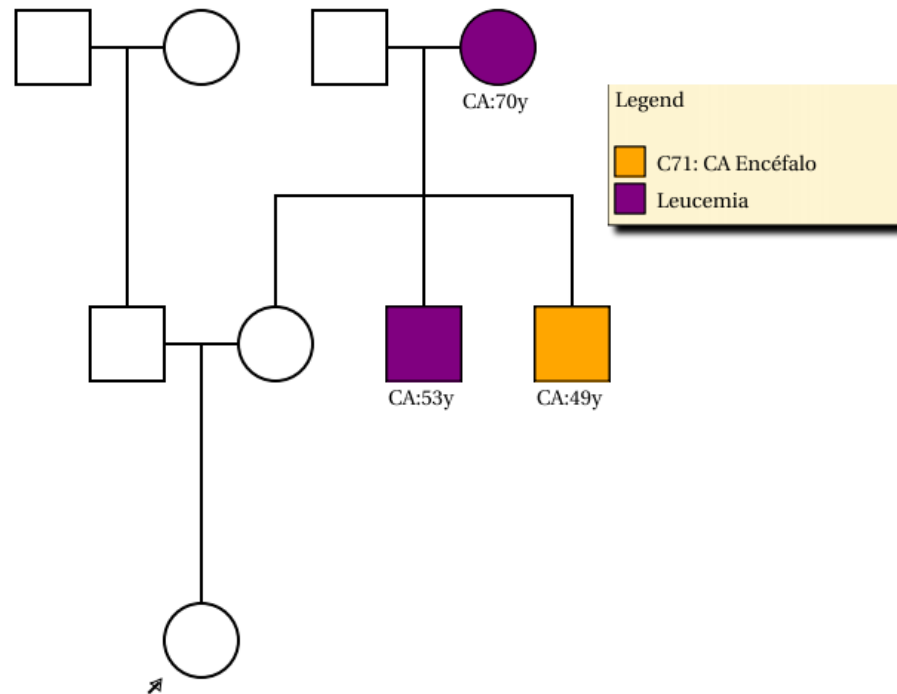


Figura 33: Heredograma da família 16B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 17B: Mama < 45 anos e parente de 1º grau <46 anos.

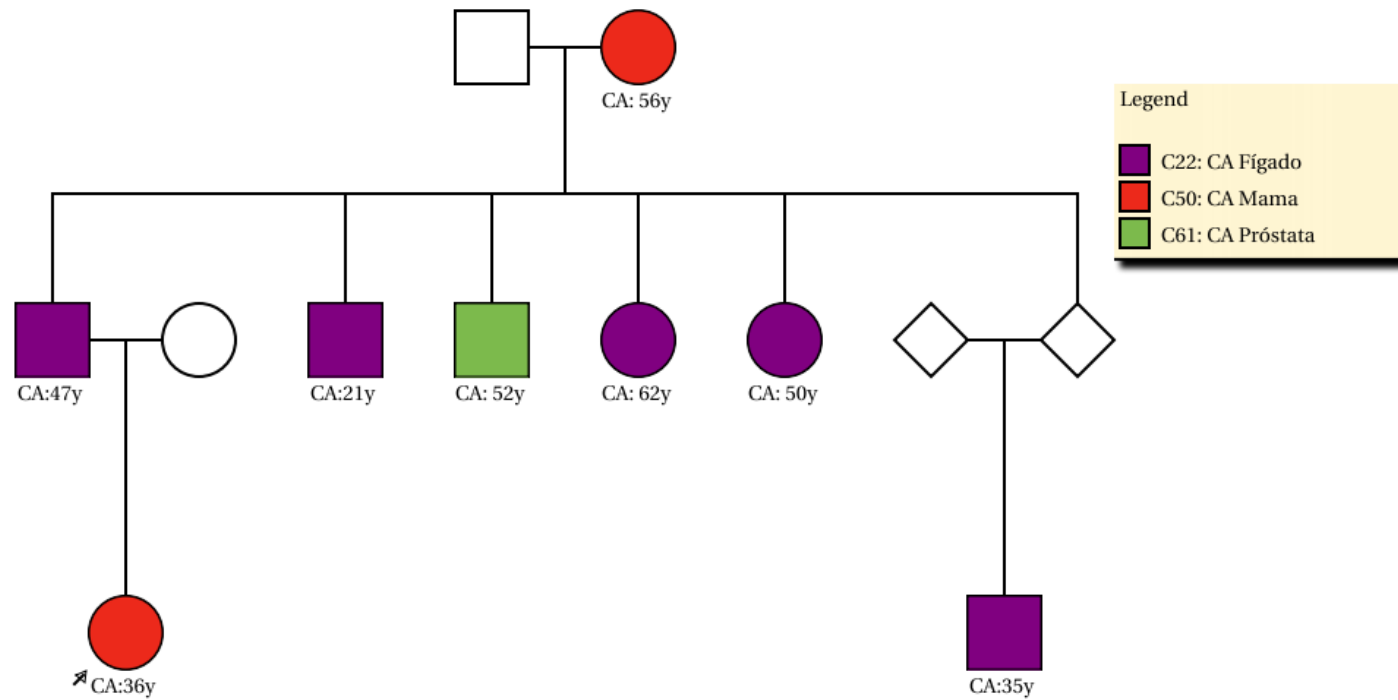


Figura 34: Heredograma da família 17B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 18B: Sarcoma na Infância e parente de 2º grau com qualquer câncer em idade jovem (<45 anos) e parente de segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (<45 anos).

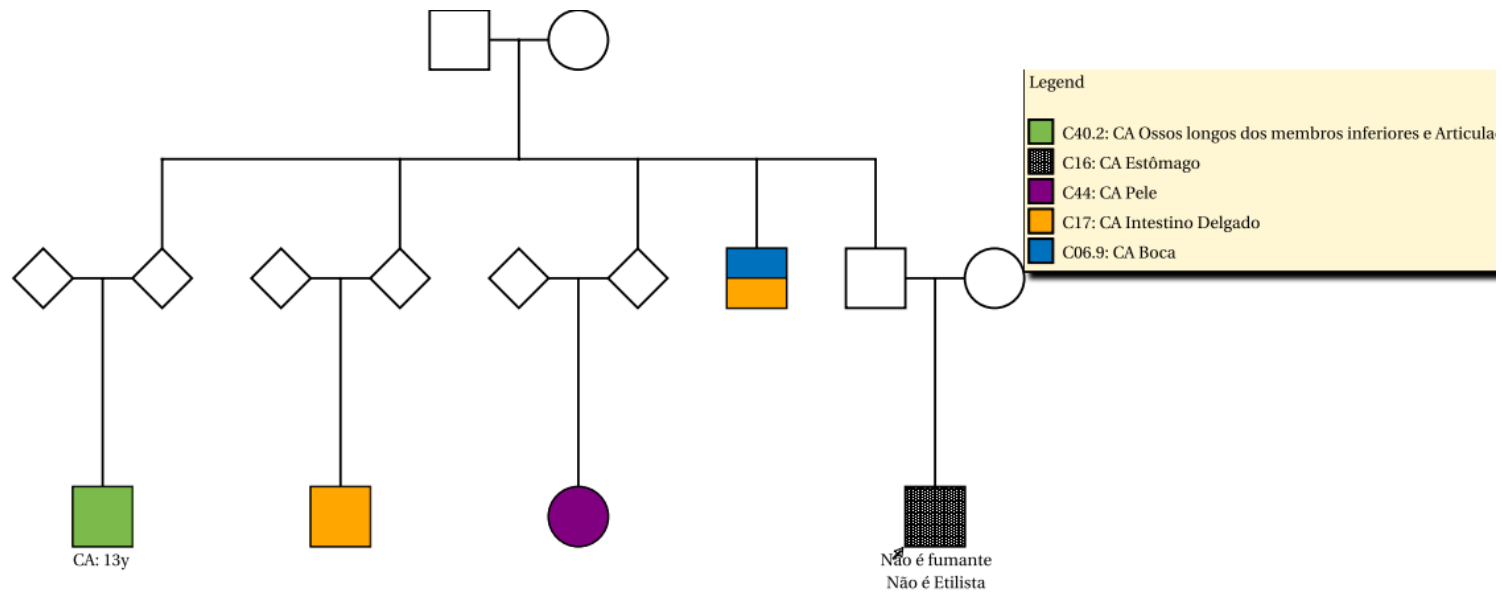


Figura 35: Heredograma da família 18B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 22B: Sarcoma na infância (antes dos 45 anos) e Parente de 2º grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente com sarcoma em qualquer idade.

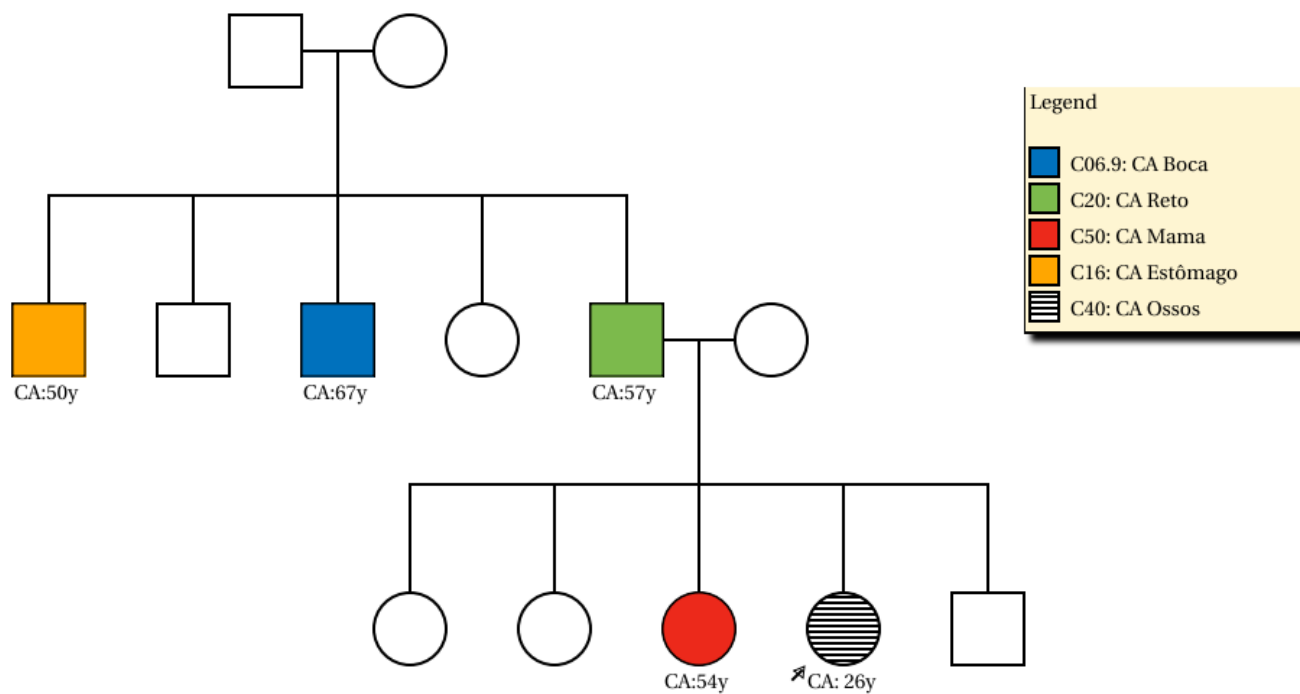


Figura 36: Heredograma da família 22B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 23B: Sarcoma na infância (antes dos 45 anos) e Parente de 2º grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente segundo grau que tenha o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente com sarcoma em qualquer idade.

