

MARA ALBONEI DUDEQUE PIANOVSKI

**ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E EXPRESSÃO DE SF-1 E DAX-1
DOS TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL DE CRIANÇAS NO ESTADO
DO PARANÁ**

**CURITIBA
2005**

Ao meu pai, Albino Pianovski,
à minha mãe, Maria Lindamir Dudeque Pianovski,
à minha avó Izabel Dudeque,
pelo amor à vida, ao próximo, pelo culto aos valores sociais, pelo respeito,
pela paciência, pelo bom-humor.
Vocês continuam vivos nas minhas paixões.

Aos meus sogros, Mitsuo Tanaka (*in memoriam*) e Kayo Tanaka,
pelo incentivo.

Aos meus filhos Fábio e Daiana, Guilherme, Daniel e Yukie, meus grandes
amigos, razão principal da minha existência e felicidade.

Ao meu companheiro Elio Tanaka, justamente por isto.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador no *Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire* (IGBMC), Illkirch, França, Dr. Enzo Lalli, pelo espírito crítico, ágil e irônico, que incentiva a busca pelo conhecimento; também pelo afeto e atenção com que me recebeu, e sobretudo pela confiança irrestrita.

Ao Dr. Paolo Sassone-Corsi, chefe do Departamento de Transcrição do IGBMC, por permitir a realização de parte desta tese no serviço sob sua responsabilidade, fornecendo reagentes, equipamentos e anticorpos para as análises.

Ao Dr. Bassem R. Haddad, Dra. Luciane Cavalli e Savana C. Lima, pela realização dos testes de FISH, no *Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University*, Washington, DC.

Ao Dr. Paolo Boffetta, pela orientação valiosa na realização do trabalho sobre mortalidade, com sua brilhante experiência que o qualifica como membro da *International Agency for Research on Cancer*, Lyon, França.

Ao Dr. Gerard Zambetti, pela realização dos ensaios de micro-arranjo, no *St. Jude Children's Hospital*, Memphis, Tennessee, EUA.

Ao Dr. Kin-Ichirou Morohashi, do *National Institute for Basic Biology*, Okazaki, Japão, por ceder gentilmente o anticorpo anti-SF-1 para a realização da avaliação da expressão protéica.

Ao Dr. Raul Corrêa Ribeiro e Dr. Carlos Rodriguez-Galindo, do *St. Jude Children's Hospital*, Memphis, Tennessee, EUA, pela discussão do trabalho sobre mortalidade.

À cientista Bárbara Bardoni, do IGBMC, Illkirch, França, pela amizade e hospitalidade e ao Alessandro, pela ternura, que suavizou meus momentos de solidão.

A Sylvia Lehmann, por me facilitar a adaptação à Alsácia e ao laboratório do IGBMC.

Ao Dr. Luiz de Lacerda Filho, Chefe do Departamento de Pediatria, ao Dr. Romolo Sandrini Neto, Dra. Rosana Marques Pereira e toda a equipe da endocrinologia pediátrica, que me permitiu e facilitou a realização desse trabalho.

Ao Dr. Izrail Cat, por todos os desafios que me ajudam a crescer e por cuidar dos nossos pacientes que necessitam de tratamento intensivo, com disciplina e rigor incontestáveis.

A todos os professores do Departamento de Pediatria, em especial ao Dr. Orival Costa e Dra. Leide Parolin Marinoni, pela amizade e exemplo.

À Dra. Adelina Elizabeth Lehmkuhl, que voluntariamente me substituiu na supervisão da disciplina de hemato-oncologia pediátrica, durante os quatro meses que fiquei em Strasbourg, exercendo o princípio da amizade autêntica.

À Dra. Eliane Mara Cesário Pereira e Dra. Denise Siqueira de Carvalho, pela orientação epidemiológica e amizade.

À Dra. Mônica Nunes Lima Cat e ao Dr. Luiz Caleffe, pela análise estatística dos resultados.

À Dra. Neiva Isabel Rodrigues Magdalena, pelo auxílio na compreensão dos assuntos genéticos.

Aos colegas Carmem Maria Costa Mendonça Fiori, Leniza Costa Lima Lichtvan, Lisandro Lima Ribeiro, pela dedicação aos nossos pacientes, e presença efetiva na minha ausência.

