

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**

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**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, do Departamento de Pediatria do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Bonald Cavalcante
de Figueiredo

CURITIBA

2005

BC/MUFPR
DOAÇÃO: autor
R\$ 15,00
08/12/2005

PY000111061

INC/MUFPR - MEMORIA DA UNIVERSIDADE F. DO PARANA
AUTOR
R\$ 10.00 - Doacao
Termo No. 41/06 Registro: 385,870
06/03/2006

UFPA - Sistema de Bibliotecas



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE PEDIATRIA

*Programa de Pós-Graduação Mestrado e Doutorado
em Saúde da Criança e do Adolescente*

Parecer

*A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, do Setor de Ciências Saúde, da Universidade Federal do Paraná, após argüir a Doutoranda **Mara Albanei Dudgeque Pianovski** em relação ao seu trabalho de Tese intitulado “Aspectos Epidemiológicos e Expressão de SF-1 e DAX-1 dos Tumores de Córtex Adrenal de Crianças no Estado do Paraná” é de parecer favorável à **Aprovação** da aluna, habilitando-a ao título de Doutor em Saúde da Criança e do Adolescente, área de concentração em **Hemato-Oncologia Pediátrica**.*

Curitiba, 28 de julho de 2005.

Bonald Cavalcante
Professor Bonald Cavalcante de Figueiredo
UFPR - Orientador e presidente da banca examinadora

Beatriz de Camargo
Professora Beatriz de Camargo
FAP-SP - Primeira examinadora

Enilze de Seixas
Professora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro
UFPR - Segunda examinadora

Luiz Gonzaga Tone
Professor Luiz Gonzaga Tone
USP-RP - Terceiro examinador

João Carlos Domingues Repka
Professor João Carlos Domingues Repka
PUC-PR - Quarto examinador

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 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 SF-1 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 patogênese 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*.

1 INTRODUÇÃO

Os relatos de casos de tumor de córtex adrenal (TCA) são raros e sua incidência é semelhante para a maioria dos países, variando entre 0,2 na França (DESANDES et al., 2004) a 0,38/milhão de crianças até 15 anos de idade na Inglaterra (BIRCH e BLAIR, 1988). Nos Estados Unidos, a estimativa é de que a incidência seja de 0,3 por milhão de crianças até 20 anos (BERNSTEIN e GURNEY, 1999).

A primeira evidência de incidência aumentada de TCA foi reportada por MARIGO, MULLER e DAVIES (1969), em crianças de São Paulo. Estes autores analisaram o registro de uma única instituição, a Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, e avaliaram 520 casos de neoplasia maligna, dentre os quais o TCA representava 2,3% dos tumores sólidos, ou seja, 12 casos em 15 anos, sugerindo que esse tipo de tumor poderia ser mais freqüente em São Paulo do que em outras regiões do Brasil. Entretanto, somente no Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR), foram atendidos 73 novos pacientes com TCA em 31 anos (1966-1996). Utilizando-se esses dados do HC-UFPR e considerando-se que outras instituições paranaenses atenderam crianças com TCA durante o período citado, foi possível estimar uma incidência de TCA de 3,4 casos novos/milhão de crianças até 15 anos de idade (SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997). Esse cálculo foi realizado para uma população paranaense total estimada em 10 milhões, sendo 3.500.000 crianças abaixo de 15 anos, e mostra uma incidência aumentada de TCA no Estado do Paraná, de 10 a 15 vezes maior do que em países com registros de câncer consolidados.

No registro de base populacional de Goiânia foram observados, no período de 1989-1994, 4 casos de TCA, com incidência padronizada por idade de 2,8 casos por milhão de crianças até 14 anos de idade (PARKIN et al., 1998). Este dado sugere uma incidência aumentada também nessa região, localizada a 1186 km de Curitiba, no sentido noroeste.

A incidência elevada de TCA no Paraná permite supor que a causa básica seja de ordem genética e biológica. Este estudo foi idealizado com o objetivo de propor um modelo para esta relação, levando em consideração fatores etiopatogênicos e a

incidência de TCA.

Devido à falta de registro de câncer de base populacional, para cálculo da incidência de TCA no Paraná, surge como alternativa a utilização dos registros de óbito e dos dados de sobrevida já reportados para estimar indiretamente a incidência. A proporção de novos casos de TCA em relação ao neuroblastoma (Nb) adrenal (tumor com incidência e mortalidade semelhantes às de outros países), também foi usada como referência para estimar a real situação do TCA no Paraná. Parte-se do princípio que o Nb adrenal é cerca de 15 vezes mais freqüente do que o TCA (STEWART, JONES e JOLLEYS, 1974). Esses dados podem confirmar a estimativa inicial de que existe maior incidência de TCA nas crianças do Paraná (SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997).

Embora já tenham ocorrido avanços no conhecimento da base molecular dos TCAs, sua origem e sua progressão ainda não estão totalmente esclarecidas. Um achado importante nos casos de TCA no Paraná foi a mutação no gene de supressão tumoral, encontrada na linhagem germinativa (*TP53* R337H), em 97,2% das crianças avaliadas (RIBEIRO et al., 2001). Trata-se de uma mutação de ponto, cujo códon resultante (CAC) codifica o aminoácido histidina ao invés de arginina (CGC). Este estudo mostrou também que a perda somática do segundo alelo do gene *TP53* tem sido documentada em quase todos os casos. Além disso, 432 indivíduos do Sul do Brasil, sem TCA, foram avaliados e nenhum deles era portador da mutação *TP53* R337H (FIGUEIREDO et al., submetido), o que sugere ser esta a principal alteração responsável pela incidência aumentada de TCA nessa região. Uma análise preliminar revelou a mutação *TP53* R337H em 78% (14/18) das crianças e em 13% (5/37) dos adultos com TCA, em São Paulo (LATRÔNICO et al., 2001). No Paraná, a mesma mutação foi encontrada em 14% (2/14) dos pacientes adultos com TCA (dados não publicados). Essa mutação altera as propriedades funcionais da proteína, em determinadas circunstâncias. Quanto maior o pH intracelular, acima de 7,0, e/ou a temperatura, acima de 36,5°C, maior é a perda da função da proteína p53 (HAINAUT, 2002) o que justifica o grande acúmulo dessa proteína no núcleo da célula de TCA (RIBEIRO et al., 2001).

Estudos anteriores identificaram mutações no gene *p53* que desencadearam instabilidade cromossômica e formação de outras alterações genômicas (PATI et al., 2004; ATTARDI, 2005), as quais poderiam contribuir para o processo de carcinogênese no córtex adrenal. Empregando a técnica de hibridização genômica comparativa (HGC), foram avaliados nove casos de TCA, atendidos no HC-UFPR, e identificou-se ganho de 9q e amplificação de 9q34 em 8 de 9 casos (FIGUEIREDO et al., 1999). Em um estudo conduzido no Reino Unido, o resultado foi semelhante, sendo encontrada amplificação de 9q34 em 10 de 11 TCA de crianças (JAMES et al., 1999). Segmentos cromossômicos com amplificação geralmente alojam genes amplificados, e a amplificação do gene é uma das maneiras pelas quais se explica a participação de oncogenes na formação tumoral. A amplificação de 9q34 poderia ser decorrente de instabilidade cromossômica, causada pelo mutante *TP53* R337H ou por outro tipo de mutação. A identificação de gene amplificado em 9q e seu papel são etapas na caracterização biológica do TCA de crianças. Um dos candidatos pesquisados foi o gene do fator esteroidogênico 1 (*SF-1*), que é um membro órfão da família de receptores nucleares de fatores de transcrição e tem papel importante na regulação da esteroidogênese, desenvolvimento e manutenção do córtex adrenal (RICE et al., 1991; IKEDA et al., 1993; WONG et al., 1997; PARKER e SCHIMMER, 1997; BEUSHCLEIN et al., 2002). O gene *SF-1* se localiza em 9q33.3, a região que poderia ter sido incluída na HGC de TCA da criança como 9q34 (FIGUEIREDO et al., 1999; JAMES et al., 1999). Estudos em camundongos geneticamente modificados (GM), sem *SF-1*, mostraram que o córtex adrenal se tornou hipoplásico algum tempo depois do desenvolvimento embrionário (LUO, IKEDA e PARKER, 1994; BLAND et al., 2000) e que *SF-1* é essencial para o crescimento da glândula adrenal residual após adrenalectomia unilateral (BEUSCHLEIN et al., 2002).

Durante os primeiros oito meses de vida, o volume da adrenal humana é reduzido de 70 a 3%, e a contagem das células parenquimatosas do córtex adrenal, de 40 a 5% do total ao nascimento (BOCIAN-SOBKOWSKA, WOZNIAK e MALENDOWICZ, 1998). A situação de hiperproliferação e hipertrofia seguida de morte celular programada das células da zona fetal (ZF) torna o córtex adrenal mais

propício à formação do TCA, seja por falha no mecanismo de proliferação ou de morte celular, na ZF, zona reticular ou numa das outras duas camadas. Por todas essas evidências, acredita-se que alguns TCAs sejam de origem embrionária, período no qual a participação de *SF-1* é intensa. Devido à atividade esteroidogênica aumentada na maioria dos casos de TCA da criança, é objetivo deste estudo avaliar a expressão de *SF-1* e também, como fator contra-regulador, o *Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia critical region on chromosome X, gene 1 (DAX-1)*.

O *DAX-1* atua como regulador negativo da ativação de transcrição induzida por *SF-1* (ITO e JAMESON, 1997; LALLI et al., 1998), ligando-se às regiões promotoras dos genes regulados por *SF-1*, como o gene *StAR*, (ZAZOPOULOS et al., 1997), ou ligando-se à molécula de *SF-1* através de um dos motivos LXXLL presentes na região N-terminal do *DAX-1* (SUZUKI et al., 2003).

Estudos em tumores de ovário e mama têm sugerido um papel para *DAX-1* no desenvolvimento tumoral, além de ser um provável fator prognóstico (ABD-ELAZIZ et al., 2003; CONDE et al., 2004). A expressão de *DAX-1* foi estudada em TCA de adultos, mas não em TCA de crianças (REINCKE et al., 1998).

Assim, é importante avaliar a real incidência e as características biológicas do TCA. Trata-se de estudo não clínico, mas que se inspirou em bases epidemiológicas e moleculares. Os trabalhos inéditos desta tese, e outros previamente publicados deram a sustentação necessária para se chegar a um conceito final sobre esta relação, etiopatogenia e incidência do TAC no Paraná, como mostrado adiante.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivos Gerais

1. Conhecer a mortalidade por TCA e estimar a incidência desses tumores nas crianças da região metropolitana de Curitiba (RMC).

2. Avaliar a participação de *SF-1* e *DAX-1* nos TCAs de crianças da região sul do Brasil.

1.1.2 Objetivos Específicos

1. Calcular a taxa de mortalidade por TCA, padronizada por idade, para as crianças da RMC.

2. Calcular a taxa de incidência de TCA, padronizada por idade, nas crianças da RMC.

3. Comparar a taxa de mortalidade, padronizada por idade, por Nb adrenal, na RMC, com a taxa de mortalidade padronizada por idade, por TCA, na mesma região.

4. Verificar se o gene *SF-1* está amplificado, e quanto, nos TCAs de crianças da região sul do Brasil.

5. Verificar se a expressão protéica de *SF-1* está aumentada nos TCAs de crianças da região sul do Brasil e compará-la com manifestações clínicas e laboratoriais de crianças com TCA.

6. Analisar os transcritos e a expressão protéica de *DAX-1* nos TCAs da região sul do Brasil e compará-los com manifestações clínicas e laboratoriais de crianças com TCA.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INCIDÊNCIA DOS TUMORES DE CÓRTEX ADRENAL, SOBREVIDA E MORTALIDADE

Câncer na criança é relativamente incomum, sendo que nos Estados Unidos, a cada ano, aproximadamente 1 em 7000 crianças, até a idade de 14 anos, recebe o diagnóstico de câncer (SMITH e RIES, 2002). As neoplasias mais freqüentes são as leucemias e os tumores de sistema nervoso central. Segundo dados do *Surveillance Epidemiology and End Results* (SEER), os carcinomas correspondem a 9,2 % e, dentre eles, apenas 1,3 % são de córtex adrenal, ou seja, 0,12% do total (BERSTEIN e GURNEY, 1999).