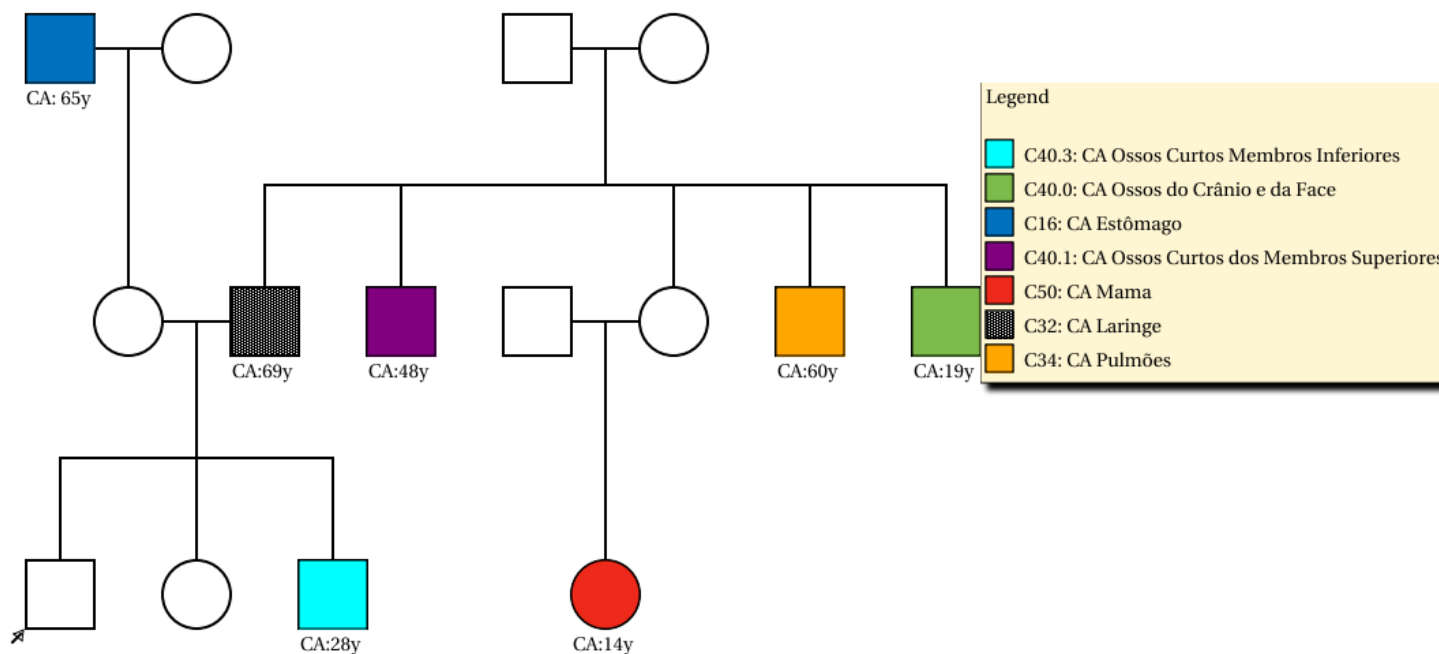


Figura 37: Heredograma da família 23B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 26B: Câncer na infância e parente de primeiro grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (câncer de mama) em qualquer idade e Parente de 1º grau com qualquer câncer (mama) antes dos 60 anos.

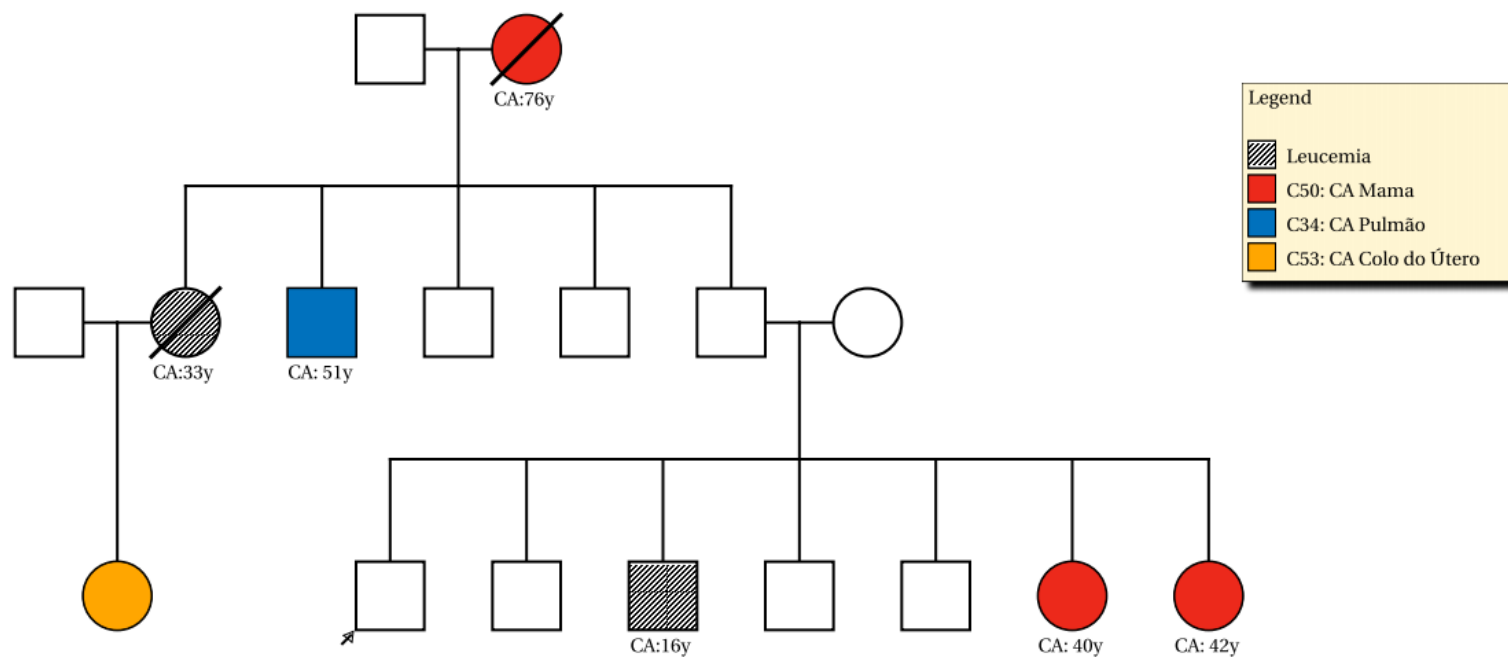


Figura 38: Heredograma da família 26B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 32B: Tumor do sistema nervoso central antes dos 45 anos e parente de primeiro grau com câncer típico da Síndrome de Li-Fraumeni (câncer de mama) em qualquer idade antes dos 45 anos.

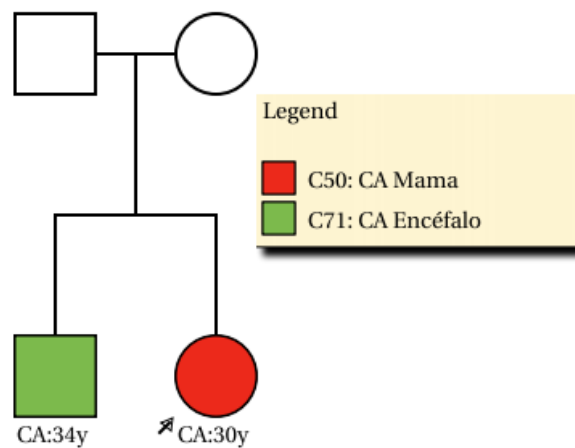


Figura 39: Heredograma da família 32B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 33A . Sarcoma em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente de primeiro grau com qualquer câncer em idade jovem (antes dos 45 anos) e parente de primeiro ou segundo grau com o diagnóstico de câncer em idade jovem (antes dos 45 anos).

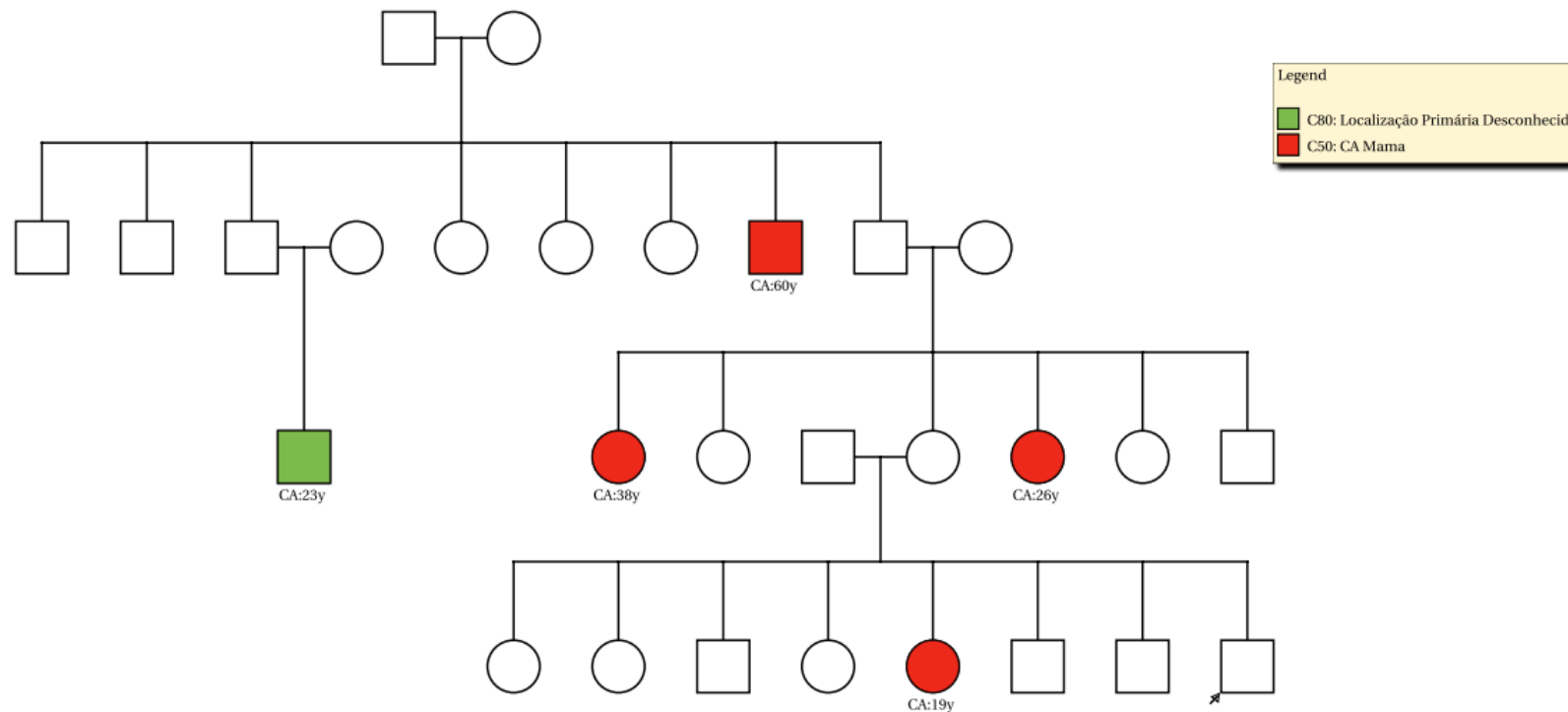


Figura 40: Heredograma da família 33B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 37B: Presença de dois parentes de segundo grau com tumor típico em qualquer idade (tumor SNC e CA mama).

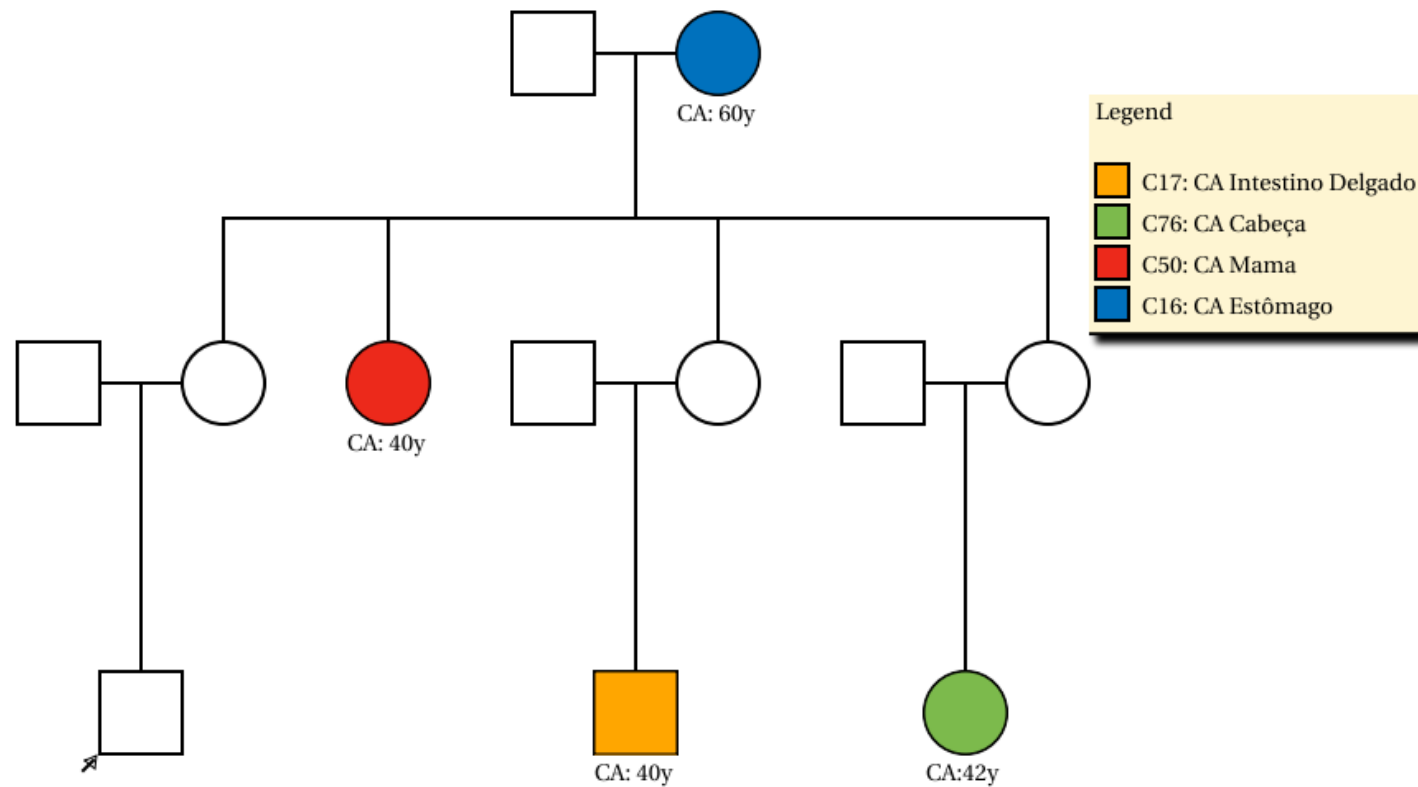


Figura 41: Heredograma da família 37B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 38B: Presença de dois parentes de segundo grau com tumor típico em qualquer idade (sarcoma, câncer de mama).