Aos cirurgiões pediátricos, Dr. Antonio Ernesto da Silveira, Dr. Miguel Andrade, Dr. Antônio Carlos Moreira Amarante, Dra. Paola e Dr. Ayrton Alves Aranha, por se engajarem conosco na procura de tecido de córtex adrenal normal.

Aos alunos e colegas Anamaria de Souza Cardoso, Anna Letícia Sant'Anna Yanai, Cassandra Teixeira Valle, Patrícia Brandalise, Leniza Lima Lichtvan, Lisandro Lima Ribeiro, Érica Yamauchi, Marcela M. Barros, Fabíola Lie Nishimoto e Emerson Prado de Souza por contribuírem com a paixão pela oncologia pediátrica.

Aos colegas Dionísio Abrão, Suely Zanon Voss, Ivy Zortéa Parise, e Iolanda de Assis Galvão, do Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer, por atenderem com zelo meus pacientes, nos momentos em que precisei me ausentar.

À Dra. Flora Watanabe, Dra. Edna Kakitani Carboni, Dra. Ana Paula Kuczinski Pedrobom e Dr. Guilherme Parise, oncologistas pediátricos do Hospital

Pequeno Príncipe, por permitirem utilizar informações sobre seus pacientes, e à Maria Alice, pela agilidade em fornecê-las.

Ao Dr. Edson Luiz Michalkiewicz, por coletar amostras de tumores de córtex adrenal para o banco de tumores do CEGEMPAC.

Ao patologista Dr. Sérgio Ossamu Ioshii, por ceder os blocos e lâminas dos pacientes do Hospital Erasto Gaertner Liga Paranaense de Combate ao Câncer, para estudo.

Aos patologistas, Dr. José Ederaldo Queiroz Telles e Dr. Gilberto Antunes Sampaio por revisarem as lâminas dos pacientes incluídos no estudo.

À Dra. Sílvia Regina Brandalise, por permitir a coleta de adrenal normal no Centro Infantil Boldrini, sob sua direção, preenchidas as questões éticas pertinentes, e aos cirurgiões pediátricos daquela instituição, Dr. Márcio Miranda e Dr. Antonio Gonçalves Oliveira Filho, por se encarregarem de fazê-lo.

À Dra. Maria José Mastellar, Jundiaí, por ceder dados do seu paciente.

Às secretárias Luzia Garus, Clara Lara de Freitas, Luzia Santos, Sandra Mara, Bernadete, Arielba, Cláudia e Andréa, sempre solícitas e amigas.

À equipe do CEGEMPAC, Elis, Renato, Miriam, Giovana, Fernanda, Túlio, Sohaila e D. Glaci, por estarem sempre disponíveis para me auxiliar.

À Patrícia Zancanella, pelo caprichoso trabalho de revisão e formatação.

Ao Dr. Oldemir Mangili, pela leitura atenciosa e sugestões.

À Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia (APACN), na pessoa de sua presidente Sra. Mariza Del Claro, pela estrutura física de atendimento aos pacientes e pelo CEGEMPAC.

Aos pacientes com tumores adrenocorticais, e seus familiares, por permitirem a inclusão de seus dados e análise de seus tumores. A saga destas crianças é o motivo principal da existência deste trabalho.

Ao Felipe, Karla, Stephanie, Mirele, Cristiane, Stefanie, Patrícia, Carlos, Giovanna, Miguel, Angélica, Magna, Alexandre, que nos últimos anos me incentivaram a lutar, enfrentando o sofrimento, com a esperança de que um dia tudo venha a ser diferente, mesmo que para eles o caminho já tenha sido trilhado.

"Oh,

O conforto -
O indizível conforto
De sentirmo-nos protegidos,
Sem ter de pensar antes de falar,
Nem medir palavras, mas apenas desabafar.
Dizer tudo o que pensamos, misturar farelos com grãos,
Certos de que uma mão amiga cuidará de peneirá-los,
Guardando apenas o que tem valor.
E, com sopro de bondade,
Mandar o resto para bem longe."