Quando se analisa a incidência de câncer nos países da Europa ocidental, América do Norte, Japão e Austrália, verifica-se que ela é uniforme, com variações que representam somente entre 10 a 15 % daquela observada para crianças brancas nos Estados Unidos (STILLER e PARKIN, 1996). A maior variação ocorre para leucemias linfóides agudas e tumores de sistema nervoso central. Comparações entre os países devem ser feitas com cuidado, devido à variabilidade na precisão dos registros de câncer, a representatividade, que pode atender apenas a uma fração da população, além da possível falta de diagnóstico e notificação de alguns casos, o que pode levar a estimativas de incidência inadequadamente baixas (PARKIN et al., 1998; TERRACINI et al., 2001; DESANDES et al., 2004).

No entanto, quando se analisa a incidência de carcinoma adrenal nas crianças, as séries publicadas são invariavelmente uniformes (PARKIN et al., 1998; BERSTEIN e GURNEY, 1999; SMITH e RIES, 2002) quanto à raridade dessa neoplasia, exceto para o Sul do Brasil, cujas publicações demonstram uma incidência elevada. MARIGO, MULLER e DAVIES (1969) publicaram um trabalho revisando os diferentes tipos de cânceres na infância, encontrados em um período de 14 anos, nos pacientes atendidos na Santa Casa de Misericórdia

de São Paulo, no período de 1952 a 1965; entre 520 casos, somente 12 TCAs foram identificados, representando 2,3% de todos os tumores sólidos da série.

No Paraná, na mesma época, foi notada maior frequência desta neoplasia no Serviço de Pediatria do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (HC-UFPR) em relação à casuística observada, no Hospital de Niños de Buenos Aires (BRUCK et al., 1969; SANDRINI, 1993).

Entre 1989 e 1992, foram atendidos, no HC-UFPR, 23 pacientes com diagnóstico de TCA, com uma média de 5,75 pacientes/ano e, de 1983 a 1992, a média foi de 3,6/ano. Baseado nestes dados, SANDRINI (1993) inicialmente propôs que a incidência no Paraná seria de, no mínimo, 4 a 5 vezes maior (0,97 a 1,55 por 1.000.000 de crianças até 16 anos) do que a mundial (PARKIN et al., 1998)(Tabela 1). Em publicação posterior, observou-se que 73 crianças com idade até 15 anos foram admitidas no HC-UFPR, no período de 1966 a 1996 (SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997), com esse mesmo diagnóstico. Levando-se em consideração o relato de colegas de outras instituições do Paraná, que atendiam crianças com TCA, estes autores propuseram que a incidência nesse Estado poderia ser de 3,4 - 4,2/milhão de crianças abaixo de 15 anos, 10 a 15 vezes superior àquelas referidas para outros países (PARKIN et al., 1998). Os dados não são precisos porque a notificação dos casos de TCA não é obrigatória e, possivelmente, muitos estão sendo atendidos por colegas que não os publicaram nem registraram.

LIU e KAY (2000), em revisão sobre TCA na criança, referem que “a literatura apresenta dois grandes grupos de populações de TCA pediátricos: o primeiro vem do sul do Brasil (Curitiba), onde a alta incidência rivaliza com taxas locais de tumor de Wilms, neuroblastoma e linfoma não-Hodgkin. O segundo grupo de pacientes vem do restante do mundo.” De fato, quando se analisa a distribuição das neoplasias da criança no HC-UFPR, observa-se que, nos últimos 10 anos, foram atendidas 585 crianças com neoplasias, das quais 7% eram TCA, 5,8% eram neuroblastomas e 4,1% eram tumores de Wilms (dados não publicados).

TABELA 1 - TAXA DE INCIDÊNCIA DE CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL POR MILHÃO, PADRONIZADA POR IDADE E CUMULATIVA (0-14)

Continua

	SEXO MASCULINO		SEXO FEMININO		Casos	TOTAL		
	TIPI	Cum	TIPI	Cum		M/F	TIPI	Cum
ÁFRICA								
* ALGÉRIA, Sétif	-	-	-	-	0	-	-	-
* EGITO, Alexandria	-	-	-	-	0	-	-	-
* MALI, Bamako	-	-	-	-	0	-	-	-
* NAMÍBIA	-	-	-	-	0	-	-	-
* NIGÉRIA, Ibadan	-	-	-	-	0	-	-	-
* UGANDA, Campala	-	-	-	-	0	-	-	-
ZIMBÁBUE, Harare, Africanos	-	-	-	-	0	-	-	-
AMÉRICA: CENTRAL E SUL								
* BRASIL, Belém	1,7	29	-	-	2	-	0,8	13
BRASIL, Goiânia	4,1	53	1,4	18	4	3,0	2,8	36
COLÔMBIA, Cali	0,5	6	-	-	1	-	0,3	3
COSTA RICA	0,5	5	1,1	16	7	0,4	0,8	11
* CUBA	-	-	-	-	0	-	-	-
EQUADOR, Quito	-	-	-	-	0	-	-	-
* PERU, Lima	-	-	-	-	0	-	-	-
PORTO RICO	0,3	3	-	-	1	-	0,1	1
URUGUAI	-	-	0,5	8	1	-	0,2	3
AMÉRICA DO NORTE								
CANADÁ	-	-	0,2	3	5	-	0,1	1
EUA, Vale do Brancos (não-negros)	0,5	6	0,2	2	4	3,0	0,3	4
EUA, Greater Delaware Valley, Negros	-	-	-	-	0	-	-	-
EUA, Los Angeles, Hispânicos	0,3	4	-	-	1	-	0,1	2
EUA, Los Angeles, não-Hispânicos Brancos	0,4	4	0,4	5	2	1,0	0,4	4
EUA, Los Angeles, Negros	-	-	-	-	0	-	-	-
EUA, Nova Iorque, Brancos	-	-	0,3	4	4	-	0,2	2
EUA, Nova Iorque, Negros	0,7	8	-	-	2	-	0,3	4
EUA, SEER, Brancos	0,2	2	0,2	3	8	1,0	0,2	3
EUA, SEER, Negros	-	-	-	-	0	-	-	-
EUA, SEER, Havaí, Havaianos	-	-	-	-	0	-	-	-
ÁSIA								
CHINA, Tianjin	-	-	-	-	0	-	-	-
HONG KONG	0,2	2	-	-	1	-	0,1	1
* ÍNDIA, Bangalore	-	-	-	-	0	-	-	-
ÍNDIA, Bombaim	0,1	1	0,1	0	3	2,0	0,1	1
* ÍNDIA, Deli	-	-	-	-	0	-	-	-
ÍNDIA, Madras	-	-	-	-	0	-	-	-
* ÍNDIA, Poona	0,2	3	-	-	1	-	0,1	1
ISRAEL, Judeus	-	-	0,4	5	2	-	0,2	2
ISRAEL, não-Judeus	0,7	8	-	-	1	-	0,3	4
* JAPÃO	0,1	1	0,4	5	9	0,3	0,3	3
JAPÃO, Osaka	-	-	0,3	4	2	-	0,1	1
CORÉIA, Seul	0,3	4	0,2	3	2	1,0	0,3	4
KUWAIT, Kuwaiti	-	-	0,7	8	1	-	0,3	4
KUWAIT, não-Kuwaiti	-	-	0,8	10	1	-	0,4	5
* FILIPINAS, Manila & Rizal	-	-	0,2	2	2	-	0,1	1
CINGAPURA, Chineses	-	-	0,4	6	1	-	0,2	3
CINGAPURA, Malásia	-	-	-	-	0	-	-	-

TABELA 1 – TAXA DE INCIDÊNCIA DE CARCINOMA DE CÓRTEX ADRENAL POR MILHÃO, PADRONIZADA POR IDADE E CUMULATIVA (0-14)

Conclusão

	SEXO MASCULINO		SEXO FEMININO		Casos	TOTAL		
	TIPI	Cum	TIPI	Cum		M/F	TIPI	Cum
TAILÂNDIA	-	-	-	-	0	-	-	-
VIETNÃ, Hanói	-	-	-	-	0	-	-	-
EUROPA								
* BULGÁRIA	0,1	1	0,1	1	2	1,0	0,1	1
* CROÁCIA	-	-	-	-	0	-	-	-
REPÚBLICA CHECA	0,1	1	0,5	6	6	0,2	0,3	3
DINAMARCA	-	-	-	-	0	-	-	-
ESTÔNIA	-	-	-	-	0	-	-	-
FINLÂNDIA	-	-	0,5	6	2		0,2	3
FRANÇA	0,3	4	0,1	1	4	3,0	0,2	3
FRANÇA, Lorraine	0,5	5	0,5	6	2	1,0	0,5	6
FRANÇA, PACA & Corsica	0,3	3	-	-	1		0,2	2
ALEMANHA, antigamente Oriental	0,1	2	0,4	5	7	0,4	0,2	3
ALEMANHA, antigamente Ocidental	0,0	0	0,2	3	7	0,2	0,1	1
ALEMANHA	0,1	1	0,1	1	6	1,0	0,1	1
* HUNGÁRIA	0,1	2	-	-	1		0,1	1
ISLÂNDIA	-	-	-	-	0	-	-	-
ITÁLIA	0,2	2	-	-	1	-	0,1	1
ITÁLIA, Piemonte	0,5	6	-	-	1	-	0,3	3
HOLANDA	-	-	0,2	2	1	-	0,1	1
NORUEGA	0,5	6	-	-	2	-	0,2	3
* POLÔNIA	-	-	-	-	0	-	-	-
* PORTUGAL	-	-	-	-	0	-	-	-
ESLOVÁQUIA	0,1	2	0,3	4	3	0,5	0,2	3
ESLOVÊNIA	-	-	1,3	21	3	-	0,6	10
ESPAÑA	-	-	0,1	1	1	-	0,1	0
ESPAÑA, Valência	-	-	-	-	0	-	-	-
SUÉCIA	-	-	0,4	5	2	-	0,2	2
SUÍÇA	-	-	0,3	4	1	-	0,1	2
REINO UNIDO, Inglaterra e País de Gales	0,0	0	0,3	3	14	0,2	0,2	2
REINO UNIDO, Escócia	-	-	0,9	12	4	-	0,4	6
OCEANIA								
AUSTRÁLIA	0,4	5	0,3	4	12	1,4	0,4	4
NOVA ZELÂNDIA, Maori	1,7	23	0,9	12	3	2,0	1,3	17
NOVA ZELÂNDIA, não-Maori	0,5	6	-	-	2	-	0,3	3

FONTE: PARKIN et al. **International Incidence of Childhood Cancer**, vol. II, IARC Scientific Publication, nº 144, 1998. 500 p.

NOTAS: TIPI - Taxa de incidência padronizada por idade; Cum – incidência cumulativa; M/F – relação masculino/feminino.* indica que os registros podem ser incompletos

A sobrevida dos pacientes com TCA é aparentemente melhor para as crianças do que para os adultos (SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997; PATIL et al., 2002), variando de 50-85%. Na publicação da maior série de TCAs da criança, com 254 pacientes, a sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 52,4%, sendo que para os pacientes em estágio I, a sobrevida foi de 91,1% e, para aqueles em estágio II, de 52,7 % (MICHALKIEWICZ et al., 2004) (Tabela 2).

TABELA 2 - CLASSIFICAÇÃO DO TCA DE CRIANÇAS EM ESTÁDIOS E SOBREVIDA EM 5 ANOS, ESTIMADA PARA CADA ESTÁDIO

ESTADIO	DESCRIÇÃO	SOBREVIDA (5 ANOS)
I	Tumor pesando menos que 200g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia, ausência de metástase.	91,1 %
II	Tumor pesando mais que 200g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia, ausência de metástase.	52,7 %
III	Tumor residual ¹ ou que não pode ser ressecado.	-
IV	Metástase.	-

FONTE: MICHALKIEWICZ et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol*, v.22, n. 5, p.838-845, 2004.

NOTA: ¹Tumor residual é definido como a presença de tecido neoplásico microscópico após a ressecção cirúrgica.

Não são conhecidas publicações a respeito de mortalidade por TCA em crianças, exceto a de BARILI, GRASSI e CZEPIELEWSKI (1992), que fizeram este levantamento no Rio Grande do Sul, referente ao período de 1981 a 1991, e encontraram 124 óbitos, sendo 59 de crianças com menos de 15 anos. O método de coleta de dados, contudo, pode ser questionado, pois os diagnósticos citados nas declarações de óbito não foram conferidos com os médicos que os preencheram.