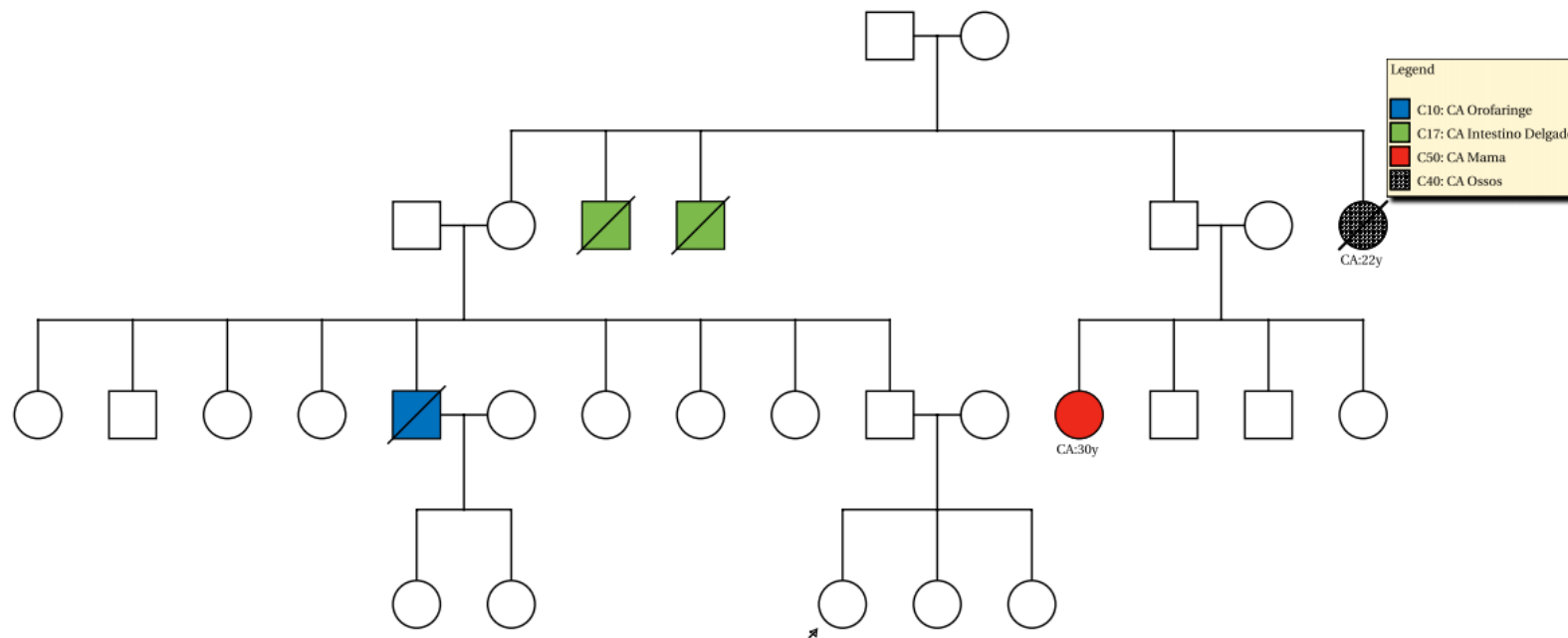


Figura 42: Heredograma da família 38B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

Heredograma 39B: Apresenta probando com tumor ósseo antes do 45 anos, e Parente de 1o grau com tumor do grupo Li- Fraumeni antes dos 45 anos.

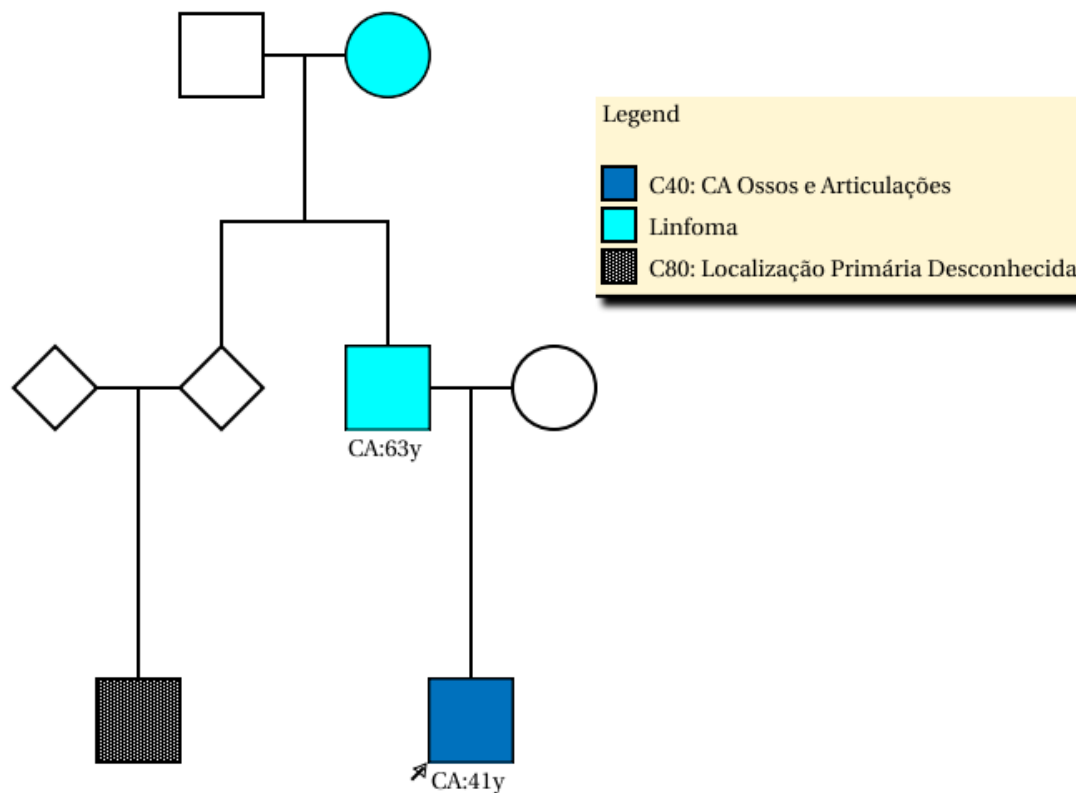


Figura 43: Heredograma da família 39B. Padrão de tumores identificado de acordo com legenda em anexo ao heredograma. A primeira informação abaixo do símbolo é a idade de acometimento do tumor.

4.3 Resultados da avaliação da mutação R337H

O resultado da análise da mutação R337H, avaliadas através de gel de identificação mostrou que das 34 famílias selecionadas para análise, nenhuma apresentava o padrão de bandas compatível com a mutação do “Efeito Fundador” R337H.

5.4 Resultado da avaliação molecular

O resultado da avaliação do painel de 20 genes não evidenciou nenhuma alteração descrita na literatura para câncer.

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho foi estudada a população com câncer da região do Caparaó Capixaba no intuito de identificar as principais síndromes hereditárias encontradas nas famílias residentes na região. Desta forma foram identificados tumores em 284 indivíduos provenientes de 66 famílias.

Este é um estudo pioneiro na região e no Estado e como resultado direto foi obtida a identificação das 66 famílias que desconheciam a doença na forma hereditária. Este dado por si só é bastante importante, pois já a partir da identificação clínica, mesmo antes da identificação molecular da doença, as famílias foram encaminhadas para acompanhamento clínico preventivo.

A proposta utilizou um conjunto de metodologias descritas na literatura para detecção de câncer nas famílias e criou para o rastreamento um fluxograma próprio para triagens populacionais, este método foi importante para o sucesso da identificação dos casos. A metodologia contou com profissionais das unidades de saúde, especialmente na atuação do agente comunitário de saúde que vivencia o dia-a-dia das famílias e que foi treinado na identificação dos casos de câncer hereditário. Este é um profissional que tem um contato direto com os indivíduos que pertencem a sua área de atuação com facilidade em reconhecer os casos.

Foram utilizados na seleção das famílias avaliadas critérios flexíveis de identificação das síndromes hereditárias de câncer, permitindo a avaliação de um maior número de famílias. Os critérios empregados para o diagnóstico da SLF e LFL foram quatro: o critério clássico, inicialmente proposto por LI e FRAUMENI (1969), o critério de Birch e colaboradores (1994), mais frequentemente utilizado na identificação da LFL, o critério de Eeles (E1 e E2) (1995), que caracteriza famílias LFL, mas que é pouco utilizado devido à baixa taxa de detecção de mutações (VARLEY et al., 2002). Os critérios de Chompret (2002) utilizados apesar de serem parcialmente semelhantes aos critérios anteriores. Sendo assim, os critérios empregados foram amplos, porém bem delimitados, visando à inclusão do maior número de famílias com o perfil SLF/LFL para o posterior teste molecular. Entre as famílias selecionadas para este estudo 34 preencheram os critérios de SLF.

Devido ao grande número de famílias identificadas, os dados obtidos são indicativos da necessidade de uma avaliação de um possível “Efeito do Fundador” na região. Mutações com efeito do fundador foram encontradas e descritas em várias partes do mundo com diferentes síndromes hereditárias e com desfechos muito significativos para as populações avaliadas (EWALD et al., 2008).

Classicamente o estudo do efeito do fundador da síndrome de Huntington na região do Lago Maracaibo na Venezuela, com grande isolamento geográfico, abriu precedentes para pesquisas deste tipo em todo o mundo e foi modelo na identificação da causa da doença. Essa identificação demorou cerca de 10 anos devido ao emprego de técnicas de análise de ligação utilizadas na época sem os estudos moleculares mais apurados e rápidos de hoje (GIL-MOHAPEL; REGO, 2011). No entanto, a doença de Huntington é de difícil prevenção e o teste molecular possui uma faixa de identificação borderline que traz dúvida do aparecimento da doença o que dificulta o aconselhamento genético dos casos.

No Brasil estudos com câncer hereditário na região do Paraná abriram perspectivas para cuidados, tratamento e identificação de portadores da mutação R337H de tal forma que, atualmente esta mutação é averiguada no teste do pezinho em todos os indivíduos do Estado, dada a importância da descoberta (CUSTÓDIO et al., 2013).

De fato, a detecção de portadores de mutações para doenças passíveis de prevenção ou detecção precoce é muito importante, pois os identificados podem ter um acompanhamento de saúde mais apropriado, com antecipação da idade dos exames preventivos recomendados. Como por exemplo, na prevenção de câncer de mama, na qual é recomendada a mamografia a partir dos 40 anos, em portadores de câncer de mama e ovário hereditários a recomendação é de mamografia a partir dos 36 anos e adição de outros exames como o de ultrassonografia e ressonância magnética em casos específicos. Recomendações semelhantes de antecipação da idade de início de exames também são feitas para outras síndromes, como a de Lynch e de Li-Fraumeni.

Em relação à distribuição geográfica e o aparecimento da doença, entre os 11 municípios da região do Caparaó, Alegre foi a cidade onde foi observado maior quantidade de famílias acometidas por câncer com características hereditárias,

seguida de Muniz Freire e Ibatiba. Nesse caso é importante ressaltar a diferença populacional, que está consonante com os dados encontrados. Porém, a cidade de Dores do Rio Preto contribuiu com 10% da amostra do estudo e possui uma das menores populações entre os municípios estudados.

Uma análise crítica dos dados nos permite dizer que o trabalho investigou mais ativamente as cidades de Alegre, Muniz Freire e Dores do Rio Preto onde foram encontrados números maiores de famílias, mostrando que essa realidade de câncer familiar na região pode ser ainda maior.

Em relação à distribuição dos tipos tumorais em análise conjunta de todas as famílias avaliadas na proposta a partir dos dados dispostos na Tabela 6, fica mais clara a relação dos tipos tumorais com a compatibilidade com a síndrome de Li-Fraumeni ou Li-Fraumeni Like. Desta forma, observa-se um grande número de tumores de mama, estômago, colorretal, sarcomas, sistema nervoso central, pulmão e leucemias e linfomas, a maioria dos tumores são raros na população sem história familiar.