Dinah Marie Mulock Craik

Ao meu orientador Dr. BONALD CAVALCANTE DE FIGUEIREDO,
responsável principal por toda a pesquisa,
exemplo de
altruísmo incondicional.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
LISTA DE QUADROS.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xii
LISTA DE SÍMBOLOS.....	xiv
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVOS.....	5
1.1.1 Objetivos Gerais.....	5
1.1.2 Objetivos Específicos.....	5
2 REVISÃO DE LITERATURA	6
2.1 INCIDÊNCIA DOS TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL, SOBREVIDA E MORTALIDADE.....	6
2.2 DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX ADRENAL.....	10
2.2.1 Participação dos Fatores de Transcrição.....	13
2.2.1.1 <i>WT-1</i>	14
2.2.1.2 O fator esteroideogênico-1 (<i>SF-1</i>).....	15
2.2.1.3 A estrutura do <i>SF-1</i>	15
2.2.1.4 A expressão do <i>SF-1</i> nos tecidos adultos.....	16
2.2.1.5 A expressão do <i>SF-1</i> nos tecidos embrionários.....	16
2.2.1.6 Funções de <i>SF-1 in vivo</i>	17
2.2.1.7 <i>DAX-1 (Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene-1)</i>	18
2.2.1.8 A estrutura da proteína <i>DAX-1</i>	19
2.2.1.9 A expressão do <i>DAX-1</i> nos tecidos	20
2.3 DOENÇAS RESULTANTES DA FALTA DE <i>SF-1</i> OU DE <i>DAX-1</i>	21
2.4 INTERAÇÃO DE <i>DAX-1</i> COM <i>SF-1</i> E OUTROS FATORES DE TRANSCRIÇÃO.....	23
2.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE <i>DAX-1</i> E <i>SF-1</i>	25
2.6 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E ESTEROIDOGÊNESE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA ADRENAL.....	26
2.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS TCAs.....	30
2.8 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DOS TCAs.....	32
2.9 DIFERENÇAS ENTRE TCAs DE CRIANÇAS E DE ADULTOS....	33
2.9.1 Incidência.....	33
2.9.2 Manifestações Clínicas.....	34
2.9.3 Histologia	34
2.9.4 Prognóstico	35

2.10 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E BIOLÓGICAS DOS TCAs.....	35
2.11 ASPECTOS MOLECULARES DA ETIOPATOGENIA DOS TCAs.	40
2.11.1 <i>IGF-II</i> , <i>H19</i> e <i>p57/KIP2</i>	40
2.11.2 Inibinas e Ativinas.....	41
2.11.3 Participação de DAX-1 nos TCAs.....	44
2.12 GENE <i>TP53</i> NA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E NOS TCAs ESPORÁDICOS.....	44
2.12.1 Penetrância dos TCAs.....	47
2.12.2 Perda de Heterozigose (LOH), Hipótese de Knudson e Teoria do Fenótipo Mutador.....	47
2.13 MUTAÇÃO <i>TP53</i> R337H CAUSANDO O TCA NO ESTADO DO PARANÁ.....	50
2.14 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (HGC) E AMPLIFICAÇÃO DE 9q34.....	53
3 CASUÍSTICA E MÉTODOS	56
3.1 CASUÍSTICA.....	56
3.1.1 Revisão de Registros e Confirmação de Óbitos por TCA (grupo 1A) e Nb (grupo1B)..	56
3.1.2 Seleção de Amostra para Análise de SF-1 e DAX-1 (grupos 2A, 2B e 2C).....	57
3.1.2.1 Características dos pacientes (grupos 2A, 2B e 2C).....	58
3.2 MÉTODOS	63
3.2.1 Cálculo do Coeficiente de Mortalidade e da Incidência de TCA.....	63
3.2.2 Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH)	64
3.2.2.1 Preparação das amostras para identificação de seqüências de ácidos nucleicos por meio de FISH.....	64
3.2.2.2 Preparação das sondas e hibridização.....	65
3.2.3.3 Microscopia fluorescente e análise	66
3.2.3 TÉCNICA DE <i>WESTERN BLOT</i> PARA AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO PROTÉICA DE <i>DAX-1</i> E <i>SF-1</i>	66
3.2.3.1 Preparação das amostras.....	67
3.2.3.2 Eletroforese.....	67
3.2.3.3 Transferência das proteínas para membrana de PVDF.....	67
3.2.3.4 Incubação das membranas de PVDF com anticorpos.....	68
3.2.3.5 Revelação e quantificação das proteínas pesquisadas.....	69
3.2.4 Quantificação de Transcritos de DAX-1 pela Técnica de Micro-Arranjo	69
3.2.4.1 Extração e preparação de RNA total.....	69
3.2.4.2 Microarranjo para DAX-1.....	70
3.2.5 Análise Estatística.....	70
3.2.6 Normas Para Apresentação.....	70
4 RESULTADOS	71
4.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	71