2.2 DESENVOLVIMENTO DO CÓRTEX ADRENAL

Para compreender melhor a origem do TCA, é importante saber que quase 70% dos casos pediátricos são diagnosticados nos primeiros 4 anos de idade (PEREIRA et al., 2004) e rever alguns conceitos e fenômenos que ocorrem durante o desenvolvimento do córtex adrenal.

SUCHESTON e CANNON¹, apud MESIANO e JAFFE (1997, p. 379) descrevem as seguintes fases de desenvolvimento do córtex adrenal: (1) condensação a partir do epitélio celômico (3-4 semanas de gestação); (2) proliferação e migração das células do epitélio celômico (4-6 semanas de gestação); (3) diferenciação morfológica das células do córtex adrenal fetal em duas zonas distintas (8-10 semanas de gestação); (4) declínio e desaparecimento da zona fetal (primeiros 3 meses pós-parto); (5) estabelecimento e estabilização do padrão zonal adulto (10-20 anos de idade). A estrutura da glândula adrenal mais precocemente reconhecida é referida por JIRASEK (1980) como “blastema adrenal” e surge na 5ª semana de gestação. As células destinadas à esteroidogênese adrenal e gonadal se originam igualmente do epitélio celômico, porção medial e ventral do mesonéfron, respectivamente, e são morfológicamente indistinguíveis (HATANO et al., 1996). Por volta da 8ª semana, as células do centro do blastema adrenal se diferenciam em células da zona fetal, enquanto que as células periféricas mantêm a morfologia blastematosa e formam a zona definitiva (UOTILA², apud MESIANO e JAFFE, 1997, p. 379).

As células da zona definitiva acumulam lipídios no citoplasma a partir do 4º mês de gestação, e se tornam esteroidogenicamente ativas, com a sua evolução tornando-se, ao final da gestação, semelhantes às células da zona glomerulosa do adulto. Estudos ultra-estruturais demonstraram uma terceira zona entre a fetal e a definitiva, com características intermediárias (MC NULTY e JONES³, apud MESIANO e JAFFE, 1997, p. 380), que foi chamada de “zona transicional” por MESIANO, COULTER e JAFFE (1992). Essas células têm a capacidade de sintetizar cortisol e são, portanto, análogas às células da zona fasciculada da adrenal adulta.

Logo após o nascimento, o córtex adrenal sofre intensa remodelação. KEENE e HEWER⁴ (apud MESIANO e JAFFE, 1997, p. 380) já haviam notado que, durante as

¹ SUCHESTON, M.E.; CANNON, M.S. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. **J Morphol.**, v. 126, n. 4, p. 477-491, 1968.

² UOTILA, U.U. The early embryological development of the fetal and permanent adrenal cortex in man. **Anat. Rec.**, v. 76, p. 183-203, 1940

³ MCNULT, N.S.; JONES, A.L. Observations on the ultrastructure of cytodifferentiation in the human fetal adrenal cortex. **Lab Invest**, v. 22, n. 6, p. 513-527, 1970

⁴ KEENE, M.F.L.; HEWER, E.E. Observations on the development of the human suprarenal gland. **J Anat**, v. 61, p. 302-324, 1927

primeiras 6 semanas de vida pós-natal, a adrenal se atrofia devido ao rápido desaparecimento da zona fetal.

SPENCER, MESIANO e JAFFE (1995) realizaram estudos que indicaram que o desaparecimento da zona fetal em humanos é essencialmente apoptótico. A dinâmica do crescimento cortical adrenal envolve hiperplasia celular, hipertrofia, migração e morte celular programada. O desenvolvimento do córtex adrenal embrionário (a partir de 4-5 semanas de gestação) ocorre por hiperplasia, como foi demonstrado pela atividade mitótica do blastema adrenal (JIRASEK⁵ apud MESIANO e JAFFE, 1997). Em torno de 10-12 semanas de gestação, a zona definitiva exibe numerosas figuras mitóticas, enquanto que na zona fetal elas são raras (JOHANNISSON, 1968). COULTER et al. (1996) demonstraram que a zona fetal do macaco *Rhesus* cresce primariamente por hipertrofia. Portanto, a zona fetal cresce por hipertrofia e proliferação limitada, enquanto a zona definitiva cresce principalmente por hiperplasia.

KEENE e HEWER⁶, apud MESIANO e JAFFE (1997, p. 380), descreveram a migração centrípeta de células contendo lipídios, da zona definitiva para a zona fetal. Acreditou-se assim que a zona definitiva era o compartimento de células tronco, germinativas, do qual derivavam as zonas corticais internas. Um segundo modelo propôs que uma população de células tronco indiferenciadas reside entre a zona glomerulosa e a zona fasciculada; essas células, que são caracterizadas pela ausência da enzima específica da zona interna, a 11 β -hidroxilase (CYP11 β 1), e da enzima da zona externa, a doxisterona sintase (CYP11 β 2), representam um precursor comum, que pode contribuir para formar as zonas corticais interna e externa (MITANI et al., 2003).

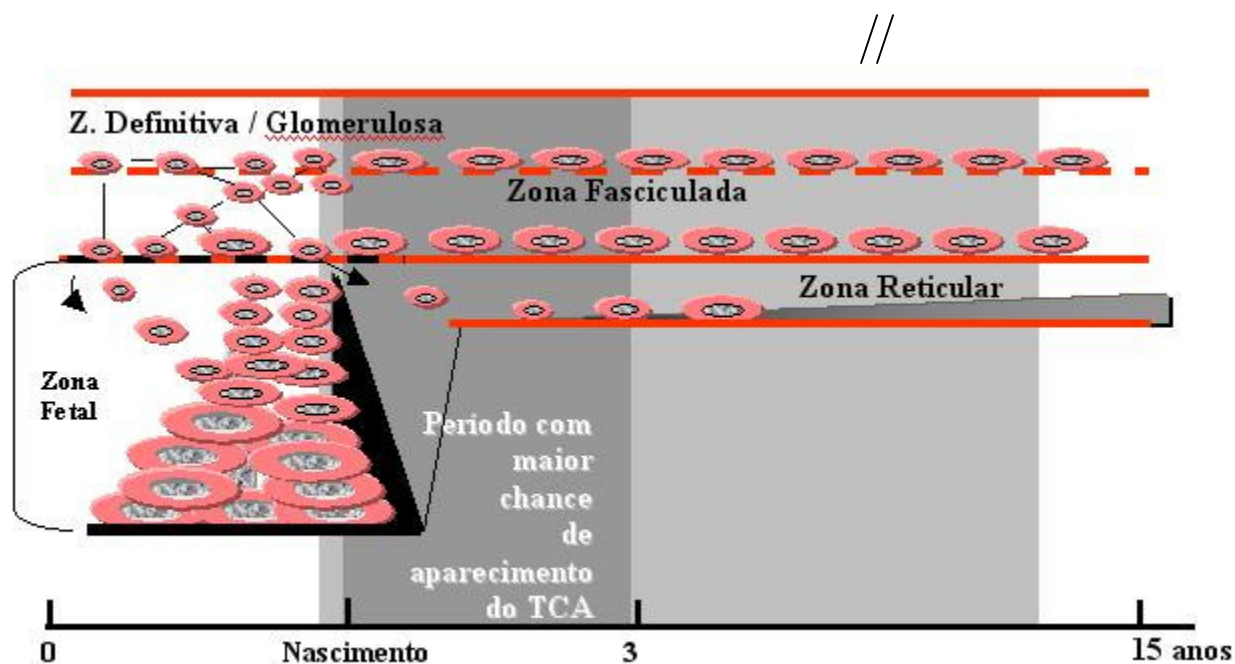
A medula da adrenal fetal é constituída por ilhotas de células cromafins que somente vão formar uma estrutura, e ainda rudimentar, na primeira semana pós-natal, para então adquirir características semelhantes à medula adrenal adulta ao redor dos 12 aos 18 meses (MESIANO e JAFFE, 1997).

⁵ JIRASEK, J. **Human fetal endocrines**. Martinus Nijhoff, London. P.69-82, 1980

⁶ KEENE, M.F.L.; HEWER, E.E. Observations on the development of the human suprarenal gland. **J Anat**, v.61, p.302-324, 1927

A Figura 1 apresenta uma ilustração das diferentes fases de desenvolvimento e apoptose da adrenal, salientando o período de intensa remodelação pós-natal, durante o qual acredita-se que ocorram os eventos iniciais para formação de tumor.

FIGURA 1 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL



FONTE: FIGUEIREDO et al., 2000. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 10, p. 1217-1224, 2000 (Apêndice 2).

NOTA: A figura 1 representa o processo de proliferação das células das zonas definitiva e transitória (ZT), em contraste com a intensa programação de morte celular (apoptose) na zona fetal (em

preto) e o surgimento de uma camada interna (zona reticular). Ocorre uma migração centrípeta das células (setas) para a região interna do córtex adrenal precedendo à fase de hipertrofia. O período hipotético mais provável para a formação do TCA (área retangular em cinza escuro), seguida por uma segunda fase crítica (área cinza claro) são propostos. Estes dois períodos críticos são baseados na faixa etária mais comum de diagnóstico e o tempo em que os sintomas começaram a se manifestar.

2.2.1 Participação dos Fatores de Transcrição

Vários genes codificadores de fatores de transcrição têm sido ligados ao desenvolvimento adrenal; em geral, eles afetam também o desenvolvimento urogenital, conforme se pode deduzir de mutações em humanos e modelos GM. Entre eles, três chamam a atenção, seja pelo seu papel como gene supressor de tumor (*WT-1*) ou pela sua atuação no desenvolvimento adrenal e esteroidogênese (*SF-1* e *DAX-1*).

2.2.1.1 *WT-1*

WT-1 é um gene supressor de tumor, cuja alteração de função pode levar ao desenvolvimento do tumor de Wilms e outros tumores derivados do blastema metanéfrico (CALL et al., 1990; HABER et al., 1990). Mutações do gene *WT-1* são associadas com anomalias congênitas do desenvolvimento urogenital (LITTLE e WELLS, 1997). Não se esperava que o *WT-1* fosse importante para o desenvolvimento da adrenal, pois ele não é expresso no *primordium* adrenal, mas somente nos precursores de etapas anteriores, ou seja, células progenitoras adreno-gonadais (SCHEDL e HASTIE, 1998; PARKER e SCHIMMER, 2001). No entanto, evidências contundentes para o seu papel vieram de análises de camundongos GM sem *WT-1*. Conforme se previa, a partir da observação de pacientes, esses camundongos não apresentaram rins nem gônadas; mas, também não apresentaram adrenais (MOORE et al., 1999). O *WT-1* pode apresentar dois transcritos secundários ao processamento do RNA (*splicing* diferencial), resultando em proteínas que diferem entre si pelos aminoácidos lisina-treonina-serina (Lys-Thr-Ser), e são designadas como isoformas KTS+ e KTS-. A

inativação da isoforma KTS- causou agenesia gonadal em ambos os sexos, provavelmente devido à inibição da transcrição de *SF-1*. A inativação da isoforma KTS+ não impediu o desenvolvimento ovariano, mas sim a diferenciação testicular e, conseqüentemente, o fenótipo masculino normal (HAMMES et al., 2001).

Estudos com hibridização *in situ* demonstraram que a expressão de *SF-1* é acentuadamente diminuída em camundongos GM sem *WT-1*, sugerindo um modelo hierárquico, no qual o *WT-1* contribui para o desenvolvimento gonadal (e talvez adrenal), por induzir a expressão de *SF-1* na linhagem precursora adrenogonadal. É pouco provável que o *WT-1* contribua para a função adrenal, pois ele é silenciado antes do início da expressão dos genes alvo que constituem o fenótipo adrenal diferenciado (HAMMES et al., 2001).