Um ponto interessante observado em nossos heredogramas sugestivos de SLF e LFL é a antecipação genética, na qual a cada geração a doença aparece mais precocemente. Essa é uma característica de doença hereditária e fica mais evidente quando se faz a média de idades de aparecimento da doença nas gerações. Nossos dados mostram que a média de idades é maior nas primeiras gerações e menor nas últimas.

Os dados da prevalência, de antecipação genética, das características da síndrome, somados à questão geográfica de isolamento direcionam a pesquisa para a presença de um efeito do fundador, possivelmente uma mutação específica da região, provavelmente trazida por um imigrante que se instalou na região em tempos remotos.

Desta forma é importante a investigação das causas da presença da doença na região, da detecção da mutação e do efeito fundador para a realização da prevenção da doença e diminuição dos custos pessoais e financeiros decorrentes do aparecimento da doença.

Desta forma as 34 famílias foram avaliadas do ponto de vista molecular da mutação R337H, devido à possibilidade de migração na rota dos tropeiros vindos do Paraná e pelo isolamento geográfico da região. Além disso, e corroborando para tal escolha, a área estudada possui populações de origem europeia, que colonizaram a região. Os dados de origem das famílias foram explorados a partir de perguntas sobre a ascendência e os resultados mostram que a grande maioria das famílias se autodeclararam brancos de origem europeia e apenas uma de origem europeia com indígena.

Os heredogramas foram constituídos a partir de todas as informações referentes aos familiares do probando. Desta forma, foram incluídos todos os familiares que apresentaram tumores malignos, benignos, assim como os familiares saudáveis, provenientes do maior número de gerações possível. Por se tratarem de famílias muito extensas, com muitos indivíduos pertencentes às diversas gerações, em alguns casos não foi possível especificar o número total de indivíduos que formavam cada geração e as idades de alguns acometidos por câncer. Mesmo assim podem ser observados nos heredogramas fenômenos como o de antecipação genética em muitas famílias. Uma análise mais global, levando em conta as famílias que foram informativas (n=9) mostrou o fenômeno da antecipação com a redução média de 15 anos na idade do início da doença, porém uma análise mais detalhada mostra que em algumas famílias essa redução pode chegar a até 30 anos.

Entre os tumores relatados, pouco mais de 39% puderam ser confirmados por meio de relatório médico ou por laudo histopatológico. Esta taxa pode ser considerada alta se for levada em conta a dificuldade de acesso aos registros médicos hospitalares no país e a falta de estrutura e registro da região, além de fatores sociais dos próprios avaliados.

As 34 famílias caracterização clínica compatível com SLF e LFL incluídas neste estudo apresentaram de 1 a 39 membros em média afetados por até 20 tipos diferentes de tumores, além de tumores de origem indeterminada nos casos não informativos.

Os pacientes selecionados nas famílias e submetidos ao exame molecular, 100% tiveram resultados negativos para a mutação R337H (éxon 11), resultados esses confirmados no laboratório de análises clínicas do Hospital Pequeno Príncipe

em Curitiba – PR sob a supervisão do Dr. Bonald Figueiredo. Esses resultados, porém, não descartam a possibilidade dos pacientes triados serem portadores da SLF ou sua variante LFL.

Desta forma, é possível que exista uma mutação específica da região, que não a encontrada no Paraná. Esses dados são reforçados pelo isolamento geográfico, que permanece até os dias atuais e pelas rotas de migração estabelecidas na região por grupos étnicos específicos.

A população em questão necessita de investigação quanto à origem dos tumores devido ao número de famílias envolvidas e também pelo número de jovens acometidos pela doença.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como consideração final, o presente trabalho contribuiu na identificação de 66 famílias em uma região com histórico de isolamento geográfico que compreende 11 cidades do Sul do Espírito Santo. Esta identificação é importante mesmo sem a detecção da causa molecular da doença na região, pois as famílias acometidas já foram encaminhadas para acompanhamento especializado.

De posse dessas informações o presente estudo propõe ainda a realização de triagem oncogenética envolvendo outros genes ou sequenciamento completo dos pacientes envolvidos na proposta. Os dados obtidos levaram ao estudo do efeito do fundador e da caracterização da doença do ponto de vista molecular.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHATZ, M.I.; HAINAUT, P.; ASHTON-PROLLA-PROLLA, P. Highly prevalent *TP53* mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol**, v. 10, p. 920-5, 2006.

ANTONIOU, A.C.; PHAROAH, P.D.; EASTON, D.F.; EVANS, D.G. BRCA1 and BRCA2 cancer risks. **J Clin Oncol**, v. 20, p. 3312-3, 2006.

ARAÚJO, L.H.L. Metástase Gástrica de Câncer de Mama: Relato de caso e revisão da literatura. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 4., 2007.

BAGNARDI, V.; ROTA, M.; BOTTERI, E.; TRAMACERE, I.; ISLAMI, F.; FEDIRKO, V.; SCOTTI, L.; JENAB, M.; TURATI, F.; PASQUALI, E.; PELUCCHI, C.; GALEONE, C.; BELLOCCO, R.; NEGRI, E.; CORRAO, G.; BOFFETTA, P.; LA VECCHIA, C. Alcohol consumption and site-specific cancer risk: a comprehensive dose–response meta-analysis. **British Journal of Cancer**, 112, 580–593. 2015.

BANDES – Banco de Desenvolvimento do Espírito Santo. Diagnóstico Socioeconômico Microrregião Caparaó / Instituto Jones dos Santos Neves, Banco de Desenvolvimento do Espírito Santo (BANDES) e Consórcio do Caparaó, 213p, 2005.

BASU, A. K. DNA damage, mutagenesis and cancer. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 4, 2018.

BERLINGER, J.; FAY, M. A Risk Assessment and Genetic Counseling for Hereditary Breast and Ovarian Cancer: Recommendations of the National Society of Genetic Counselors. **J Genet Counsel**, v.16, p.241-60, 2007.

BIRCH, J.M.; HARTLEY, A.L.; TRICKER, K.J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A.M. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res.**, v. 5, p. 1298-304, 1994.

BOUGEARD, G.; SESBOÛÉ, R.; BAERT-DESURMONT, S.; VASSEUR, S.; MARTIN, C; TINAT, J. Molecular basis of the Li-Fraumeni syndrome: an update from the French LFS families. **J Med Genet.**, v. 45, p. 535-8, 2008.

BROOKS-WILSON, A.R.; KAURAH, P.; SURIANO, G.; LEACH, S.; SENZ, J.; GREHAN, N. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. **J Med Genet**, v. 7, p. 508-17, 2004.

BURNETT, A.; WETZLER, M.; LOWENBERG, B. Therapeutic Advances in Acute Myeloid Leukemia. **J Clin Oncol**, v.29, p.487-494, 2011.

CAMPACCI, N. Rastreamento populacional de famílias com predisposição hereditário ao câncer de mama e ou colorretal. **Barretos**, SP, 2013.

CASS, I.; BALDWIN, R.L.; VARKEY, T.; MOSLEHI, R.; NAROD, S.A.; KARLAN, B.Y. Improved survival in women with BRCA-associated ovarian carcinoma. **Cancer**, v. 9, p. 2187-95, 2003.

CHOMPRET, A. The Li-Fraumeni syndrome. **Biochimie**. v. 1, p. 75-82, 2002.

COLDITZ, G.A.; Wolin, K.Y.; Gehlert, S. Applying What We Know to Accelerate Cancer Prevention. **Sci Transl Med.**, v.4, n.127, 2012.

CONSÓRCIO CAPARAÓ/Agência 21, 2006; IBGE, 2006; Base Territorial: SDT/MDA, 2009. Mapa .

CORREA, Hernán. Li-Fraumeni Syndrome. **J Pediatr Genet**, New York, v.5, p.84-88, 2016.

CUSTÓDIO, G.; PARISE, G.A.; KIESEL, FILHO. N.; KOMECHEN, H.; SABBAGA, C.C.; ROSATI, R.; GRISA, L.; PARISE, I.Z.; PIANOVSKI, M.A.; FIORI, C.M.; LEDESMA, J.A.; BARBOSA, J.R.; FIGUEIREDO, F.R.; SADE, E.R.; IBAÑEZ, H.; ARRAM, S.B.; STINGHEN, S.T.; MENGARELLI, L.R.; FIGUEIREDO, M.M.; CARVALHO, D.C.; AVILLA, S.G.; WOISKI, T.D.; PONCIO, L.C.; LIMA, G.F.; PONTAROLO, R.; LALLI, E.; ZHOU, Y.; ZAMBETTI, G.P.; RIBEIRO, R.C.; FIGUEIREDO, B.C. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the *TP53* R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. **J Clin Oncol**. v. 31, p. 2619-26, 2013.

DANTAS, E.L.R.; LIMA, F.H.L.; CARVALHO, S.M.F.; ARRUDA, A.P.; RIBEIRO, E.M.; RIBEIRO, E.M. Genética do Câncer Hereditário. **Rev. Bras. Cancerol.**, v.55, n.3, p. 263-269, 2009.

DE LA CHAPELLE, A. The incidence of Lynch syndrome. **Fam Cancer**, v. 4, p. 233-7, 1996.

DONEHOWER, LAWRENCE A. Does p53 affect organismal aging?. **Journal of cellular physiology**, v. 192, n. 1, p. 23-33, 2002.

DOUBENI, C.A.; MAJOR, J.M.; LAIYEMO, A.O.; SCHOOTMAN, M.; ZAUBER, A.G.; HOLLENBECK, A.R. Contribution of behavioral risk factors and obesity to socioeconomic differences in colorectal cancer incidence. **J Natl Cancer Inst.**, v. 104, p. 1353-62, 2002.

EELES, R.A. Germline mutations in the *TP53* gene. **Surveys C**, editor, 1995.

EWALD, I. P., RIBEIRO, P. L. I., VARGAS, F., MOREIRA, M., COSSIO, S. L., BOCK, H., PROLLA, P. A. Prevalência de rearranjos gênicos em BRCA1 em indivíduos brasileiros com síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário. **Revista HCPA**, Porto Alegre, 2008.

FERRER, R. A.; GREEN, P. A.; BARRET, L. F. Affective science perspectives on cancer control. **Perspectives on Psychological Science**, v.10, n.3, p.328–345. 2015

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. Hypomethylation Distinguishes Genes of Some Human Cancers from Their Normal Counterparts. **Nature**, 301, 89-92. 1983. <http://dx.doi.org/10.1038/301089a>

FOULKES, W. D.; SHUEN, A. Y. In Brief: BRCA1 and BRCA2. **Journal of Pathology**, v. 230, n. 4, p. 347–349, 2013.

GALLAGHER, M.C.; PHILLIPS, R.K.; BULOW, S. Surveillance and management of upper gastrointestinal disease in Familial Adenomatous Polyposis. **Fam Cancer**, v. 5, p. 263-73, 2006.

GARBER, J.E.; OFFIT, K. Hereditary cancer predisposition syndromes. **J Clin Oncol**, v 23, p. 276-92, 2005.

GARNIS, C., BUYS, T.P.H., LAM, W. L. Genetic alteration and gene expression modulation during cancer progression. **Mol cancer**, 2004.

GARRITANO, S.; GEMIGNANI, F.; PALMERO, E.I.; OLIVIER, M.; MARTEL-PLANCHE, G.; LE CALVEZ-KELM, F. 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**, v.31, p. 143-50, 2010.

GIL-MOHAPEL, JOANA M.; REGO, ANA CRISTINA. Doença de Huntington: uma revisão dos aspectos fisiopatológicos. **Rev Neurocienc.**, v. 19, n. 4, p. 724-34, 2011.

GURZU, S.; Junga, I.; Orłowska, J.; Sugimura, H.; Kadar, Z.; Turdean, S.; Bara-Jr, T. Hereditary diffuse gastric cancer--An overview. *Pathol Res Pract.*, v.211, n.9, p. 629-632, 2015.

HANSFORD, S.; KAURAH, P.; LI-CHANG, H.; et al. Hereditary Diffuse Gastric Cancer Syndrome: CDH1 Mutations and Beyond. **JAMA Oncol**, v.1, p.23-32, 2015.

HARTGE, P., STRUEWING, J.P., WACHOLDER, S., BRODY, L.C., TUCKER, M.A. The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. **Am J Hum Genet**, v. 64, p. 963-70, 1999.

HEMMINKI, A., TOMLINSON, I., MARKIE, D., JARVINEN, H., SISTONEN, P.,

BJORKQVIST, A.M. Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis. **Nat Genet.**, v. 15, p. 87-90, 1997.

HEMMINKI, A.; MARKIE, D.; TOMLINSON, I.; AVIZIENYTE, E.; ROTH, S.; LOUKOLA, A. A serine/threonine kinase gene defective in Peutz-Jeghers syndrome. **Nature**, v. 391, p. 184-7, 1998.