4.1.1 Taxa de Mortalidade por TCA Abaixo 15 Anos de Idade, na Região Metropolitana de Curitiba (RMC).....	71
4.1.2 Taxa de Mortalidade por Nb em Pacientes com Idade Inferior a 15 Anos, na RMC.....	71
4.1.3 Relação entre Taxas de Mortalidade por TCA e por Nb	73
4.1.4 Estimativa da Incidência de TCA em Crianças com Idade Inferior a 15 Anos	73
4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>SF-1</i> NOS TCAs.....	73
4.2.1 Número de cópias do gene <i>SF-1</i> no grupo 2A de TCAs.....	73
4.3 NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE E EXPRESSÃO PROTÉICA DE <i>SF-1</i>	75
4.3.1 Número de Cópias do Gene <i>SF-1</i> no Grupo 2B de TCAs	75
4.3.2 Expressão Protéica de <i>SF-1</i> no Grupo 2B de TCAs	76
4.4 TRANSCRITOS E EXPRESSÃO PROTÉICA DE <i>DAX-1</i> NO GRUPO 2C.....	79
4.4.1 Resultados de Microarranjo para <i>DAX-1</i>	79
4.4.2 Expressão da proteína DAX-1.....	80
5 DISCUSSÃO	84
5.1 ESTIMATIVA DA TAXA DE MORTALIDADE POR TCA E SUA INCIDÊNCIA NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA	84
5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>SF-1</i>	88
5.3 EXPRESSÃO DE <i>SF-1</i> E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DOS TCAs.....	92
5.4 EXPRESSÃO DE <i>DAX-1</i> E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DOS TCAs.....	95
5.5 CONCEITOS E HIPÓTESES RELACIONADOS À ETIOPATOGENIA E À ELEVADA INCIDÊNCIA DE TCA NO PARANÁ.....	98
6 CONCLUSÕES	103
7 REFERÊNCIAS	105
8 APÊNDICES	138
8.1 Comparative Genomic Hybridization Analysis of Adrenocortical Tumors of Childhood.....	139
8.2 Amplification of 9q34 in Childhood Adrenocortical Tumors: a Specific Feature Unrelated to Ethnic Origin or Living Conditions.....	146
8.3 Mortality Rate of Adrenocortical Tumors in Children Under 15 years of Age in Curitiba Brazil..	155
8.4 Amplification of the Steroidogenic Factor 1 Gene in Childhood Adrenocortical Tumors.	161
8.5 <i>SF-1</i> Overexpression in Childhood Adrenocortical Tumors.....	167
8.6 Correlation Between the <i>DAX-1</i> Array Transcript and Protein Expression in Childhood Adrenocortical Tumors	180
9 ANEXOS	201
9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR(1)	202
9.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (2)	204
9.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HEG-LPCC.....	206

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - TAXA DE INCIDÊNCIA DE CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL POR MILHÃO, PADRONIZADA POR IDADE E CUMULATIVA (0-14)	8
TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DO TCA DE CRIANÇAS EM ESTÁDIOS E SOBREVIDA EM 5 ANOS, ESTIMADA PARA CADA ESTÁDIO	10
TABELA 3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS TUMORES ADRENAIS.....	37
TABELA 4 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM TCA (PARTE 1).....	61
TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM TCA (PARTE 2).....	62
TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO PADRÃO MUNDIAL ABAIXO DE 15 ANOS.....	63
TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS REFERENTES AOS ÓBITOS POR Nb.....	72
TABELA 9 - TAXA DE MORTALIDADE POR Nb DE ORIGEM ADRENAL, POR MILHÃO DE HABITANTES COM IDADE ABAIXO DE 15 ANOS, NA RMC (1998-2003)	72
TABELA 10 - RESULTADOS DE FISH PARA <i>SF-1</i> E HGC PARA DETECÇÃO DE AMPLIFICAÇÃO DE 9q34, COMPARADOS COM AS CARACTERÍSTICAS DOS TCAs e MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (GRUPO 2A)	75
TABELA 11 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>SF-1</i> NO GRUPO 2B	76
TABELA 12 - EXPRESSÃO DE <i>SF-1</i> COMPARADA COM CARACTERÍSTICAS DOS TCAs e CLÍNICAS, GRUPO 2B	78
TABELA 13 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E LABORATORIAIS COMPARADAS COM AS CONCENTRAÇÕES DE TRANSCRITOS E DA PROTEÍNA DAX-1, NO GRUPO 2C	82
TABELA 14 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE CASOS DE TCA REGISTRADOS EM HOSPITAIS DE SÃO PAULO, PARANÁ, BAHIA, ESTADOS UNIDOS E EUROPA	88