2.2.1.2 O fator esteroideogênico-1 (*SF-1*)

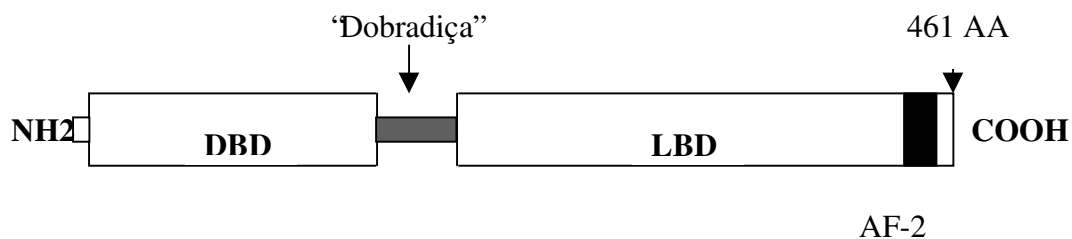
O *SF-1* é um membro da superfamília de receptores nucleares órfãos, também conhecido como *Adrenal-4-binding protein (Ad4BP)* e classificado como NR5A1. O gene *SF-1* localiza-se no cromossomo 9q33 (TAKETO et al., 1995) e apresenta forte homologia ao receptor nuclear *Fushi tarazu factor (Ftz-F1)* da *Drosophila* e ao receptor nuclear do camundongo *long terminal repeat-binding protein (TSUKIYAMA et al., 1992)*. O *SF-1* codifica a transcrição de uma proteína nuclear de aproximadamente 53 kDa, que se liga às regiões promotoras dos genes alvo e reconhece variações da seqüência de DNA PyCAAGGPyC ou PuPuAGGTCA, como monômeros (WILSON, FAHRNER e MILBRANDT, 1993). Recebeu o nome de fator esteroideogênico-1 devido ao seu papel chave na regulação das enzimas esteroideogênicas. Os laboratórios de PARKER e de MOROHASHI, clonaram, independentemente, cDNAs codificadores de SF-1 (LALA, RICE e PARKER, 1992; HONDA et al., 1993).

2.2.1.3 A estrutura da proteína SF-1

Os receptores nucleares geralmente apresentam características comuns como o domínio de ligação ao DNA (DBD), o domínio de ligação ao ligante (LBD) e dois domínios de ativação, um amino-terminal, chamado função de ativação 1 (AF-1) e um carboxi-terminal, o AF-2, cuja atividade é normalmente dependente da presença de um ligante (MANGELSDORF et al., 1995). Em todas as espécies estudadas, o SF-1 apresenta um DBD clássico, caracterizado por duas estruturas em dedos de zinco na região N-terminal, que intermediam sua ligação ao DNA (HAMMER e INGRAHAM, 1999) (Figura 2).

A conservação do domínio AF2 sugere que um ligante possa intermediar a transativação dependente de SF-1. A proteína SF-1 tem uma seqüência de 461 aminoácidos e é altamente homóloga à de outras espécies incluindo humanos, gado, carneiros, cavalos, camundongos, ratos, porcos, galinhas, tartarugas, salmões e vermes (OBA et al., 1996; PARKER et al., 2002).

FIGURA 2 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SF-1



FONTE: Modificado de VAL et al. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl Recept**, v. 1, n. 1, p. 8-31, 2003

NOTA: É um exemplo de um receptor nuclear que se liga ao DNA como um monômero. Na estrutura de SF-1 se destacam 3 partes, a que se liga ao DNA (DBD), a que se liga ao seu ligante (LBD) e a relacionada com a transativação (AF-2).

2.2.1.4 A expressão do *SF-1* nos tecidos adultos

Em relação aos tecidos esteroidogênicos adultos, IKEDA et al. (1993) mostraram que o padrão de expressão do *SF-1* geralmente se correlaciona com os papéis a ele propostos na regulação das enzimas responsáveis pela síntese de esteróides (HATANO et al., 1994). Assim, a proteína SF-1 foi detectada nas células do córtex adrenal, células testiculares de Leydig, e células da teca e granulosa do ovário. SF-1 foi também verificada na placenta, que produz grande quantidade de progesterona a partir do colesterol, e também converte andrógenos adrenais a estradiol (HONDA et al., 1993; BAMBERGER et al., 1996).

2.2.1.5 A expressão do *SF-1* nos tecidos embrionários

Os perfis de expressão do *SF-1*, espacial e temporal, foram estudados, nos tecidos embrionários de camundongos (IKEDA et al., 1994). Como foi demonstrado por hibridização *in situ*, transcritos de *SF-1* foram detectados no dia 9 de vida embrionária do camundongo (E9), no anel urogenital, que dá origem às células da adrenal, gônadas e mesonéfron. Posteriormente, a proteína SF-1 foi detectada em duas populações de células: um grupo adjacente à aorta dorsal, que representa os precursores adrenocorticais e um grupo maior, adjacente ao epitélio celômico, que representa os precursores gonadais.

Com respeito ao desenvolvimento adrenocortical, transcritos de *SF-1* foram detectados no *primordium* adrenal no dia E10-E10.5. Essa expressão precede nitidamente a da enzima P450_{scc}, detectada somente em E11, corroborando o conceito de que SF-1 é necessário para a expressão das enzimas esteroidogênicas. Em E12.5-E13.5, a expressão do *SF-1* se verifica no córtex adrenal (IKEDA et al., 1994).

Nas gônadas, a expressão do *SF-1* precede a do *SRY*, sendo detectado no E9. Nesse período, testículos e ovários não são distintos histologicamente, constituindo as gônadas bipotenciais ou indiferentes. Em E12.5, coincidindo com a formação dos cordões testiculares, a expressão do *SF-1* persiste e é detectada nas células esteroidogênicas de Leydig e nos cordões testiculares.

No ovário, ao contrário, há um aparente declínio dos transcritos do *SF-1* coincidindo com a diferenciação sexual gonadal, sugerindo que a diferenciação sexual

feminina normal é facilitada pela diminuição da expressão do *SF-1*. Suas concentrações no ovário permanecem baixas ou indetectáveis até o início do desenvolvimento folicular, quando *SF-1* é detectado nas células da teca e da granulosa, no estágio pré-antral, que precede a expressão da aromatase nas células da granulosa, concordando com o modelo que *SF-1* é um regulador essencial da expressão dessa enzima (MICHAEL et al., 1995).

2.2.1.6 Funções de SF-1 *in vivo*

Para avaliar o papel de SF-1 *in vivo*, foram estudados camundongos GM destituídos do gene *SF-1* (PARKER et al., 2002). Confirmando os achados de RICE et al. (1991) e LALA, RICE e PARKER (1992), os pesquisadores LUO, IKEDA e PARKER (1994) observaram que os animais sem *SF-1* morreram, por insuficiência adrenal, logo após o nascimento, além de exibirem reversão de sexo masculino para feminino no fenótipo genital, o que demonstra que o *SF-1* foi necessário para esteroidogênese gonadal e adrenal.

Por analogia com seres humanos, com ausência de expressão de enzimas esteroidogênicas, PARKER et al. (2002) imaginaram que as glândulas adrenais do camundongo GM sem *SF-1* poderiam ser hiperplásicas, devido à inabilidade de produzir glicocorticóides, com conseqüente exposição a altas concentrações séricas de corticotropina (ACTH); contudo, verificaram que as gônadas e adrenais estavam ausentes nesses camundongos. Estudos subseqüentes mostraram que na ausência do *SF-1*, as gônadas e adrenais estavam presentes nos estádios iniciais de desenvolvimento, seguidas de regressão. A identificação e análise de mutações do *SF-1*, nos seres humanos, mostraram comportamento semelhante, com insuficiência adrenal e reversão sexual nos pacientes 46,XY (OZISIK et al., 2003). Embora ainda pouco conhecido, o papel do *SF-1* no sistema nervoso central é também importante, pois os camundongos GM sem *SF-1* não apresentam núcleo ventro-medial hipotalâmico, região ligada à regulação do apetite e comportamento reprodutivo (IKEDA et al., 1995).

2.2.1.7 *DAX-1* (Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene-1)

DAX-1, também descrito como NROB1, é um membro nuclear órfão da superfamília de receptores hormonais. Seu nome vem de seu duplo papel na fisiopatologia em humanos: duplicações no Xp21, que contém o gene *DAX-1*, causam reversão sexual fenotípica nos indivíduos XY (DSS); por outro lado, mutações do gene *DAX-1* são responsáveis pela hipoplasia adrenal congênita (HAC), ligada ao cromossomo X, invariavelmente associada com hipogonadismo hipogonadotrófico (HHG) (BARDONI et al., 1994; MUSCATELLI et al., 1994).

O *DAX-1* foi localizado no braço curto do cromossomo X, após a descoberta da rara associação de HAC ligada ao X, com deficiência de glicerol-quinase, distrofia muscular de Duchenne e deficiência de ornitina transcarbamilase, como parte da deleção de genes contíguos (WORLEY et al., 1993).

Em 1994, a duplicação desta região do Xp foi encontrada associada à reversão sexual em humanos XY (BARDONI et al., 1994). Em seguida, o gene *DAX-1* foi clonado e mutações com perda de função foram detectadas, como causa de HAC/HHG (MUSCATELLI et al., 1994; ZANARIA et al., 1994).

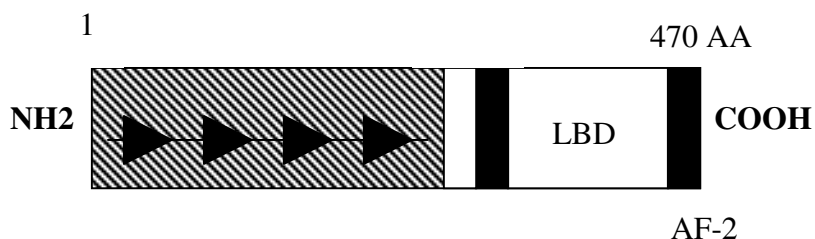
2.2.1.8 A estrutura da proteína DAX-1

O produto do gene *DAX-1* é um membro incomum da superfamília de receptores hormonais nucleares, pois não contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) típico, de dedos de zinco, encontrado na maioria dos receptores nucleares. Seu grupo terminal carboxílico tem um alto grau de similaridade com o domínio de ligação ao ligante (LBD) de outros membros da família (por exemplo, *small heterodimer partner* e RXR) (Figura 3). Contudo, não se conhece nenhum ligante para o LBD do DAX-1, o que o inclui na categoria de receptores órfãos (LALLI e SASSONE-CORSI, 2003).

O DAX-1 contém uma seqüência na hélice H12 C-terminal, que em outros receptores nucleares é essencial para a ativação transcricional dependente

de ligante (AF-2) (DANIELIAN et al., 1992). Por outro lado, sua porção amino-terminal é ocupada por três repetições de uma seqüência longa, rica em cisteína, com 67 aminoácidos e nenhum grau de homologia significativa com outras proteínas catalogadas. O número de repetições varia durante a evolução, sendo que somente uma repetição está presente no DAX-1 das espécies não-mamíferas (MANGELSDORF et al., 1995).

FIGURA 3 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA DAX-1



FONTE: Adaptado de ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J. A.. Orphan nuclear receptors - the first eight years. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 11, p. 1293-1307, 1996.

NOTA: DAX-1 não apresenta o DBD convencional e o AF-2 é apenas considerado similar, localizado na α -hélice da região carbóxi-terminal.

2.2.1.9 A expressão do *DAX-1* nos tecidos

O *DAX-1* tem um padrão de expressão restrito aos tecidos diretamente relacionados com a produção de hormônio esteróide e com a função reprodutiva: córtex adrenal, células de Leydig e de Sertoli, células da teca e granulosa, gonadotrofos da pituitária, núcleo ventro-medial hipotalâmico, córtex cerebral (IKEDA et al., 1996; TAMAI et al., 1996). Esse padrão se superpõe aos locais de expressão do *SF-1*.

A atividade de *DAX-1* é essencial no desenvolvimento gonadal no sexo masculino e dispensável no feminino. *DAX-1* é necessária para morfologia e função normais dos testículos no camundongo enquanto que fêmeas sem *DAX-1* têm ovários normais e são férteis (ZANARIA et al., 1995; SWAIN et al., 1996; SWAIN et al., 1998). A expressão aumentada de *DAX-1*, devido ao efeito “dosagem do gene” ou regulação positiva do *WNT-4*, desencadeia diferenciação gonadal feminina ou ambígua em indivíduos XY. LALLI e SASSONE-CORSI (2003) sugeriram um modelo pelo qual dois mecanismos moleculares poderiam ser responsáveis por esse fenótipo: (1) Repressão da produção da substância inibidora das estruturas de Müller (MIS) pelas células de Sertoli: *DAX-1* antagoniza a sinergia entre *SF-1* e *WT-1* na ativação da região promotora do gene *MIS*, o que é compatível com seu papel como regulador negativo da transativação induzida por

SF-1 (NACHTIGAL et al., 1998). A expressão aumentada de DAX-1 levaria então à repressão do *MIS*, durante o período crítico de especificação gonadal. (2) Repressão da produção de testosterona pelas células fetais de Leydig: considerando esse efeito negativo sobre a esteroidogênese, a expressão aumentada de DAX-1 poderia inapropriadamente reprimir a biossíntese de testosterona nas células fetais de Leydig, que é essencial para o desenvolvimento das características sexuais masculinas secundárias.