HUYGHE, J. R. et al. Discovery of common and rare genetic risk variants for colorectal cancer. **Nature Genetics**, 2018.

IKEHATA, H.; ONO, T. The Mechanisms of UV Mutagenesis. **Journal of Radiation Research**, v.52, n.2, p.115–125, 2011.

INCA. **Estimativa 2016**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2016.

JOHN, S.W.; WEITZNER, G.; ROZEN, R.; SCRIVER, C. R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leukocytes. **Nucleic Acids Research**, n.192, p.408-408, 1991.

JURASKOVA, I.; BONNER, C. Decision aids for breast cancer chemoprevention. **Breast Cancer Res.**, v. 15, p. 106, 2013.

KENNEDY Alyssa L., Shimamura Akiko, Genetic Predisposition to MDS: Clinical Features and Clonal Evolution , 2019- American Society of Hematology.

KOBAYASHI, H., OHNO, S., SASAKI, Y., MATSUURA, M. Hereditary breast and ovarian cancer susceptibility genes (Review). **Oncol Rep.**, 2013.

KOURAKLIS, G., MISIAKOS, E.P. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): criteria for identification and management. **Dig Dis Sci.**, v. 50, p. 336-44, 2005.

LACHLAN, K.L. Cowden Syndrome and the PTEN Hamartoma Tumor Syndrome: How to Define Rare Genetic Syndromes. **J Natl Cancer Inst.**, 2013.

LATRONICO, A.C.; PINTO, E.M.; 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 tumor. **J. Clin. Endocrinol Metab**, v.86, n.10, p.4970-4973, 2001.

LEITÃO, A. L. E. Política pública para a agricultura familiar: o programa nacional de desenvolvimento sustentável dos territórios rurais (Prontf) no Território CaparaóES. 2009. 172 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Sociais em Desenvolvimento,

Agricultura e Sociedade) – Instituto de Ciências Humanas e Sociais, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

LI, F.P.; FRAUMENI, J.F. JR. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? **Ann Intern Med.**, v. 71, p. 747-52, 1969.

LIM, W.; HEARLE, N.; SHAH, B.; MURDAY, V.; HODGSON, S.V.; LUCASSEN, A. Further observations on LKB1/STK11 status and cancer risk in Peutz-Jeghers syndrome. **Br J Cancer**, v. 89, p. 308-13, 2003.

LYNCH, H.T.; FOLLETT, K.L.; LYNCH, P.M.; ALBANO, W.A.; MAILLIARD, J.L.; PIERSON, R.L. Family history in an oncology clinic. Implications for cancer genetics. **JAMA**, v. 242, p. 1268-72, 1979.

LYNCH, H.T.; SMYRK, T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. **Cancer**, v. 78, p.1149-67, 1996.

LYNCH, H.T.; SNYDER, C. Hereditary breast cancer: practical pursuit for clinical translation. **Ann Surg Oncol**, v. 19, p. 1723-31, 2012.

LYNCH, H.T.; SNYDER, C.L.; LYNCH, J.F.; RILEY, B.D.; RUBINSTEIN, W.S. Hereditary breast-ovarian cancer at the bedside: role of the medical oncologist. **J Clin Oncol.**, v. 21, p. 740-53, 2003.

LYNCH, M. Rate, molecular spectrum, and consequences of spontaneous mutations in man. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 107, p. 961-968, 2009.

LYNCH, H.; DE LA CHAPELLE, A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. **J Med Genet**, v.36, p.801–818, 1999.

MACDONALD, D.J. Germline mutations in cancer susceptibility genes: an overview for nurses. **Semin Oncol Nurs.**, v.27, p. 21-33, 2011.

MIGDEN, M.R.; Chang, A.L.S.; Dirix, L.; Stratigos, A.J.; Lear, J.T. Emerging trends in the treatment of advanced basal cell carcinoma. **Cancer Treatment Reviews**, v.64, p. 1–10, 2018.

MALLORY, SB. Cowden Syndrome(Multiple Hamartoma Syndrome). **Genodermatoses with malignant potential**. In: Maddin S, McLean D, eds. Dermatologic Clinics. Philadelphia WB Saunders; v.13, n.1, p.27-31, 1995.

MANRIQUE, J.E.; SULLCAHUAMAN-ALLENDE, Y.; LIMACHE-GARCIA, A. Genetic counseling about cancer in Peru. **Rev Peru Med Exp Salud Publica**, v. 30, p. 118-23, 2013.

MATAFOME, P.; SANTOS-SILVA, D.; SENA, C.M.; SEICA, R. COMMON mechanisms of dysfunctional adipose tissue and obesity- related cancer. **Diabetes Metab Res Rev.**, 2013.

MILHOLLAND, B. et al. Differences between germline and somatic mutation rates in humans and mice. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–8, 2017.

MISHRA, N.; HALL, J. Identification of patients at risk for hereditary colorectal cancer. **Clin Colon Rectal Surg.**, v. 25, p. 67-82, 2012.

MORGAN, D.; SYLVESTER, H.; LUCAS, F.L.; MIESFELDT, S. Cancer prevention and screening practices among women at risk for hereditary breast and ovarian cancer after genetic counseling in the community setting. **Fam Cancer**, v. 8, p. 277-87, 2009.

OLIVEIRA, N. F. P.; PLANELLO, A. C.; ANDIA, D.C.; PARDO, A.P.S. DNA Methylation and Cancer. **Revista Brasileira de Cancerologia**, n.56, p.4, p. 493-499, 2010.

PAL, T.; VADAPARAMPIL, ST. Genetic risk assessments in individuals at high risk for inherited breast cancer in the breast oncology care setting. **Cancer Control**, v. 19, p. 255-66, 2012.

PALMERO, E.I.; SCHULER-FACCINI, L.; CALEFFI, M.; ACHATZ, M.I.; OLIVIER, M.; MARTEL-PLANCHE, G. 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.**, v. 261, p. 21-5, 2008.

PARSA, N. Environmental Factors Inducing Human Cancers. **Iran J Public Health.**, v.41, n.11, p.1–9, 2012.

PERRIARD, J.; SAURAT, J.H.; HARMS, M. An overlap of Cowden's disease and Bannayan-Riley- Ruvalcaba syndrome in the same family. **J Am Acad Dermatol.**, v. 42, p. 348-50, 2000.

PETITJEAN, A. et al. Impact of mutant p53 functional properties on *TP53* mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC *TP53* database. **Human Mutation**, v. 28, n. 6, p. 622–629, jun. 2007.

PILARSKI, R.; ENG, C. Will the real Cowden syndrome please stand up (again)? Expanding mutational and clinical spectra of the PTEN hamartoma tumour syndrome. **J Med Genet.**, v.41, p. 323-6, 2004.

PINHO, S.S.; FIGUEIREDO, J.; CABRAL, J.; CARVALHO, S.; DOURADO, J.; MAGALHAES, A. E-cadherin and adherens-junctions stability in gastric carcinoma: functional implications of glycosyltransferases involving N-glycan branching

biosynthesis, N-acetylglucosaminyltransferases III and V. **Biochim Biophys Acta**. v. 3, p. 2690-700, 2013.

RÊGO, I. K. P.; NERY, I. S. Políticas Públicas, Câncer E Psicologia Ambiental/Public Policy, Cancer and Environmental Psychology. **Revista FSA (Centro Universitário Santo Agostinho)**, v. 5, n. 1, 2014.

RISCH, H.A. Hormonal etiology of epithelial ovarian cancer, with a hypothesis concerning the role of androgens and progesterone. **J Natl Cancer Inst.**, v. 90, p. 1774-86, 1998.

RISCH, H.A.; MCLAUGHLIN, J.R.; COLE, D.E.; ROSEN, B.; BRADLEY, L.; FAN, I. Population BRCA1 and BRCA2 mutation frequencies and cancer penetrances: a kin-cohort study in Ontario, Canada. **J Natl Cancer Inst.**, v. 98, p. 1694-706, 2006.

ROSSI, B.M.; DE OLIVEIRA, F.F. Extracolonic Tumors. Hereditary Colorectal Cancer: **Springer**, p. 311-33, 2010.

ROSSI, B.M.; DE-OLIVEIRA-FERREIRA, F. Extracolonic Tumors. Hereditary Colorectal Cancer. **Springer**, p. 311-33, 2010.

ROSSI, Marina. O 'alarmante' uso de agrotóxicos no Brasil atinge 70% dos alimentos. *El País*, edição em português, 30/IV/2015.

SCHRADER, K.A.; MASCIARI, S.; BOYD, N.; WIYRICK, S.; KAURAH, P.; SENZ, J. Hereditary diffuse gastric cancer: association with lobular breast cancer. **Fam Cancer.**, v. 7, p. 73-82, 2008.

SCHULMANN, K.; POX, C.; TANNAPFEL, A.; SCHMIEGEL, W. The patient with multiple intestinal polyps. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 21, p. 409-26, 2007.

SHAW, D.; BLAIR, V.; FRAMP, A.; HARAWIRA, P.; MCLEOD, M.; GUILFORD, P. Chromoendoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer: an alternative to prophylactic gastrectomy? **Gut**, v. 54, p. 461-8, 2005.

SIEGEL RL, Miller KD, Jemal A. **Cancer statistics, 2016**. *CA Cancer J Clin*. 2016; 66(1):7–30

SIEGEL Rebecca L., Miller Kimberly D., Ahmedin Jemal, - **Cancer Statistics, 2017**-*CA Cancer J Clin* 2017;67:7–30) .

SMITH, G.H.; SALOMON, D.S.; VONDERHAR, B.K. Re: "Evidence that an early pregnancy causes a persistent decrease in the number of functional mammary epithelial stem cells-implications for pregnancy-induced protection against breast cancer". **Stem Cells**, v. 27, p. 1223, 2012.

SUNG, Pi-Lin; WEN, Kuo-Chang; CHEN, Yi-Jen; CHAO, Ta-Chung; TSAI, Yi-Fang; TSENG, Ling-Ming; QIU, Jian-Tai Timothy; CHAO, Kuan-Chong; WU, Hua-His; CHUANG, ChiMu; WANG, Peng-Hui; HUANG, Chi-Ying F. The frequency of cancer predisposition gene mutations in hereditary breast and ovarian cancer patients in Taiwan: From BRCA1/2 to multi-gene panels. **PLoS ONE**, v.12, n.9, p.e0185615, 2017.

SHORT, S.P.; Williams, C.S. Selenoproteins in tumorigenesis and cancer progression. *Adv Cancer Res*, v.136, p. 49–83, 2017.

VAINCHENKER, W.; KRALOVICS, R.; Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. **Blood**, v. 129, n. 6, p. 667-679, Fev. 2017.

WEARY, P.E.; GORLIN, R.J.; GENTRY, W.C.; COMER, J.E.; GREER, K.E. Multiple hamartoma syndrome (Cowden's disease). **Arch Dermatol**, v.106, p.682–90, 1972.

WILL, O.C.; MAN, R.F.; PHILLIPS, R.K.; TOMLINSON, I.P.; CLARK, S.K. Familial adenomatous polyposis and the small bowel: a loco-regional review and current management strategies. **Pathol Res Pract.**, v. 204, p. 449-58, 2008.

ARTIGO ENVIADO

CRITERIA FOR POPULATION SCREENING OF HEREDITARY CANCER AND IDENTIFICATION OF FAMILIES WITH LI-FRAUMENI SYNDROME

Érika Aparecida Silva de Freitas Sartore^a, Mayara Mota de Oliveira^a, Suzanny Oliveira Mendes^a, Ivana Alece Arantes Moreno^a, Flavia Vitorino Freitas^f, Julia de Assis Pinheiro^a, Juliana Dalbó^a, Anderson Barros Archanjo^a, Bárbara Risse-Quaioto^a, Joaquim Gasparini dos Santos^a, Tamires dos Santos Vieira^a, Wagner Miranda Barbosa^f, Juliana Krüger Airpini^b, Bruno Lyrio Regis Ferraz^b, Flávia Errera^a, Marcelo dos Santos^g, José Cláudio Casali da Rocha^{c,d}, Iuri Drumond Louro^a, Adriana Madeira Alvares-da-Silva^{a,b}

^a Biotechnology/Renorbio Graduate Program, Federal University of Espirito Santo, ES, Brazil.

^b Department of Biology, Federal University of Espirito Santo, Alegre, ES, Brazil.

^c PUC Pontifícia Universidade Católica do Paraná, faculdade de medicina, PR, Brazil

^d Hospital Erasto Gardner, Curitiba, PR, Brazil.

^e Department of Medicina Veterinária, Federal University of Espirito Santo, Alegre, ES, Brazil.

^f Pharmacy and Nutrition Department, Federal University of Espirito Santo, Alegre, ES Brazil.