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL.....	13
FIGURA 2 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SF-1.....	16
FIGURA 3 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA DAX-1.....	20
FIGURA 4 - VIAS MAIORES DA BIOSÍNTESE DE ESTERÓIDES	28
FIGURA 5 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA p53.....	46
FIGURA 6 - MUTAÇÃO <i>TP53 R337H</i> , NO DOMÍNIO DE TETRAMERIZAÇÃO.....	51
FIGURA 7 - FISH PARA <i>SF-1</i> , EM AMOSTRAS DE TCAs.....	74
FIGURA 8 - WESTERN BLOT PARA SF-1 NOS TCAs DE CRIANÇAS ...	77
FIGURA 9 - WESTERN BLOT PARA DAX-1 NOS TCAs DE CRIANÇAS ..	81
FIGURA 10 - HIPÓTESES PARA ETIOPATOGENIA DO TCA DE CRIANÇAS DO PARANÁ.	101

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE POR <i>DAX-1</i>	25
QUADRO 2 - ZONAS FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL ADULTO	29
QUADRO 3 - SÍNDROMES GENÉTICAS QUE PREDISPÕEM AOS TCAs.	36
QUADRO 4 - PARÂMETROS MORFOLÓGICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA MALIGNIDADE OU BENIGNIDADE DOS TUMORES ADRENOCORTICAIS	59
QUADRO 5 - ESTADIAMENTO DOS TCAs	60
QUADRO 6 - REFERÊNCIAS RELATIVAS À HIPÓTESE SOBRE A ETIOPATOGENIA DO TCA DE CRIANÇAS DO PARANÁ	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ad4BP	-	<i>Adrenal 4 binding protein</i>
ACTH	-	corticotropina
<i>ABL1</i>	-	<i>v-abl Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
AF-1	-	domínio de função de ativação proximal - 1
AF-2	-	domínio de função de ativação clássico - 2
BAC	-	<i>bacterial artificial chromossome</i>
<i>CCND1</i>	-	gene ciclina D1
cDNA	-	DNA complementar
CEGEMPAC	-	Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças
CID	-	Classificação Internacional de Doenças
CYP	-	<i>cytochrome P450</i>
DAPI	-	<i>4',6-Diamidino-2-phenylindole</i>
DATASUS/MS	-	Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde/ Ministério da Saúde
<i>DAX-1</i>	-	<i>dosage-sensitive sex reversal adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene</i>
DBD	-	<i>DNA binding domain</i>
DHEA	-	deidroepiandrosterona
DHEA-S	-	sulfato de deidroepiandrosterona
DMRBE	-	modelo de microscópio confocal para análise por fluorescência e obtenção de imagem digital
DNA	-	ácido desoxirribonucléico
DSS	-	reversão sexual sensível a dosagem
d-UTP	-	deoxiuridina trifosfato
EGF	-	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	-	<i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>ERBB1</i>	-	<i>avian erythroblastic leukemia viral (v-erbB) oncogene homolog (ErbB1); EGFR</i>
<i>ERBB2</i>	-	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
EUA	-	Estados Unidos da América
FISH	-	<i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
FITC	-	<i>Fluorescein isothiocyanate</i>
FSH	-	Hormônio folículo estimulante
Ftz-F1	-	<i>Fushi tarazu factor</i>
HAC	-	Hipoplasia adrenal congênita
HC-UFPR	-	Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná
<i>H19</i>	-	<i>imprinted maternally expressed untranslated mRNA</i>
HEG-LPCC	-	Hospital Erasto Gaertner, Liga Paranaense de Combate ao Câncer
<i>Her-2/neu</i>	-	o mesmo que <i>ERBB2</i>
HHG	-	hipogonadismo hipogonadotrófico
IARC	-	<i>International Agency Research Cancer</i>
IBGE	-	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPACTR	-	<i>International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry</i>
Ki67	-	antígeno nuclear associado à proliferação
KTS	-	amino acids lysine, threonine and serine
LBD	-	<i>ligand binding domain</i>
LCN2/NGAL	-	lipocalina 2
LFL	-	síndrome de Li e Fraumeni <i>similar</i>