2.3 DOENÇAS RESULTANTES DA FALTA DE *SF-1* OU DE *DAX-1*

ACHERMANN et al. (1999) descreveram um paciente com uma mutação em *SF-1* que resultou em insuficiência adrenocortical e disgenesia gonadal 46,XY. Esse paciente apresentava concentrações séricas elevadas de gonadotrofinas, em contraste aos camundongos GM sem *SF-1*, que apresentavam concentrações séricas normais ou diminuídas. BIASON-LAUBER e SCHOENLE (2000) descreveram uma paciente com insuficiência adrenocortical, com cariótipo 46,XX e ovários pré-puberais aparentemente normais. Cada um desses pacientes tinha um alelo *SF-1* normal e alelos mutantes diferentes, resultando em perda de função e não em efeitos dominantes negativos. Essa aparente haplo-insuficiência levanta a possibilidade de que a dosagem do gene *SF-1* possa ser um componente crítico para sua função nos humanos.

Todas as mutações de *DAX-1* têm em comum uma alteração da região carbóxi-terminal da proteína, que comporta a atividade silenciadora transcricional e impede a repressão da transcrição por *DAX-1* (ITO, YU e JAMESON, 1997). A ausência dos nove aminoácidos carbóxi-terminais (incluindo o domínio AF-2) impede a função da proteína DAX-1 e resulta num fenótipo clínico grave (ACHERMANN, MEEKS e JAMESON, 2001).

Hipoplasia adrenal congênita (HAC) ligada ao X é uma alteração no desenvolvimento da glândula adrenal, de potencial risco de vida, descrita primeiramente por SIKL⁷ (apud ACHERMANN, MEEKS e JAMESON, 2001, p. 18).

⁷ SIKL, H. Addison's disease due to congenital hypoplasia of the adrenals in an infant aged 33 days. **J Pathol Bacteriol**, v. 60, p. 323-324, 1948

Nessa situação, a zona madura adulta da adrenal não se desenvolve. Ao invés disso, estão presentes células grandes, vacuolizadas, citomegálicas, lembrando células adrenocorticais fetais (UTTLEY, 1968). Na experiência de ACHERMANN, MEEKS e JAMESON (2001), aproximadamente 70% dos meninos com história de insuficiência adrenal e HHG têm uma mutação no *DAX-1*.

Crianças com HAC apresentam sinais e sintomas de insuficiência adrenal primária logo após o nascimento (60%) ou durante a infância (40%) (REUTENS et al., 1999). Esse padrão bimodal de apresentação pode ser o resultado de alterações relacionadas à idade, à ingesta de sódio e fluídos, produção de mineralocorticóides e sensibilidade e resposta ao *stress*.

Camundongos sem *DAX-1* não apresentam hipoplasia adrenal e suas concentrações séricas de hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo estimulante (FSH) são normais (YU, ITO e JAMESON, 1998). A única anormalidade no córtex adrenal desses animais é a não regressão da sua zona fetal após a puberdade. No entanto, os machos são estéreis, devido a um impedimento progressivo da espermatogênese, enquanto que as fêmeas têm a fertilidade preservada. É possível, portanto, que o gene *DAX-1* humano seja parte de um circuito regulador envolvido no estabelecimento de diferenças morfogenéticas na glândula adrenal, ou então que outros genes possam compensar a função de *DAX-1* no camundongo. Por outro lado, a função de *DAX-1* nos testículos parece ser conservada nas espécies humana e de roedores.

Foram descritos mais de 70 indivíduos ou famílias com HAC e mutação de *DAX-1*, OMIM⁸ 300200/300473, referência citada por ACHERMANN, MEEKS e JAMESON (2001, p.17).

A análise de diferentes mutantes de *DAX-1* em pacientes com HAC mostrou que o impedimento da repressão transcricional é dependente da alteração da localização nuclear da proteína mutante (LEHMANN, LALLI e SASSONE-CORSI, 2002).

⁸ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM>

A repressão transcricional por DAX-1 envolve interação com fatores intermediários (co-repressores), os quais silenciam a atividade da maquinaria basal e/ou induzem modificações na cromatina. Interação com receptor NcoR (CRAWFORD et al., 1998) é importante, pois essa interação está impedida por mutações do *DAX-1*, em HAC. Contudo, o acúmulo de DAX-1 no citoplasma dos mutantes explica a falta de interação com co-repressores nucleares. LEHMANN, LALLI e SASSONE-CORSI (2002) testaram a interação *in vitro* entre DAX-1 e NcoR e verificaram que ela é muito fraca e relativamente insensível à introdução das mutações relacionadas à HAC.

2.4 INTERAÇÃO DE DAX-1 COM SF-1 E OUTROS FATORES DE TRANSCRIÇÃO

A proteína DAX-1 atua como regulador negativo da ativação da transcrição induzida por SF-1, através de um potente domínio de repressão transcricional presente na região carbóxi-terminal (ITO et al., 1997; LALLI et al., 1997).

DAX-1 pode reprimir a transativação de *SF-1*, seja por se ligar às regiões promotoras dos genes regulados por *SF-1* (por exemplo, *StAR* e *DAX-1*) (ZAZOPOULOS et al., 1997), seja por interação direta com *SF-1*, através de uma das seqüências LXXLL presentes na região N-terminal do *DAX-1* (SUZUKI et al., 2003).

A presença de sítios de ligação funcionais de *SF-1* na região promotora de *DAX-1* (YU, ITO e JAMESON, 1998) e a expressão reduzida de *DAX-1* nos camundongos GM sem *SF-1* (KAWABE et al., 1999; HOYLE et al., 2002) sugeriram um mecanismo de retro-alimentação negativa para controlar a atividade de SF-1 nos tecidos esteroideogênicos e reprodutivos.

Segundo LALLI e SASSONE-CORSI (1999), o *DAX-1* se comporta como repressor transcricional em todos os contextos conhecidos. A perda da função silenciadora da transcrição pelo *DAX-1* causa impedimento do desenvolvimento do córtex adrenal e disfunção hipofisária e hipotalâmica. É possível, contudo, existirem moléculas que poderiam funcionar como ligantes para *DAX-1* (como

sugere a conservação do domínio similar ao AF-2 na α -hélice da região carbóxi-terminal) e alterar sua função, de repressor a ativador transcricional. Isso poderia ocorrer como resultado de modificações pós-transcricionais, em geral, fosforilação, ou associação com cofatores celulares específicos (LALLI e SASSONE-CORSI, 1999; FOWKES e BURRIN, 2003).

SF-1 e DAX-1 são expressos exatamente nos mesmos tecidos, sugerindo que haja interação na função dos dois fatores, o que foi observado *in vitro* (ITO, YU e JAMESON, 1997) e também em fungos (NACHTIGAL et al., 1998) e células de mamíferos (CRAWFORD et al., 1998). Já a presença de células expressando DAX-1, mas não SF-1 em diferentes órgãos (IKEDA et al., 2001) corrobora a idéia de que a função de DAX-1 se estende além da regulação de genes dependentes de SF-1. O papel de DAX-1 na regulação pós-transcricional é sugerido pelo seu deslocamento núcleo-citoplasmático, sua atividade de ligação ao RNA e sua associação com polirribossomos (LALLI et al., 2000). CRAWFORD et al. (1998) mostraram que DAX-1 pode recrutar seletivamente o co-repressor N-CoR para SF-1, o qual por sua vez recruta deacetilases da histona e induz a cromatina a um estado inativo, diminuindo a expressão do gene.

Domínios de interação com *SF-1* foram mapeados entre os aminoácidos 92 e 288 de DAX-1 (região compreendendo a segunda e terceira repetições e hélices H1-H3 na região carbóxi-terminal) (ITO, YU e JAMESON, 1997).

O produto de *SF-1* se liga eficientemente aos elementos de DNA da região promotora de *DAX-1* sugerindo que *SF-1* regule diretamente a expressão de *DAX-1* e assim, *SF-1* esteja acima de *DAX-1* na cascata reguladora que direciona o desenvolvimento de vários tecidos esteroideogênicos e/ou outros componentes do eixo hipotalâmico/hipofisário/adrenal-gonadal (BURRIS et al., 1995).

O Quadro 1 lista os genes regulados negativamente por *DAX-1*, por mecanismos diretos ou indiretos.

QUADRO 1 - GENES REGULADOS NEGATIVAMENTE POR *DAX-1*

GENE	REFERÊNCIA
<i>StAR</i>	ZAZOPOULOS, E. et al., 1997
<i>DAX-1</i>	
<i>P450scc (CYP11A)</i>	LALLI, E. et al., 1998
<i>3βHSD</i>	
17 α -hidroxilase(<i>CYP17</i>)	HANLEY, N. A et al., 2001
Aromatase (<i>CYP19</i>)	WANG, Z.J. et al., 2001
	GURATES, B. et al., 2002
Proteína <i>vas deferens</i> do camundongo (<i>AKR1B7</i>)	AIGUEPERSE, C. et al., 2001
<i>Receptor HDL</i>	LOPEZ, D. et al., 2001
<i>MIS</i>	NACHTIGAL, M.W. et al., 1998
Fator relaxina símile	KOSKIMIES, P. et al., 2002
Subunidade β de LH	HALVORSON, L.M. et al., 1998
Inibina alfa	ACHERMANN, J.C., et al., 2001
Sintetase neuronal NO	WEI, X., et al., 2002.

FONTE : LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P. *DAX-1*, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. **Mol Endocrinol**, v. 17, n. 8, p. 1445-1453, 2003.

NOTAS: 3 β -HSD - 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase; HDL - lipoproteína de alta densidade; MIS - substância inibidora do Muller; LH - hormônio luteinizante; NO - óxido nítrico.

2.5 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *DAX-1* E *SF-1*

A região promotora do gene *DAX-1* apresenta três sítios funcionais de ligação da proteína SF-1 (YU, ITO e JAMESON, 1998; KAWABE et al., 1999; HOYLE et al., 2002), o que sugere um importante papel para *SF-1* na regulação da sua expressão.

No entanto, em camundongos GM sem *SF-1*, a expressão de *DAX-1* é reduzida, mas não eliminada e mantém seu padrão restrito a tecidos específicos (IKEDA et al., 1996). Isso indica que outros fatores são envolvidos na regulação do gene *DAX-1*. Um deles é o próprio *DAX-1*, que é capaz de auto-regular sua expressão por ligação do seu produto à região promotora (ZAZOPOULOS et al., 1997).

O gene do tumor de Wilms (*WT-1*) é expresso na gônada embrionária e sua isoforma protéica (KTS-) é capaz de ativar a região promotora e a expressão dos transcritos de *DAX-1*, em células transfectadas (KIM et al., 1999).

Wnt-4, um membro da família *Wnt* de fatores de crescimento, é também capaz de ativar a expressão de *DAX-1* nas células de Sertoli transfectadas (JORDAN et al., 2001). Além disso, a expressão de *DAX-1* é ativada por β -catenina, que se localiza posteriormente na seqüência, na via de sinalização de *Wnt*, e está reduzida nas gônadas embrionárias femininas de camundongo sem *Wnt-4* (MIZUSAKI et al., 2003).

2.6 EXPRESSÃO DAS ENZIMAS ESTEROIDOGÊNICAS E ESTEROIDOGÊNESE DURANTE O DESENVOLVIMENTO DA GLÂNDULA ADRENAL

Algumas diferenças básicas na expressão de enzimas esteroidogênicas diferenciam a adrenal fetal da pós-natal. A zona fetal, na glândula rudimentar, expressa a enzima esteroidogênica 17α -hidroxilase (CYP17). A zona definitiva, desenvolvida logo após, não apresenta expressão de CYP17. A zona fetal expressa também a enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol (CYP11A), mas não a 3β -hidroxiesteróide desidrogenase, indicando que a adrenal fetal produz primariamente deidroepiandrosterona (DHEA) e seus derivados sulfatados (DHEA-S). Esses compostos servem como precursores para o estradiol, derivado da placenta, que é fundamental para manter a gestação (ARON e TYRRELL, 1994).