^g Federal University of Rio Grande do Norte - Rio Grande do Norte, Caicó, RN - Brazil

ABSTRACT

Hereditary cancer syndromes are not commonly detected in clinical practice, even in the most common ones such as hereditary breast and ovarian cancer and intestinal syndromes. In hereditary cancer syndromes with multiple tumors as in Li-Fraumeni / Li-Fraumeni-Like (LFS / LFL) identification is even more complex and patients are treated as sporadic cancer cases. There are 4 established criteria for the clinical identification of families, but it is important to develop criteria for population-level screening. Thus, the purpose of this work was the development of a simple screening method for population application focusing on the LFS / LFL. The screening method proposes the selection of families from medical records and application of criteria for LFS / LFL such as Li and Fraumeni, Chompret, Eles and Birch. We identified 66 families with hereditary cancer, 34 with LFS / LFL. The screening method plus Birch criteria were the most efficient in recognizing affected families at the population level compared to the other criteria. Besides, a population prevalence of 103: 100,000 was observed, higher than expected for the Brazilian population. These data suggest a possible founding effect in evaluated region and highlight the importance of conducting training in recognition of disease and the importance of creating methods for conducting population investigations carried out outside the oncological scope since primary care.

Keywords: Familial Cancer; Hereditary Cancer Syndrome; Li-Fraumeni Syndrome; Oncogenetic Screening.

INTRODUCTION

Cancer may manifest as sporadic or hereditary, but the familial form is often not identified in most cases, with hereditary disease being underreported. This occurs even in the best known inheritable tumors such as hereditary breast and ovarian cancer and bowel cancer. [1]

In hereditary cancer syndromes the most significant symptoms that may lead to suspicion of an inherited disease are the young age of diagnosis, multiple tumors and bilateral tumors in the same individual, presence of rare tumors, dominant autosomal inheritance pattern in heredogram analysis and, in some cases, the ethnic origin of some malignant neoplasms. [2,3,4]

In hereditary syndromes such as Li-Fraumeni syndrome (LFS) and Li-Fraumeni-Like (LFL), in which there are multiple tumors at different sites of involvement, the relationship between tumor presence and hereditary disease is even further from the vision of the health teams since the tumors that appear in family members are different from each other. [5,6] Patients with LFS / LFL have a high cumulative risk of developing multiple malignancies and have a family history of early onset tumors. [7]

LFS / LFL syndrome is mainly associated with TP53 gene mutations that can be detected in up to 29% of cases and many patients remain without molecular diagnosis even after genetic testing. [8,9] Thus, it is essential the clinically detection of disease, which is performed mainly through family history, heredograms and clinical examinations, death certificates and pathological reports of family members. [10]

Due to the diversity of tumors that may arise during the life of individuals and families with LFS/LFL, each family should be carefully evaluated, seeking accurate information, and guided by periodic imaging exams for screening and prevention of new tumors. [11]

In this way, in clinical practice, it is important that the individual be evaluated more fully, inserted in the family and social context. This approach should take place from primary health care, at the population level and not just within the cancer context. The goal of this approach is to identify hereditary forms of cancer, reduce mortality, follow-up therapeutic support even before the tumor appears. [12]

For clinical identification of Li-Fraumeni syndrome, criteria for its better detection were described. The first, more classic and restrictive was proposed by Li and Fraumeni [13] which obligatorily considers the presence of sarcoma at a young age, the broader criterion of Birch et al. [14] considers several tumors of the Li-Fraumeni spectrum at different ages. Eeles criteria (E1 and E2) [15] take into account the presence of tumors in two consecutive generations and the criteria of Chompret [16] consider the presence of tumors in Li-Fraumeni spectrum before age 36 and relatives with multiple tumors at any age. However, these criteria do not take population screening into account and are mainly used in families when SLF / LFL is already suspected.

Thus, the purpose of this work was to create a simple population screening flowchart to identify possible cases of hereditary cancer focusing on Li-Fraumeni syndrome, and to evaluate the effectiveness of the four criteria currently used for population use.

METHODS

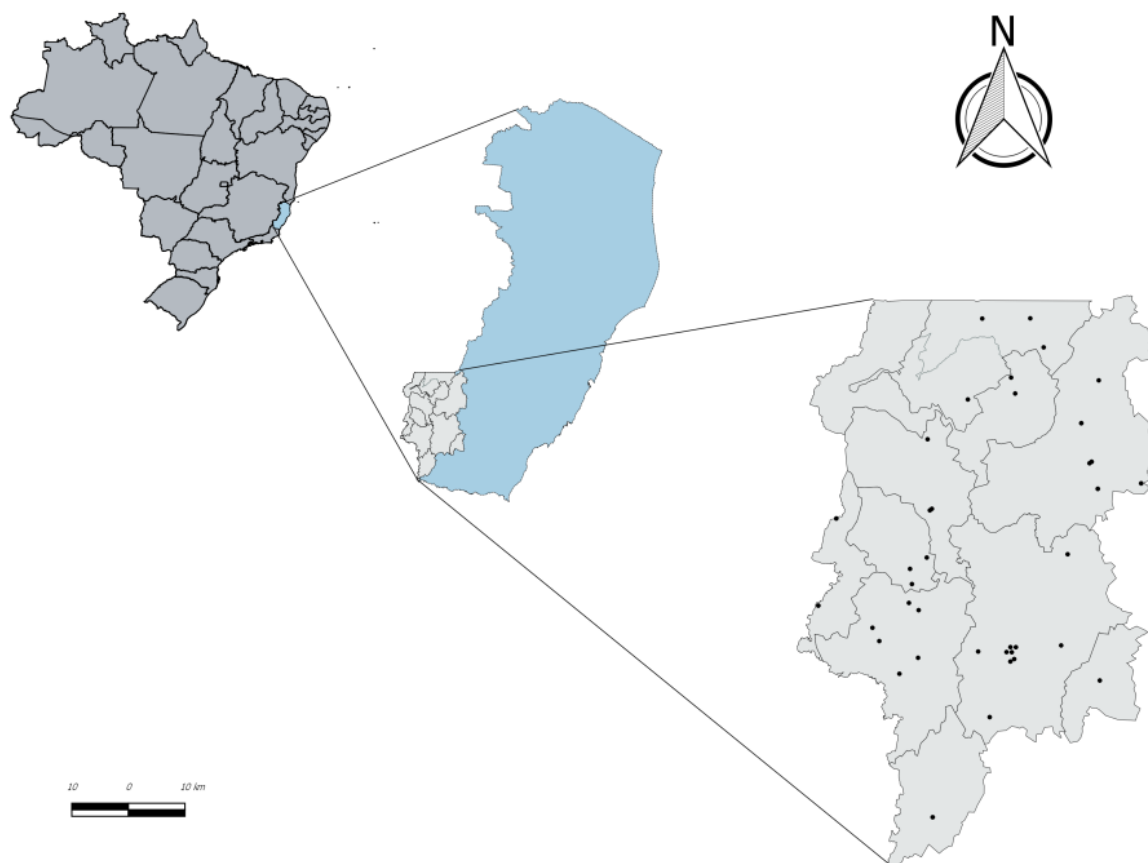
The present study was approved by the Research Ethics Committee CEP / CCS / UFES, under opinion No. 2,741,268. All subjects signed an Informed Consent Form agreeing to participate in the study.

The studied region was Caparaó Capixaba, State of Espírito Santo, Brazil, which comprises 11 municipalities and 3,920.70 km² of area with a population of approximately 180,000 inhabitants. The sample consisted of families with cancer who were screened from the records of primary health care in 11 cities of the Caparaó Capixaba region. The study included individuals from rural communities and health posts in a total of 38 collection points (Figure 1).

The study subjects were selected through a population screening method designed specifically for population assessment of hereditary cancer syndromes and focusing on SLF/LFL from 2013 to 2018.

The evaluation was performed from medical records and observation of the presence or family history of cancer criteria. From this, medical records of individuals without cancer or family history of the disease were excluded.

Figure 1. Georeferencing map of the study region with the location of the collection points.



Multidisciplinary health teams were trained in recognizing hereditary cancer syndromes, constructing heredograms and applying the main criteria for hereditary cancer classification.

The medical records included in the first evaluation were checked a second time with the presence of multidisciplinary teams of primary health care that received training. Cases of a single case of sporadic non-rare tumor, sporadic uterus cancer HPV+, sporadic stomach cancer *H. pilory*+, sporadic lung cancer in smokers, head and neck cancer in smokers, alcoholics or HPV+ were excluded. Non-rare tumors at the expected age without family history were also excluded (Criteria I – EXCLUSION). Tumors, even with risk factors for alcohol and tobacco use, HPV+, *H. pillory*+, were maintained when there was a family history of cancer.

Individuals who met at least one of the criteria for hereditary cancer were included in the study, considering the young age of disease onset, tumor bilaterality, more than one primary tumor in the same individual, occurrence of tumors among first or second degree relatives any case of childhood adrenocortical tumor, any case of brain, pancreatic or bone tumor at any age and tumors under 45 years of age, even without family history (Criteria II - INCLUSION).

Individuals selected by Criteria II were included, answered an individual assessment questionnaire with information on cancer risk factors, family history of cancer and disease, knowledge or diagnosis of hereditary cancer in the family, place of treatment, type of treatment, and then they were directed to the construction of heredograms.

From the heredogram and anatomopathological reports, death certificates, individual assessment questionnaire and other documents, criteria 3 were evaluated to detect possible hereditary cancer syndromes in the region.

Criteria III (Hereditary Syndromes) used the criteria of Bethesda, Amsterdam [17,18] for Lynch syndrome, the NCCN criteria (LIM et al., 2017) for hereditary breast and ovarian cancer, in addition to presence of diffuse stomach tumor with familial association of lobular breast cancer, familial melanoma or association of breast and pancreas, in addition to criteria of Li and Fraumeni, Birch, Chompret and Eeles (E1 and E2) for LFS/LFL (Table 1). [13,14,16,15] Cases of family groupings with autosomal dominant cancer pattern that did not fit any of the above criteria and cases of overlapping criteria without defining the syndrome were considered as another Hereditary Cancer Syndromes but not LFS/LFL. The flowchart of Figure 2 shows the population screening process applied in the study.

Figure 2. Flowchart with the criteria for inclusion and exclusion of population screening.

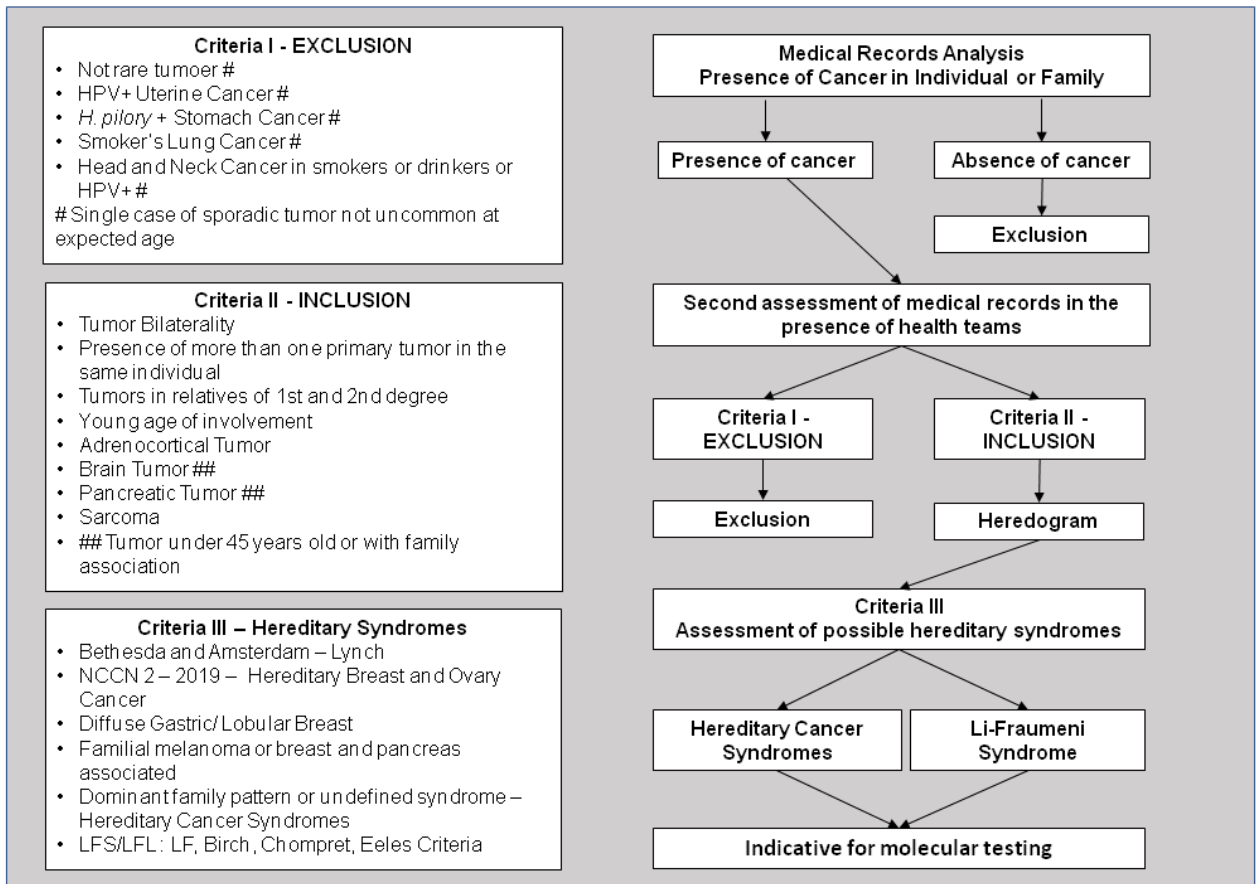


Table 1. Details of the 4 criteria used for Li-Fraumeni syndrome.