LFS	-	síndrome de Li e Fraumeni
LH	-	hormônio luteinizante
LOH	-	perda de heterozigose
LRH-1	-	<i>liver receptor homolog 1</i>
MC2R	-	<i>melanocortin 2 receptor</i> (receptor do ACTH)
MIS	-	substância inibidora das estruturas de Müller
MYCN	-	<i>v-myc myelocytomatosis viral related oncogene</i>
Nb	-	Neuroblastoma
NCor	-	<i>nuclear receptor co-repressor 1</i>
NR5A1	-	<i>nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>
NR0B1	-	<i>nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1</i>
OMS	-	Organização Mundial da Saúde
PAGE	-	Eletroforese em gel de poliacrilamida
PBS	-	tampão fosfato com salina
p53	-	Gene p53
p57/KIP2	-	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)</i>
PCR	-	reação de polimerase em cadeia
pH	-	potencial hidrogeniônico
pKa	-	constante de ionização
PVDF	-	difluoreto de polivinilideno
RLT	-	<i>RNA later RNA Stabilization Reagent</i>
RNA	-	ácido ribonucléico
RNAc	-	RNA complementar
R337H p53	-	mutação do gene p53, no códon 337, com substituição de arginina por histidina
RX	-	raio X
RXR	-	receptor X retinóide alfa
SDS	-	dodecil de sulfato de sódio
SEER	-	<i>Surveillance Epidemiologyc End Results</i>
SF-1	-	fator esteroideogênico 1
SHP	-	<i>small heterodimer partner</i>
SIM	-	Sistema de Informação de Mortalidade
SKP2	-	<i>S-phase kinase-associated protein 2</i>
SRY	-	<i>sex determining region Y</i>
StAR	-	proteína reguladora da esteroideogênese aguda
TCA	-	tumor de córtex adrenal
TGF α	-	<i>transforming growth factor, alfa</i>
TGFBR1	-	<i>transforming growth factor, beta receptor 1</i>
TN	-	Tennessee
TNF	-	<i>tumor necrosis factor</i>
TRAF-1	-	<i>TNF receptor associated proteins</i>
TSC	-	<i>tuberous sclerosis</i>
3 β -HSD	-	3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
UFPR	-	Universidade Federal do Paraná
VAV-2	-	vav, oncogene derivado de um locus expresso nas células hematopoéticas
WHO	-	<i>World Health Organization</i>
WT-1	-	gene associado ao desenvolvimento do tumor de Wilms
ZF	-	zona fetal
ZR	-	zona reticular

LISTA DE SÍMBOLOS

cm ³	-	centímetros cúbicos
dl	-	decilitro
g	-	grama
°C	-	graus Celsius
kDa	-	kilodalton
µg	-	microgramas
µl	-	microlitros
mA	-	miliampere
ml	-	mililitros
mµ	-	milimicra
%	-	por cento
V	-	volts