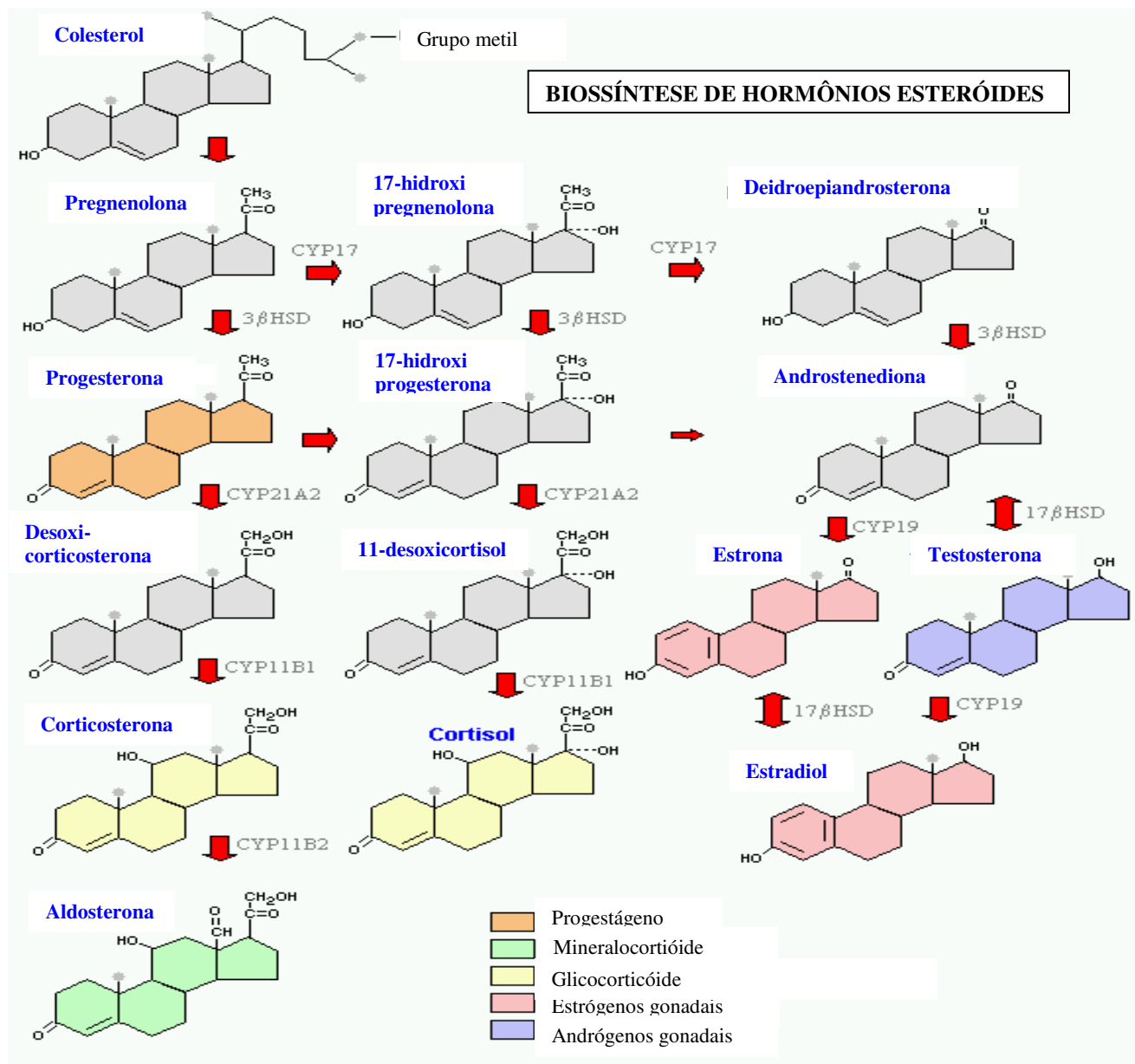
A zona glomerulosa, derivada da zona definitiva, adquire capacidade esteroidogênica no terceiro trimestre e produz principalmente aldosterona, sob o controle do sistema renina-angiotensina.

A zona fasciculada secreta glicocorticóides sob estímulo do ACTH, enquanto que a zona reticular secreta DHEA e DHEA-S. As concentrações séricas desses andrógenos declinam quando a zona fetal regride, e depois voltam a aumentar durante a infância com a formação da zona reticular (que surge no lugar da zona fetal), coincidindo com a adrenarca. Embora anatomicamente as três camadas do córtex adrenal sejam distintas, elas compartilham enzimas nas três vias esteroidogênicas. Entre elas, a proteína reguladora da esteroidogênese aguda (StAR), que facilita a transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, a CYP11A,

aisoenzima tipo 2 da 3β hidroxisteróide desidrogenase (3β -HSD) e a CYP21. Além dessas, presentes em todas as camadas do córtex adrenal, a atividade de certas enzimas chave, que catalisam reações terminais, na via de biossíntese dos esteróides, permite que as diferentes zonas produzam diferentes esteróides. CYP11 β 2 é expressa exclusivamente na zona glomerulosa e é responsável por três reações sucessivas que convertem corticosterona a aldosterona. A enzima CYP11 β 1 é expressa nas zonas internas e hidroxila 11-desoxicortisol para produzir cortisol, o glicocorticóide predominante nos seres humanos. As zonas internas também expressam a CYP17, que é requerida para a biossíntese de cortisol e andrógenos, mas não é utilizada para biossíntese de aldosterona (HAMMER, PARKER e SCHIMMER, 2004). A figura 4 mostra as três vias de síntese dos esteróides. A análise das enzimas esteroidogênicas permitiu compreender a síntese esteroidogênica adrenal. A maioria dessas enzimas pertence à família das P450 citocromo-oxigenases. Devido às diferenças enzimáticas entre a zona glomerulosa e as duas camadas internas (fasciculada e reticular), o córtex adrenal funciona como duas unidades separadas, com diferentes vias de regulação e produtos secretados.

Os mecanismos que levam às diferenças esteroidogênicas entre a adrenal fetal e a adulta, humanas, não são bem conhecidos. RAINEY et al. (2001), usando microarranjo para comparar os níveis de expressão de vários transcritos (RNAm) entre a adrenal fetal e a humana, mostraram que 69 deles apresentaram uma diferença maior que 2,5 vezes na expressão. As maiores diferenças foram observadas para transcritos de *insulin like growth factor (IGF-II)* (25 vezes maior na adrenal fetal) e de 3β -hidroxisteróide-desidrogenase (24 vezes maior na adrenal adulta). Os transcritos relacionados à biossíntese de esteróides ou ao crescimento e desenvolvimento tiveram valores maiores na adrenal fetal. Os relacionados à imunidade celular e à transdução de sinal apresentaram valores maiores na adrenal adulta.

FIGURA 4 - VIAS MAIORES DA BIODISSÍNTESE DE ESTERÓIDES



FONTE : <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/>

A síntese do cortisol ocorre pela ação da CYP17, que leva à 17 α -hidroxilação da pregnenolona dentro do retículo endoplasmático liso, para formar 17 α -hidroxipregnenolona. Esse esteróide é convertido à 17 α -hidroxiprogesterona pela 3 β -hidroxiesteróide-desidrogenase. O passo seguinte é a 21-hidroxilação pela CYP21 da 17 α -hidroxiprogesterona, para formar 11-deoxicortisol, o qual é hidroxilado pela CYP11B1 para formar cortisol. As zonas fasciculada e reticular também produzem 11-deoxicorticosterona (DOC), 18-hidroxideoxicorticosterona e corticosterona.

A produção de androgênios a partir da pregnenolona e progesterona requer a participação da CYP17 e assim não ocorre na zona glomerulosa. A maior produção quantitativa de androgênios é pela conversão da 17 α -hidroxipregnenolona aos esteróides de C19 (DHEA e DHEA-S). O outro androgênio maior é a androstenediona, produzida a partir da 17 α -hidroxiprogesterona, pela ação da 17,20-desmolase e, em menor extensão, da DHEA (ARON e TYRRELL, 1994).

QUADRO 2 - ZONAS FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL ADULTO

	ZONA GLOMERULOSA	ZONA FASCICULADA	ZONA RETICULAR
LOCALIZAÇÃO	Periférica	Central	Mediana
ESTÍMULO	Angiotensina II (ACTH)	ACTH	ACTH
RECEPTOR DE MEMBRANA PRIMÁRIO	Receptor angiotensina II	MC2R	MC2R
ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	CYP11 β 2	CYP17; CYP11 β 1	CYP17(17OH e 17,20 liase)
HORMÔNIO PRODUZIDO	Aldosterona	Cortisol	Esteróides sexuais (DHEA-S)
FUNÇÃO	Regulação do volume intra-vascular	Homeostase da glicose; mobilização de energia dos depósitos	Adrenarca; bem estar
DEFICIÊNCIA	Hiponatremia, hipercalemia, hipotensão	Hipoglicemia, falta de resposta ao stress	Desconhecida

FONTE: Traduzido de KEEGAN, C.E.; HAMMER, G.D. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab**, v. 13, n. 5, p. 200-208, 2002.

NOTA: MC2R – receptor do ACTH

2.7 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS TCAs

Com a finalidade de conhecer as características clínicas e biológicas dos TCAs em crianças, foi feita análise dos dados coletados pelo *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPACTR), vinculado ao *International Outreach Program* do St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee. Nesse registro, foram incluídos, de janeiro de 1990 a dezembro de 2001, 259 pacientes com menos de 21 anos, sendo 79,5% provenientes de São Paulo e do sul do Brasil (MICHALKIEWICZ et al., 2004). Foram também incluídos pacientes com diagnósticos realizados anteriormente à data de organização do registro. LIOU e KAY (2000) apresentaram uma coletânea de 22 publicações sobre carcinoma de córtex adrenal em crianças, totalizando 412 casos, dos quais 171 (41%) eram provenientes de São Paulo e do sul do Brasil; a idade variou de 1,5 a 7 anos, estando a maioria entre 2 e 4 anos. Na série do IPACTR, quase 60% estavam abaixo de 4 anos. A porcentagem de formas clínicas funcionantes variou de 81 a 100%, nas séries revisadas, sendo no IPACTR de 90 %. Virilização isolada, ou em combinação com aumento da secreção de cortisol, ou de outros hormônios, ocorreu em 84,3% dos casos e tumores não produtores de hormônios representaram apenas 10% do total. TCA em crianças apresentando-se clinicamente apenas com síndrome de Cushing é raro (MICHALKIEWICZ et al., 2004). Em contraste, menos de 50% dos tumores são funcionantes nos adultos e a maioria apresenta síndrome de Cushing isolada ou hiperaldosteronismo (VIERHAPPER, 2002). Esses dados reforçam a afirmação de que, no Paraná, frente a crianças com puberdade precoce deve-se considerar, como primeira hipótese diagnóstica, tumor de córtex adrenal.

Quanto ao sexo, nos casos do IPACTR, a relação feminino/masculino global foi de 1,6:1, mas variou de acordo com grupos etários. Houve predomínio de meninas no grupo etário até 3 anos e com idade igual ou superior a 13 anos, porém a distribuição quanto ao sexo foi similar para as idades de 4 a 12 anos.

A raridade desses tumores não permitiu ainda conhecer adequadamente todas as variáveis prognósticas. A análise dos primeiros 254 casos registrados no IPACTR identificou os seguintes fatores: pacientes com características clínicas de Cushing

(puro ou misto) tiveram pior prognóstico, confirmando os achados anteriores de BERGADA et al. (1996). Pacientes com tumores não-funcionantes, ao contrário do que referem alguns autores (STEWART, JONES e JOLLEYS, 1974; WEATHERBY e CARNEY, 1984; NEBLETT, FREXES-STEED e SCOTT, 1987), não tiveram pior prognóstico, mesmo com maiores massas e doenças mais avançadas. Para crianças com tumores não funcionantes, a sobrevida foi de 66,6%, comparada com 88% nos casos de virilização isolada e apenas 56,4% para apresentação mista. Quanto ao estadiamento, os pacientes foram classificados de acordo com o sistema publicado por SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA em 1997, com algumas modificações, que incluíram a utilização do peso (200g), ao invés do volume (200cm³), como principal medida para diferenciar estádios I e II, e a informação sobre doença residual microscópica classificada como estágio III.