<p>Classic Li and Fraumeni</p>	<p>Sarcoma in childhood or young age (before 45 years) AND</p> <p>First-degree relative with any cancer at a young age (before age 45) AND</p> <p>First or second degree relative who is diagnosed with cancer at a young age (before 45 years) or sarcoma at any age.</p>
<p>Birch</p>	<p>Childhood cancer or sarcoma, central nervous system tumor or adrenocortical cancer before age 45 AND</p> <p>First-degree or second-degree relative with cancer typical of Li-Fraumeni Syndrome (sarcoma, breast cancer, central nervous system tumor, adrenocortical cancer, or leukemia) at any age AND</p> <p>First or second degree relative with any cancer before age 60.</p>
<p>Eeles</p>	<p>LFL-E1: presence of two first or second degree relatives with typical tumor at any age (sarcoma, breast cancer, CNS tumor, leukemia, adrenocortical tumor, melanoma, prostate cancer, pancreatic cancer).</p> <p>LFL-E2: sarcoma at any age in the subject with two of the following tumors (may be present in the same individual) breast cancer <50 years and / or CNS tumor, leukemia, adrenocortical tumor, melanoma, prostate cancer, pancreatic cancer at < 60 years or sarcoma at any age.</p>
<p>Chompret</p>	<p>Sarcoma, central nervous system tumor, breast cancer or adrenocortical cancer before age 36 AND</p> <p>First or second degree relative with cancer before age 46 OR</p> <p>Relative to multiple primary tumors at any age;</p> <p>Multiple primary tumors, including two sarcoma-type tumors, central nervous system tumor, breast cancer, or adrenocortical cancer, with the first tumor diagnosed before age 36, regardless of family history.</p> <p>Adrenocortical cancer at any age and regardless of family history.</p>

The subjects were evaluated at a reserved time, in which the family data were collected with the complete history and analysis of the presented documents. Heredograms were completed and patients were referred and referred according to the guidelines of the screening protocol established by the NCCN. [19]

The evaluation of genetic anticipation [20] was performed by calculating the mean age of disease onset with the respective standard deviations, which were evaluated according to the availability of information from different families considering up to 5 generations.

Prevalence was assessed by considering the living individuals with Li-Fraumeni in relation to the population of the region. The Brazilian prevalence used was 1: 10,000, considering that there is variation from 1: 5,000 in the south of the country to 1: 20,000 in the other Brazilian regions. [21]

For association between type of criteria and associated criteria, the chi-square test was used at a significance level of $p < 0.05$. Since the variables contained more than three categories, the 2x2 ratio analysis was continued using Bonferroni correction considering the significance level for $p < 0.008$. All statistical analyzes were performed using SPSS software, version 15.0 for Windows (IBM, Munich, Germany).

RESULTS

The screening of all individuals with supposedly familial cancer according to Criteria II - INCLUSION showed the presence of 284 cancer individuals from 66 families. Among individuals with familial cancer, 139 (48.9%) were women, and 145 (51.1%) were men. None of the individuals selected in the population screening knew the hereditary condition of the disease. Similarly, the health professionals who guided the treatment of these individuals did not evaluate the patients regarding the hereditary condition of the disease.

After Criteria III was applied, families with cancer met the criteria for different syndromes resulting in 3 families with possible Lynch syndrome, 6 families with possible hereditary breast and ovarian cancer syndrome, and 22 families with other unidentified syndromes or associations, which did not meet the criteria, but have family grouping of cancer with dominant pattern of inheritance or criteria indicative of overlapping syndromes.

For possible Li-Fraumeni 47 families were screened and, after evaluation according to the four criteria (LF, Birch, Eeles and Chompret), 34 families were then classified with Li-Fraumeni Syndrome using at least one of the criteria (Table 1) in a total of 215 patients.

Considering the criteria for Li-Fraumeni Syndrome, 8 families were included according to Li and Fraumeni criteria, 6 families according to Eeles criteria (EL1 and

EL2), 13 families by Birch criteria and 4 families in Chompret criteria. There was overlap of families when assessed by different criteria, so using a single criterion 24 families were classified, two criteria: two families and four criteria: 8 families, as can be seen in Table 2.

Table 2. Classification of families with Li-Fraumeni Syndrome (LFS/LFL), according to the evaluation of Li and Fraumeni, Eeles, Birch and Chompret criteria.

Criteria	Classification by 1 or more criteria					p*
	0	1	2	3	4	
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
LFS/LFL	0 (0)	1 (4.2)	0 (0)	0 (0)	7 (87.5)	
Birch	0 (0)	13 (54.2)	2 (100.0)	0 (0)	1 (12.5)	<0.0001**
Eeles	0 (0)	6 (25.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.005**
Chompret	0 (0)	4 (16.7)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.005**
No LF	13 (100.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Total	13 (100)	24 (100)	2 (100)	0 (100)	8 (100)	

*p-value for the qui-square test. **5% significance, adjusted by Bonferroni (p <0.008).

The 2x2 analysis of Li and Fraumeni, Eeles, Birch and Chompret criteria, considering its application in all evaluated families, showed that the classic Li and Fraumeni (LF) criteria differs from the other ones, classifying a smaller number of families than the other ones. other criteria (p <0.008, considering Bonferroni adjustment). When comparing Birch criteria with LF, the result is a significantly larger number of families classified by Birch (p <0.0001) (Table 2). The other criteria, when compared with each other, do not show differences in the classification of families.

Evaluation of 176 individuals with LFS / LFL showed that 48.5% were women and 51.5% were men. Of the 34 families identified as Li-Fraumeni Syndrome, younger age sarcomas, leukemias, central nervous system tumor, and young breast cancer were observed according to Table 3. The age group most affected by the disease was between 31 and 45 years old with 50.5% of the cases (Table 3).

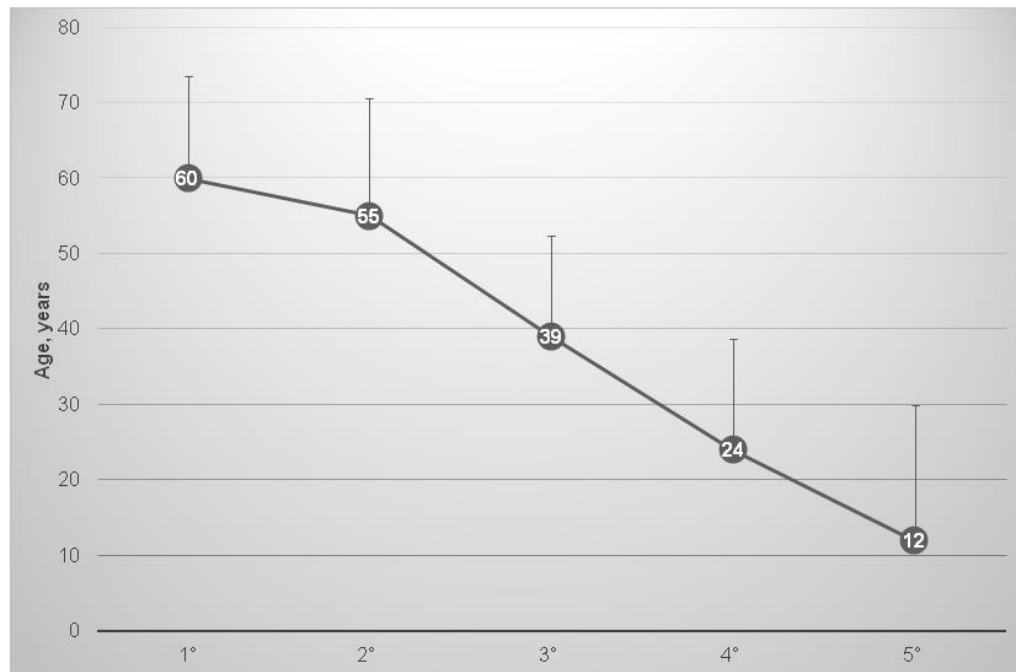
Table 3. Distribution of tumor types / anatomical locations by age among patients with possible Li-Fraumeni syndrome screened in the Caparaó Capixaba region.

Type/Location	0-15 years		16-30 years		31-45 years		46-60 years		≥61 years		Total
	N	%	N	%	N	%	n	%	n	%	
Breast	2	15,4	4	11,8	20	40,8	8	18,6	4	10,8	38
Stomach	0	0,0	1	2,9	2	4,1	2	4,7	2	5,4	8
Central Nervous System	2	15,4	0	0,0	4	8,2	6	14,0	4	10,8	16
Leukemia/Lymphoma	3	23,1	1	2,9	2	4,1	5	11,6	3	8,1	14
Lung	1	7,7	0	0,0	0	0,0	3	7,0	3	8,1	7
Prostate	0	0,0	0	0,0	2	4,1	3	7,0	2	5,4	7
Head and Neck	0	0,0	2	5,9	2	4,1	2	4,7	1	2,7	7
Non Melanoma Skin	0	0,0	1	2,9	1	2,0	2	4,7	1	2,7	5
Esophagus	0	0,0	0	0,0	1	2,0	0	0,0	0	0,0	1
Adrenocortical	1	7,7	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1
Melanoma	0	0,0	0	0,0	1	2,0	1	2,3	2	5,4	4
Pancreas	0	0,0	0	0,0	0	0,0	2	4,7	3	8,1	5
Thyroid / Pituitary	0	0,0	0	0,0	0	0,0	0	0,0	1	2,7	1
Bladder	0	0,0	0	0,0	1	2,0	1	2,3	1	2,7	3
Retinoblastoma	1	7,7	0	0,0	0	0,0	1	2,3	0	0,0	2
Bowel	1	7,7	0	0,0	2	4,1	0	0,0	3	8,1	6
Uterus	0	0,0	1	2,9	2	4,1	2	4,7	3	8,1	8
Sarcoma	2	15,4	24	70,6	9	18,4	4	9,3	4	10,8	43
Total	13	7.4	34	19.3	49	27.8	42	24.4	38	21.0	176

At each evaluated generation, the average age of disease onset was observed with with anticipation of occurrence of cases at each generation. Analysis included 5 generations with the following average age: generation 1 - 60 years (± 13.51), generation 2 - 55 years (± 15.58), generation 3 - 39 years (± 13.37), generation 4 - 24 years (± 14.77), generation 5 - 12 years (± 18.00).

Average data in generations are shown in Figure 3. The analysis of average age for each generation showed that there is an anticipation of up to 18 years (Figure 3). The anticipation analysis data were not complete for all families, especially in the first generations. Thus not all ages were computed.

Figure 3. Analysis of the average age at each generation and anticipation of age at onset of disease.



The punctual gross prevalence of the disease was 186: 180,000 or 103: 10,000. Comparison of obtained data in the region with those of the expected average Brazilian population prevalence of 1:10,000 showed a ratio 103 times higher.

DISCUSSION

The screening method for hereditary cancer employed showed presence of 66 families who reported, by family history, 284 individuals with cancer. None of individuals in the families knew family condition of disease. Similarly, health professionals from the 38 collection points investigated did not suspected hereditary disease in these patients and guide conventional treatments for sporadic cancer without any family intervention.

These data show the importance of screening for hereditary cancer and professional training in identifying disease. Lack of knowledge of hereditary disease among health professionals has also been reported by other authors, who detect a health professionals' view of disease rather than the patient in hereditary context. [1]

This was a pioneer study in Caparaó Capixaba region and demonstrated that simple and systematic screening can identify hereditary cancer forms, even without molecular tests. Genetic counseling in families is part of affected families care and can be performed at low cost and by trained multidisciplinary teams. [22]

In addition, family identification allows screening to identify the need for molecular testing for family-segregating mutations across generations. In southern Brazil, the presence of Li-Fraumeni syndrome was identified with the description of a new region-specific mutation, R337H in the *TP53* gene with such a high allelic frequency that genetic screening test for neonatal screening is now available for this specific population. [23,24]

Clinical evaluation is so important in detecting hereditary cancer disease that NCCN 2 Guideline 2019 for breast cancer oncogenetic screening suggests that molecular testing should only be performed after family history has been collected and and only after this, recommends to perform or not the molecular test, these data justify the clinical screening to identify family cancer cases for possible molecular referral.