RESUMO

Estudos mostram que a incidência do tumor de córtex adrenal (TCA) é 10 a 15 vezes maior no estado do Paraná quando comparada à de outras regiões do mundo. Mutação germinativa *TP53* R337H foi descrita em mais de 90% das crianças atendidas no Hospital de Clínicas da UFPR. Os objetivos deste estudo foram: 1) identificar o coeficiente de mortalidade por TCA na região metropolitana de Curitiba com dados de base populacional, como meio de corroborar a estimativa de maior incidência. Para cálculo do coeficiente de mortalidade, foram analisadas as declara es de óbito por TCA do período de 1998 a 2003; 2) a partir do conhecimento da amplifica o do 9q34 e utilizando as técnicas de FISH e *western blot*, estudar o gene *SF-1* e a sua expressão, acreditando-se que estejam amplificados nos TCAs. A amplifica o do *SF-1* foi avaliada por FISH em 9 tumores fixados em parafina, previamente estudados por hibridiza o genômica comparativa, e avaliada em outros 10 tumores, cujas amostras estavam também disponíveis em tecido congelado, por FISH e *western blot* 3) estudar a expressão de transcritos e de proteínas do gene *DAX-1*, um dos principais fatores contra reguladores do *SF-1*, ambos importantes para o desenvolvimento e manuten o do córtex adrenal. Três amostras de tecido adrenocortical normal foram usadas como controle. Os resultados foram: (1) coeficiente de mortalidade padronizado para idade, 1,6/milhão de crianças abaixo de 15 anos. Como a letalidade por TCA nesta região   de 45%, conclui-se que a incidência do TCA seja 3,5 casos/milhão de crianças abaixo de 15 anos, ou seja, confirma a incidência estimada em publica es anteriores; (2) encontrou-se que o gene *SF-1* está amplificado em 89 % dos 9 tumores e em 60% dos 10 tumores. O número médio de cópias do gene *SF-1*, $3,26 \pm 0,83$, encontrado,   compatível com um aumento médio de 6,9 vezes na expressão protéica em rela o ao córtex adrenal normal. Estes achados não tiveram correla o com idade e estadiamento, nem diferiram com o sexo, forma clínica, histologia ou evolu o; (3) foi encontrado aumento da concentra o de transcritos de *DAX-1* e aumento da expressão protéica em 13 tumores analisados. Os adenomas e carcinomas apresentaram valores maiores do que o córtex adrenal normal. Não foi encontrada associa o entre os valores de *DAX-1*, os achados laboratoriais e a forma clínica. A expressão aumentada de *SF-1* e de *DAX-1* sugerem que estes genes possam estar envolvidos na patog nese do TCA.

Palavras-chave : tumor de córtex adrenal, incidência, mortalidade, *SF-1*, *DAX-1*

ABSTRACT

Reports in the literature claim that the incidence of adrenocortical tumor (ACT) in the State of Parana (southern Brazil) is 10 to 15 times higher than that in other parts of the world. A germline *TP53 R337H* mutation was originally described in more than 90% of the children seen in the Department of Pediatrics of the Federal University of Parana. The aims of this study were: 1) to identify the mortality coefficient due to ACT in the Curitiba (capital of Paraná) metropolitan area, using population database as a means to corroborate the assertive that the above mentioned incidence holds correct; to calculate the mortality coefficient, death declaration filled during the period 1998-2003 were reviewed; 2) based on the knowledge gathered after the amplification of 9q34 and utilizing FISH and western blot analysis, to study the *SF-1* gene and its expression to see whether they are amplified in the ACT; the amplification of *SF-1* was evaluated by the FISH method in 9 and previously studied by comparative genomic hybridization; and in 10 others with available frozen tumors, by both FISH and western blot (two samples of normal adrenocortical gland were equally evaluated); and 3) to study the expression of transcripts and proteins of the *DAX-1* gene, that is a key factor in the regulation of the *SF-1* gene and plays, with SF-1, an important role in the development of the adrenal cortex. The following results were obtained: 1) a standardized for age mortality coefficient of 1.6/million children ≤ 15 y of age; as lethality due to ACT in the Curitiba area is around 45%, it can be concluded that the incidence of ACT is 3.5 cases/million children ≤ 15 y of age, confirming previous studies; 2) an amplification of *SF-1* gene was found in 89 and 60% in the groups of 9 and 10 tumors respectively; the mean number of copies of *SF-1* gene was 3.3 ± 0.83 which is compatible with a mean of 6.9 fold increase of protein expression when compared to the control; however these findings had no correlation with age, sex, clinical presentation, tumor staging, histology and survival; 3) a significant augment of DAX-1 transcripts and protein expression was found in 13 tumors analyzed; adenomas and carcinomas exhibit highest values, followed by normal tissue; when DAX-1 values were compared to clinical and laboratory aspects no relation was found. In summary, these data confirmed the high incidence of ACT previously reported and that possibly *SF-1* and *DAX-1* could play a role in the pathogenesis of ACT.

Key-words: adrenocortical tumor, incidence, mortality, *SF-1*, *DAX-1*.