Pacientes com tumores pequenos (peso inferior a 200g) tiveram um excelente prognóstico, enquanto que pacientes com doença residual micro ou macroscópica tiveram prognóstico ruim. Pacientes com grandes tumores completamente ressecados tiveram um prognóstico intermediário. Esses dados estão de acordo com os resultados de vários estudos, que mostraram que tumores maiores se associam com pior prognóstico (HUMPHREY et al., 1984; CAGLE et al., 1986; WEISS, MEDEIROS e VICKERY JR, 1989; BUGG et al., 1994; SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997; MICHALKIEWICZ et al., 1997).

A acurácia prognóstica desse estadiamento pode, provavelmente, ser melhorada pela adição de informações sobre histologia, envolvimento de linfonodos, ruptura capsular durante a cirurgia, e marcadores biológicos tumorais.

Pacientes com doença localizada, com idade entre 0 e 3 anos, síndrome virilizante sem síndrome de Cushing associada, pressão sangüínea normal, estágio I, ausência de contaminação durante a cirurgia, e peso tumoral menor ou igual a 200g apresentaram maior sobrevida livre de eventos. Analisando o grupo total, com um seguimento de 2,5 anos, 157 (61,8%) sobreviveram sem evidência de doença e 97 (38,2%) foram a óbito. A estimativa de sobrevida em 5 anos foi de 54,2% (95% IC = 48 a 60%) (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

2.8 CARACTERÍSTICAS HISTOLÓGICAS DOS TCAs

A grande dificuldade que surge quando se recebe um laudo histológico de TCA é avaliar o seu valor em relação ao prognóstico para o paciente. Vários estudos têm sugerido que não há meios definitivos de se diferenciar carcinomas de adenomas de córtex adrenal.

LEWINSKY et al. (1974) analisaram 20 casos de tumores não funcionantes e revisaram a literatura. Concluíram que não foi possível obter indicadores do potencial desses tumores para causar metástases, com base apenas em critérios histológicos e recomendaram que todos os TCAs fossem vistos como malignos. Estudos de KAY, 1976, mostraram que pleomorfismo celular pode ocorrer em adenomas e não deveria ser usado como indicador de carcinoma.

HOUGH et al. (1979) selecionaram sete marcadores de malignidade: padrão difuso de crescimento, invasão vascular, necrose tumoral, septos fibrosos largos, mais do que uma mitose por 10 campos de grande aumento (CGA), pleomorfismo e invasão capsular. O índice histológico de malignidade foi de $2,91 \pm 0,90$ para tumores malignos e de $0,17 \pm 0,26$ para tumores benignos.

HEINBERCKER O'NEAL e ACKERMAN⁹, citados por WEISS (1984, p.167) compararam 10 tumores malignos com 6 benignos e concluíram que o carcinoma é geralmente associado com pleomorfismo, mitoses atípicas, hemorragia, necrose e calcificação. Como critérios absolutos para a definição de TCA maligno, foram consideradas a invasão de veias ou cápsulas e a presença de metástases. Contudo, esse trabalho apresentou como limitações o tamanho da amostra e o tempo de evolução dos pacientes.

WEISS (1984) analisou 43 TCAs de pacientes que foram avaliados até 5 anos pós-diagnóstico, com documentação de metástase ou recidiva e propôs nove indicadores histológicos de malignidade para tais tumores, fornecendo um método prático para o patologista. Num grupo de 24 tumores, com 2 ou menos dos 9 indicadores, não houve metástases nem recidivas. No segundo grupo, de 19 tumores com 4 ou mais dos 9 critérios, houve somente um tumor sem metástase ou recidiva. Este tumor pesou 1458g e era parcialmente necrótico.

⁹ HEINBERCKER, P.; O'NEAL, L.W.; ACKERMAN, L.V. Functioning and nonfunctioning adrenal cortical tumors. *Surg Gynecol Obstet*, v.105, p. 21-33, 1957

Os dados apresentados por WEISS (1984) estão em concordância com os de HOUGH et al. (1979), com exceção da invasão capsular, que foi muito menos freqüente nos tumores não metastáticos. VAN SLOOTEN et al. (1985) apresentaram um terceiro sistema para distinguir entre tumores benignos e malignos. Estes autores analisaram 60 pacientes (45 carcinomas e 15 adenomas), e estabeleceram valor discriminatório em relação à malignidade, para 7 parâmetros histológicos: mudanças degenerativas como necrose, hemorragia, fibrose ou calcificação; preservação da estrutura normal; atipia nuclear; hipercromasia nuclear; estrutura dos nucléolos; atividade mitótica; e invasão da cápsula e/ou dos vasos sangüíneos. Em seu trabalho, VAN SLOOTEN et al. (1985) não descreveram a idade dos pacientes, porém se presume que sejam TCAs de adultos, pois 25 eram tumores não funcionantes e 10 apresentavam síndrome de Cushing isolado, o que é raro na criança.

Segundo WEISS, MEDEIROS e VICKERY (1989), embora a separação entre adenoma e carcinoma possa ser feita, na grande maioria dos casos, avaliando-se múltiplas características patológicas, não existe concordância para definir os critérios patológicos que auxiliem a distinguir carcinomas de baixo e alto grau.

WACHENFIELD et al. (2001), analisando sete hiperplasias adrenais macronodulares independentes de ACTH, 30 adenomas e 10 carcinomas de córtex adrenal, avaliaram a porcentagem de células positivas para Ki67, um antígeno associado à proliferação, e identificaram um índice Ki67 acima de 5%, como indicador sensível e específico de carcinoma, podendo ser útil para diferenciá-lo dos adenomas nos adultos.

2.9 DIFERENÇAS ENTRE TCAs DE CRIANÇAS E DE ADULTOS

2.9.1 Incidência

A incidência de carcinoma de córtex adrenal em adultos é de 1,7 casos por milhão de pessoas por ano (BORNSTEIN, STRATAKIS e CHROUSOS, 1999), e nas crianças, a incidência é de 0,3/milhão abaixo de 15 anos (PARKIN et al., 1998). No sul do Brasil, esta ocorrência é 10 a 15 vezes maior (SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997).

Tumores de córtex adrenal benignos pequenos (incidentalomas) ocorrem em 3 a 7 % dos adultos acima de 50 anos (KLOOS et al., 1995). Por sua baixa frequência em crianças, não têm o mesmo impacto nem causam dilema terapêutico semelhante quando encontrados nesta faixa etária.

2.9.2 Manifestações Clínicas

A distribuição dos TCAs quanto à idade é bimodal, com um pico na primeira e outro na quinta década e o comportamento biológico do tumor nas crianças parece ser diferente daquele no adulto (SREDNI et al., 2003). Em ambos, ocorre maior frequência no sexo feminino.

As formas clínicas na criança são predominantemente virilização, seguida de virilização associada à síndrome de Cushing, sendo que esta síndrome isolada é rara, assim como a forma não funcionante (WAJCHENBERG et al., 2000; MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005). Em algumas séries, mais da metade dos adultos com TCA não apresenta nenhuma síndrome endócrina ou apresenta síndrome de Cushing como a mais freqüente (LATRONICO e CHROUSOS, 1997; VASSILOPOULOU-SELLIN e SCHULTZ, 2001).

2.9.3 Histologia

CAGLE et al. (1986), estudando TCA de crianças e de adultos, encontraram que o tamanho foi o único fator preditivo de malignidade nos tumores pediátricos. Todos os tumores de crianças com peso maior que 500g apresentaram comportamento maligno. RIBEIRO et al. (1990), revisando 40 prontuários de crianças com TCA, observaram que o peso maior que 100g e o volume maior que 200ml foram associados com evolução desfavorável. A maioria dos autores, contudo, concorda que o tamanho do tumor não deve ser usado isoladamente como critério para estabelecer o diagnóstico de maligno ou benigno, pois grandes tumores têm sido observados sem metástases, enquanto que tumores ainda pequenos já podem apresentá-las (GANDOUR e GRIZZLE, 1986). A histologia não apresentou associação com o prognóstico nos tumores pediátricos analisados por BUGG et al. (1994). Na série publicada por WAJCHENBERG et al. (2000), as características histológicas associadas com pior evolução nos adultos (critérios de Weiss) não apresentaram o mesmo prognóstico sombrio quando presentes em crianças.

HAAK et al. (1993) encontraram que tumores aneuplóides foram associados com melhor prognóstico em crianças. ZERBINI et al. (1992) e BUGG et al. (1994) não encontraram associação entre ploidia, histologia e evolução clínica. HOSAKA et al. (1987) verificaram melhor sobrevida livre de eventos aos 5 anos, para pacientes com tumores diplóides (80%), em comparação aos tetraplóides (33%) e multiplóides (0%). CAMUTO et al. (1991) encontraram 96% de tumores aneuplóides em pacientes com manifestação clínica de neoplasia maligna. Ao contrário, os estudos de JOENSUU e KLEMI (1988) indicaram que 53% dos tumores adrenais clinicamente benignos foram aneuplóides.

2.9.4 Prognóstico

MENDONÇA et al. (1995) mostraram que crianças com carcinoma adrenocortical não metastático ao tempo do diagnóstico têm melhor prognóstico do que adultos, após completa ressecção, com as mesmas características histológicas e tratamento semelhante.

2.10 CARACTERÍSTICAS GENÉTICAS E BIOLÓGICAS DOS TCAs

BEUSCHLEIN et al. (1994) demonstraram que a hiperplasia de córtex adrenal é um processo policlonal, enquanto que os carcinomas são monoclonais, sugerindo que alterações específicas no genoma são necessárias para a formação de TCAs. GICQUEL et al. (1994) demonstraram que os carcinomas de córtex adrenal são monoclonais, porém os adenomas dessa região podem ser monoclonais (43%) ou policlonais (28,5%), com várias formas intermediárias (28,5%). Há duas possíveis explicações para a heterogeneidade que distingue adenomas adrenocorticais monoclonais dos policlonais: (a) tipos diferentes de tumor podem corresponder a mecanismos fisiopatogênicos diferentes; (b) os diferentes tumores podem representar estádios de um processo comum de múltiplos passos. Como exemplo desse segundo mecanismo, pode-se considerar o que acontece na hiperplasia macronodular, na qual foi descrito padrão clonal heterogêneo, em diferentes

localizações das glândulas (GICQUEL et al., 2000). Diferentes síndromes genéticas predisõem ao desenvolvimento de TCA. Entre elas, a síndrome de Beckwith-Wiedemann, Li-Fraumeni, McCune-Albright, Carney e neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (Quadro 3). Estudos relacionados a essas síndromes têm permitido progressos na compreensão da formação dos TCAs.

QUADRO 3 - SÍNDROMES GENÉTICAS QUE PREDISPÕEM AOS TCAs.

SÍNDROMES	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	DEFEITOS MOLECULARES
Beckwith-Wiedemann	Macrossomia, macroglossia, onfalocele, visceromegalia, hemihipertrofia, hipoglicemia neonatal, e vários tumores (nefroblastoma, carcinoma adrenocortical, neuroblastoma e hepatoblastoma).	Perda alélica ou “imprinting” da região cromossômica 11p15 (genes <i>H19</i> , <i>p57kip2</i> e <i>IGF-II</i>).
Li-Fraumeni	Susceptibilidade familiar a vários cânceres (mama, córtex adrenal, cérebro, leucemia).	Mutação germinativa do <i>p53</i> .
McCune-Albright	Displasia fibrosa polióstótica, manchas café com leite, puberdade precoce, tumores endócrinos.	Mosaicismo para mutação ativadora do gene <i>GNAS1</i> .
Complexo de Carney	Doença adrenocortical primária nodular pigmentada, schwannomas, mixomas, lentigo.	Mutação no locus 2p16
Neoplasia Endócrina Múltipla Tipo 1	Hiperparatireoidismo, tumor duodenal pancreático, tumores hipofisários	Mutação germinativa do gene <i>menin</i> .