Our results showed that, in LFS/LFL population screenings, less restrictive criteria had greater hereditary disease identification ranges. By Birch methodology, a larger number of families were screened than Li and Fraumeni's method. Thus, our study pointed out that the Birch criterion should be considered and included in population assessments. Our findings also showed that Li and Fraumeni criteria were the most restrictive for population screening.

The number of families data is supported by types of tumors found in LFS/LFL and with genetic anticipation findings, often found in hereditary cancer syndromes. These data are in accordance with the literature regarding genetic anticipation performed with Li-Fraumeni syndrome and hereditary breast and ovarian cancer in Askenasite women. [25]

In the studied region it was found that the prevalence of Li-Fraumeni syndrome was 103: 10,000, which was quite significant, even considering that it was not possible to identify 100% of affected families. In fact, even if underestimated, the number of families with a possible LFS/LFL was higher than expected in the Brazilian population. [21]

These results lead us to explore the possibility of the presence of genetic alteration of "Founding Effect" type in Caparaó Capixaba region. A corroborating fact for this hypothesis is the regional geographic isolation determined by rugged relief and precarious roads. Mutations with founder's effect have been found and described in various parts of the world with different hereditary syndromes and with very significant outcomes for populations assessed for improving public health. [26]

In fact, the detection of carriers of mutations for preventable or early detection diseases is very important, as those identified can be referred for molecular evaluation of mutation detection and appropriate health monitoring, with anticipated age for recommended preventive exams as recommended by the guideline US Preventive Services Task Force, 2019. [27]

ACKNOWLEDGMENT

For the volunteers of this study, the health agents, nurses, nursing technicians and primary care doctors of the municipalities of Caparaó Capixaba, ES, Brazil. To FAPES for granting the scholarship.

REFERENCES

1. Rhine CL, Cygan KJ, Soemedi R, Maguire S, Murray MF, Monaghan SF, et al. Hereditary cancer genes are highly susceptible to splicing mutations. *PLoS Genet.* 2018;14(3): e1007231. doi: 10.1371/journal.pgen.1007231.
2. Hartge P, Struewing JP, Wacholder S, Brody LC, Tucker MA. The prevalence of common BRCA1 and BRCA2 mutations among Ashkenazi Jews. *Am J Hum Genet.* 1999;64(4):963–970. doi: 10.1086/302320
3. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet.* 2009;76(1): 1-18. doi:10.1111/j.1399-0004.2009.01230.
4. Manrique JE, Sullcahuaman-Allende Y, Limache-Garcia A. Genetic counseling about cancer in Peru. *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* 2013;30(1): 118-23.
5. Nogueira ST, Lima EN, Nóbrega, AF, Torres I, Cavicchioli M, Hainaut P, et al. F-FDG PET-CT for Surveillance of Brazilian Patients with Li-Fraumeni Syndrome. *Front Oncol.* 2015;5(38). doi:10.3389/fonc.2015.00038
6. Choi YJ, Kim N. Gastric cancer and family history. *Korean J Intern Med.* 2016;31(6): 1042-1053. doi: 10.3904/kjim.2016.147.
7. Amadou A, Achatz MIW, Hainaut P. Revisiting tumor patterns and penetrance in germline TP53 mutation carriers: temporal phases of Li-Fraumeni syndrome. *Curr Opin Oncol.* 2018 30(1):23-29. doi: 10.1097/CCO.0000000000000423.
8. Tinat J, Bougeard G, Baert-Desurmont S, Vasseur S, Martin C, Bouvignies E, et al. 2009 version of the Chompret criteria for Li Fraumeni syndrome. *J Clin Oncol.* 2009;27(26) :e108–9. doi:10.1200/JCO.2009.22.7967.
9. Correa H. Li-Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet.* 2016;5(2):84–88. doi: 10.1055/s-0036-1579759.
10. Gondim AS, Soares CEL, Custódio MP, Castro AR, Silva FEL, Quidute ARP. Síndrome Hereditária Familiar Associada a Neoplasias: Ação Extensionista na Construção de Heredogramas e Detecção de Comorbidades. *Rev Ext Ação.* 2018;10: 126-138.
11. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, et al. 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.* 2010: 31(2):143-50. doi: 10.1002 / humu.21151.

12. Leachman SA, Lucero Om, Sampson JE, Cassidy P, Bruno W, Queirolo P, et al. Identification, genetic testing, and management of hereditary melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 2017;36(1): 77-90. doi: 10.1007/s10555-017-9661-5.
13. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med.* 1969;71: 747-52.
14. Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, Prosser J, Condie A, Kelsey AM, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. *Cancer Res.* 1994; 54(5): 1298-304.
15. Eeles RA. Germline mutations in the TP53 gene. *Cancer Surv.* 1995;25: 101-24.
16. Chompret A, Abel A, Stoppa-Lyonnet D, Brugieres L, Pages S, Feunteun J, et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. *J Med Genet.* 2001 38(1): 43–47. doi: 10.1136/jmg.38.1.43.
17. Brooks-Wilson AR, Kaurah P, Suriano G, Leach S, Senz J, Grehan N. Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria. *J Med Genet,* 2004;41:7:508-17.
18. Shaw D, Blair V, Framp A, Harawira P, Mcleod M, Guilford P. Chromoendoscopic surveillance in hereditary diffuse gastric cancer: an alternative to prophylactic gastrectomy? *Gut.* 2005;54(4):461-8.
19. Daly MB, Pilarski R, Berry M, Buys SS, Friedman S, Gaber JE, et al. NCCN guidelines insights: genetic/familial high-risk assessment: breast and ovarian, version 3.2019. *J Nat Comp Can Net,* 2019;15(1): 9-20.
20. von Salomé J, Boonstra PS, Karimi M, Silander G, Stenmark-Askmal M, Gebre-Medhin S, et al. Genetic anticipation in Swedish Lynch syndrome families. *PLoS Genet.* 2017;13(10): e1007012. doi:10.1371/journal.pgen.1007012.
21. Achatz MI, Porter CC, Brugières, L, Druker, H, Frebourg T, Foulkes W. D. Cancer Screening Recommendations and Clinical Management of Inherited Gastrointestinal Cancer Syndromes in Childhood. *Clinical Cancer Research.* 2017;23: 107-114.
22. Rousset-Jablonski C, Gompel A. Screening for familial cancer risk: Focus on breast cancer. *Maturitas.* 2017;105: 69-77. doi: 10.1016/j.maturitas.2017.08.004
23. Achatz MIW, Hainaut P. TP53 Gene and Li-Fraumeni Syndrome. *Applied Cancer Research,* 2005;25(2): 51-57.
24. Custódio G, Parise GA, Kiesel FN, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of Neonatal Screening and Surveillance for the TP53 R337H Mutation on Early Detection of Childhood Adrenocortical Tumors. *J Clin Oncol.* 2013;31: 2619-26. doi: 10.1200/JCO.2012.46.3711.

25. Ferraz VE, Cury NM. How the gynecologist can guide women with a family history of cancer? *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2014;36(8): 335-9. doi: 10.1590/SO100-720320140005104.
26. Ewald IP, Ribeiro PLI, Vargas F, Moreira M, Cossio SL, Bock H, et al. Prevalência de rearranjos gênicos em BRCA1 em indivíduos brasileiros com síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e ovário. *Revista HCPA.* 2008;28.
27. Lim GH, Borje E, Allen JC Jr. Evaluating the performance of National Comprehensive Cancer Network (NCCN) breast and ovarian genetic/familial high risk assessment referral criteria for breast cancer women in an Asian surgical breast clinic. *Gland Surg.* 2017;6(1): 35–42. doi: 10.21037/gc.2016.11.05.
28. World Health Organization. *Cancer control: knowledge into action. WHO guide for effective programmes: prevention.* World Health Organization; 2007.

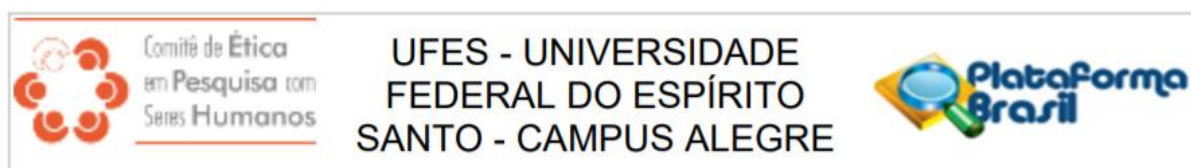
10. APÊNDICES E ANEXOS

10.A APÊNDICE - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Estudo da relação do uso de agrotóxicos com o desenvolvimento de câncer de estômago e encéfalo na mesorregião Sul Espírito Santense.

CAAE 88183018.2.0000.8151

Número do Parecer: 2.741.268



UFES - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESPÍRITO
SANTO - CAMPUS ALEGRE

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da relação do uso de agrotóxicos com o desenvolvimento de câncer de estômago e encéfalo na mesorregião Sul Espírito Santense

Pesquisador: ADRIANA MADEIRA ALVARES DA SILVA

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 88183018.2.0000.8151

Instituição Proponente: CENTRO DE CIENCIAS AGRARIAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESPIRITO SANTO - FAPES

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.741.268

10.B **APÊNDICE** - Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT 29409161909191646 28/08/2019 870190084023 11:13 - **Número do Processo: BR 20 2019 017900 2**

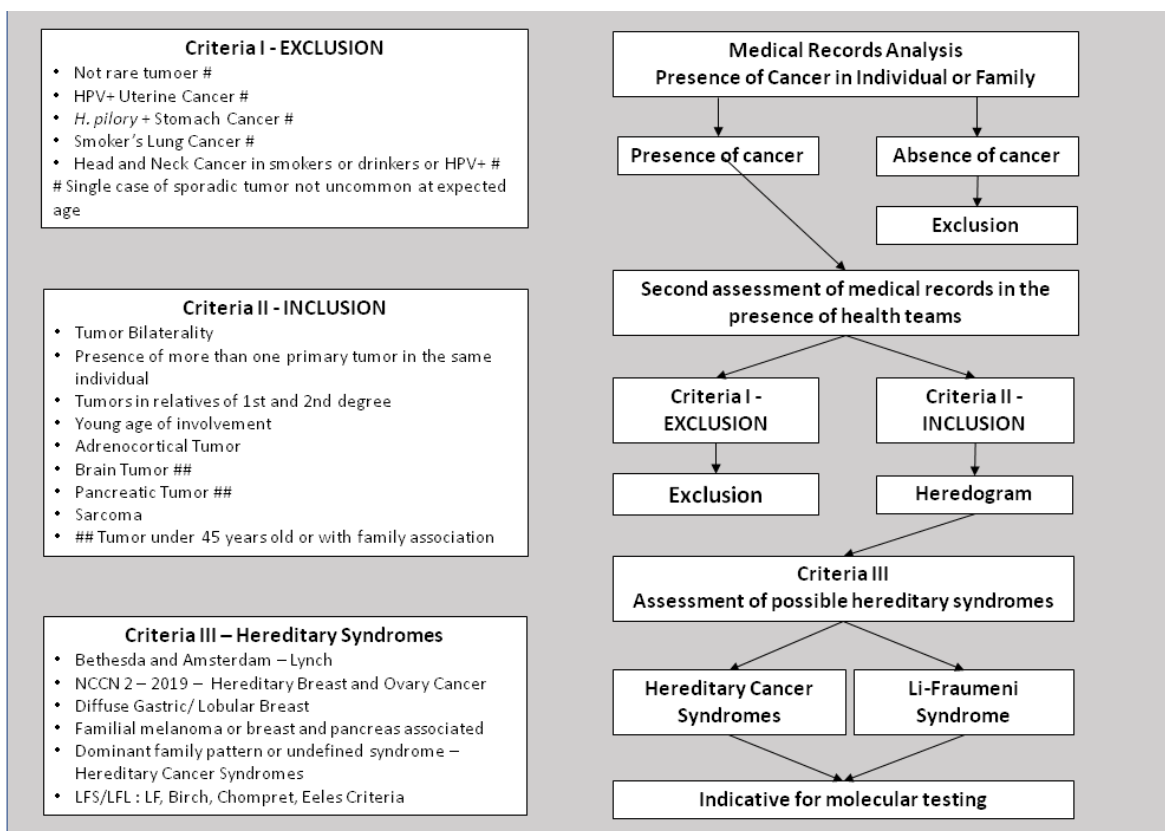


Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 20 2019 017900 2

APÊNDICE C - PROTOCOLO DE RASTREAMENTO UTILIZADO PARA CÂNCER FAMILIAL NA REGIÃO DO CAPARAÓ CAPIXABA

Protocolo de Rastreamento para Câncer Familiar na Região do Caparaó Capixaba										
Número do Questionário	Nome do paciente / Probando	Data Nascimento	Sítio tumoral	Data do início do tumor	Tratamento	Tabaco / Alcool ou outras drogas	Casos familiares Idade e sitio tumoral	Clínica / Resultados de exames histopatológicos	Origem étnica	Uso de agrotóxico



Apêndice C. Protocolo de Rastreamento para Câncer Familiar na Região do Caparaó Capixaba.