FONTE: Traduzido de GICQUEL et al. Pathogenesis of adrenocortical incidentalomas and genetic syndromes associated with adrenocortical neoplasms. **Endocrinol Metab Clin North Am.**, v. 29, n. 1, p. 1 -13, 2000.

A Tabela 3, elaborada por KOCH, PACAK e CHROUSOS (2002) apresenta as alterações genéticas e mecanismos moleculares associados aos tumores adrenais.

TABELA 3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS TUMORES ADRENAIS

Continua							
GENE/PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	ALTERAÇÕES DOS GENES	PREVALÊNCIA (TUMORES)	REFERÊNCIAS			
Genes Supressores de Tumor	<i>p53</i>	17p13	LOH no alelo selvagem na síndrome de Li-Fraumeni	8/11	Latronico et al., 2001		
				5/6	Ribeiro et al., 2001		
				LOH nos tumores esporádicos	4/8 cânceres	Kjellman et al., 1996	
					1/9	Figueiredo et al., 1999	
					1/12 cânceres	Zhao et al., 1999	
					1/29	Zhao et al., 1999	
					11/13 cânceres	Gicquel et al., 2001	
					23/36	Gicquel et al., 2001	
					6/6 cânceres	Wachenfeld et al., 2001	
					1/23	Wachenfeld et al., 2001	
					Mutações somáticas nos tumores esporádicos	0/18	Ohkagi et al., 1993
						3/15 cânceres	Ohkagi et al., 1993
						5/13 cânceres	Reincke et al., 1994
						0/5	Reincke et al., 1994
						11/15	Lin et al., 1994
						0/19	Reincke et al., 1996
					Ganhos no cromossomo 17 em tumores esporádicos	8/14 cânceres	Barzon et al., 2001
						6/29	Zhao et al., 1999
						3/12 cânceres	Zhao et al., 1999
						3/14 cânceres	Dohna et al., 2000
3/8	Dohna et al., 2000						
1/1	Beckers et al., 1992						
<i>MEN1</i>	11q13	LOH do alelo selvagem nos tumores MEN1	0/12	Skogseid et al., 1992			
			5/11	Iida et al., 1992			
			7/33	Gordon et al., 1996			
			2/21	Heppner et al., 1999			
			5/5 cânceres	Heppner et al., 1999			
			13/27 (11 ca)	Kjellman et al., 1999			
			9/35	Gortz et al., 1999			

TABELA 3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS TUMORES ADRENAIS

Continua				
GENE/PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	ALTERAÇÕES DOS GENES	PREVALÊNCIA (TUMORES)	REFERÊNCIAS
			6/8 cânceres	Wachenfeld et al., 2001
		Mutações somáticas nos tumores esporádicos	1/14	Schulte et al., 1999
			0/25	Heppner et al., 1999
			0/7 cânceres	Heppner et al., 1999
			0/2	Kjellman et al., 1999
			0/11 cânceres	Kjellman et al., 1999
			0/35	Gortz et al., 1999
			1/14	Schulte et al., 2000
<i>p57/kip2 e H19</i>	11p15	LOH nos tumores esporádicos	3/8 cânceres	Kjellman et al., 1996
			2/9	Figueiredo et al., 1999
			32/94	Gicquel et al., 2001
			15/18 cânceres	Gicquel et al., 2001
		Mutações somáticas nos tumores esporádicos	0/61	Barzon et al., 2001
		Baixa expressão nos tumores esporádicos	6/6 cânceres	Liu et al., 1997
			3/10	Liu et al., 1997
			5/9	Barzon et al., 2001
<i>P21</i>	6p21	Expressão aumentada nos tumores esporádicos	10/11 cânceres	Barzon et al., 2001
			4/11 cânceres	Barzon et al., 2001
<i>P16</i>	9p21	LOH nos tumores esporádicos e baixa expressão	25/38 cânceres	Stojadinovic et al., 2002
			1/7	Pilon et al., 1999
			3/7 cânceres	Pilon et al., 1999
Oncogenes				
<i>RET</i>	10q11.2	Mutações somáticas nos tumores esporádicos	1/23	Lin et al., 1998
		rearranjo RET/PTC1	2/23	Lin et al., 1998
<i>RAS</i>	1p13.2 (Nras)	Mutações somáticas nos tumores esporádicos	0/33	Ohgaki et al., 1993
	12p11.2 (Kras)		0/17	Moul et al., 1993
	11p15.5 (Hras)		3/24 cânceres	Yashiro et al., 1994
			4/32	Yashiro et al., 1994
			6/18	Lin et al., 1998
			0/18	Lin et al., 1998
		Expressão aumentada de Kras	6/18	Lin et al., 1998
Fatores de crescimento				

IGF-II	11p15.5	Expressão aumentada nos tumores esporádicos, com duplicação do alelo paterno	0/15	Ilvesmaki et al., 1993
			4/4 cânceres	Ilvesmaki et al., 1993
			2/17	Gicquel et al., 1994
			5/6 cânceres	Gicquel et al., 1994

TABELA 3 - ALTERAÇÕES GENÉTICAS NOS TUMORES ADRENAIS

Continua

GENE/PROTEÍNA	LOCALIZAÇÃO CROMOSSÔMICA	ALTERAÇÕES DOS GENES	PREVALÊNCIA (TUMORES)	REFERÊNCIAS
			3/35	Gicquel et al., 1997
			27/29 cânceres	Gicquel et al., 1997
			26/94	Gicquel et al., 2001
<i>EGFR</i>	7p12	Expressão aumentada	63/64 cânceres	Kamio et al., 1990
			10/23	Kamio et al., 1990
<i>EGF</i>	4p25	Expressão	5/5 cânceres	Sasano et al., 1994
			0/26	Sasano et al., 1994
<i>TGFα</i>	2p13	Expressão aumentada	5/5 cânceres	Sasano et al., 1994
<i>GNAS1</i>	20q13.2	Mutações somáticas nos tumores esporádicos	0/11	Lyons et al., 1990
			4/4	Weinstein et al., 1991
			0/18	Reincke et al., 1993
			1/19	Yoshimoto et al., 1993
			1/1	Boston et al., 1994
			1/1	Bugalho et al., 2000
			1/1	Kobayashi et al., 2000
<i>GNAI2</i>	3p21	Mutações somáticas nos tumores esporádicos	3/11	Lyons et al., 1990
			0/18	Reincke et al., 1993
			0/18	Gicquel et al., 1995
<i>ACTH-R</i>	18p11.2	Mutações somáticas	0/16	Light et al., 1995
		Deleção	0/25	Latronico et al., 1995
			2/4	Reincke et al., 1997
			1/16	Reincke et al., 1997
<i>ATRI</i>	3q21-25	Mutações somáticas	0/17	Davies et al., 1997
		Expressão moderada a alta	0/55	Sachse et al., 1997
			0/1 câncer	Sachse et al., 1997
			12/12	Tanabe et al., 1998
			9/9	Schubert et al., 2001
<i>PRKARIA</i>	17q22-24	LOH nos tumores associados com complexo de Carney	2/2	Kirschner et al., 2000
		Atividade aumentada por estimulação com AMP cíclico	3/3	Kirschner et al., 2000
Proteína quinase C dependente de cálcio	17q22-23 (alfa) 13p21delta	Atividade normal	17/17	Latronico et al., 1994

FONTE: KOCH et al. Genetics of endocrine disease. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, n. 12, p.5367-5384, 2002.

2.11 ASPECTOS MOLECULARES DA ETIOPATOGENIA DOS TCAs

2.11.1 *IGF-II, H19 e p57/KIP2*

KOUFOS et al. (1985) sugeriram que um oncogene recessivo localizado no cromossomo 11p confere predisposição para TCA, hepatoblastoma e rabdomiossarcoma. Os genes *IGF-II*, *H19* e *p57/KIP2* se localizam em 11p15 e estão associados à síndrome de Beckwith-Wiedemann. Esta síndrome ocorre esporadicamente ou em padrão autossômico dominante, com expressividade variável. Os pacientes apresentam macroglossia, defeitos de parede abdominal, gigantismo e um risco aumentado de desenvolver tumor de Wilms, hepatoblastoma, rabdomiossarcoma e carcinoma adrenal. Expressão aumentada de *IGF-II* é vista em vários tipos de neoplasias, incluindo tumor de Wilms, hepatoblastoma, câncer de cólon, carcinoma de células renais e TCA (DURAI et al., 2005).

IGF-II, *H19* e *p57/KIP2* apresentam *imprinting*, um fenômeno que indica que somente um alelo (materno ou paterno) é expresso, enquanto o outro é silenciado. Com a ativação da cópia do gene silenciado, haverá expressão bialélica, que pode influenciar o crescimento celular. Enquanto normalmente o alelo do *IGF-II* transcrito é o paterno, genes *H19* e *p57* são expressos do lado materno. Duplicação do alelo paterno localizado em 11p15 contendo o *locus* do gene *IGF-II*, e/ou perda do alelo materno são freqüentemente encontradas em câncer adrenal. A expressão aumentada de *IGF-II* é freqüentemente encontrada nos TCA malignos esporádicos e pode servir

como marcador molecular prognóstico (GICQUEL et al., 1997; WEBER, FOTTNER e WOLF, 2000; GICQUEL et al., 2001).

WILKIN et al. (2000) estudaram 4 pacientes pediátricos com TCA e encontraram, em todos, expressão do RNAm de *IGF-II* aumentada em relação à da adrenal normal (até 36 vezes) além de demetilação significativa de *IGF-II* e *p57/KIP2*, que é de origem materna. A correlação da expressão do RNAm de *p57/KIP2* foi positiva com a do RNAm de H19 e negativa com a do RNAm de *IGF-II* (LIU et al., 1997). Contudo, nenhuma mutação somática foi encontrada nesse gene nos 75 tumores esporádicos analisados por BARZON et al. (2001), mas expressão baixa foi demonstrada em 3 de 10 adenomas adrenais e em 6 de 6 carcinomas (LIU et al., 1997).

Um importante fator de crescimento ao lado de *IGF-II* é o epidérmico (*EGF*). Seu receptor (*EGFR*) tem sido estudado em um pequeno número de tumores adrenais, por imunohistoquímica e apresentou expressão aumentada em tumores benignos e malignos, ao mesmo tempo em que *EGF* não foi detectado. Por outro lado, *TGF α* , que é um ligante natural para *EGFR*, apresentou expressão aumentada no câncer adrenal (KAMIO et al., 1990; SASANO et al., 1994; EDGREN et al., 1997).

2.11.2 Inibinas e Ativinas

Inibinas e ativinas são proteínas da família de fatores de crescimento transformadores β (*TGF β*) (KINGSLEY, 1994). Esse grupo inclui vários tipos de *TGF- β* , e também a MIS (LYONS et al., 1990). Inibinas são proteínas heterodiméricas que consistem de uma subunidade α e uma β ($\alpha\beta$ A, inibina A; $\alpha\beta$ B, inibina B). Já as ativinas são homo ou heterodímeros de subunidades β ($\beta\alpha\beta$ A, ativina A; $\beta\beta\beta$ B, ativina B; $\beta\alpha\beta$ B, ativina AB) (MUNRO, KENNEDY e McNICOL, 1999). O gene da inibina α é localizado no cromossomo 2q (BARTON et al., 1989).

As inibinas e ativinas foram inicialmente isoladas do fluído folicular ovariano e caracterizadas como peptídeos gonadais, reguladores hormonais endócrinos e parácrinos do eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal, por inibir ou estimular a secreção do FSH, pela hipófise (YING, 1988). Sabe-se agora que são expressas numa ampla variedade de tecidos, incluindo hipófise, medula óssea, sistema nervoso central e placenta (MEUNIER et al., 1988). Há evidências de que as subunidades α , βA e βB podem ser expressas no córtex adrenal (MEUNIER et al., 1988; DE JONG et al., 1990). Concentrações de inibina são maiores nas veias adrenais que na veia cava ou na circulação periférica (NISHI et al., 1995). Utilizando imunocitoquímica, MUNRO, KENNEDY e McNICOL (1999) demonstraram subunidades α , em adrenais humanas adultas e fetais, principalmente na zona reticular (ZR) e, com menor intensidade, na zona fasciculada. Não foi observada coloração positiva para a subunidade α na zona glomerulosa (McCLUGGAGE et al., 1998; AROLA et al., 2000). Há menos informações quanto à expressão das subunidades β , porém imunorreatividade para βA e βB têm sido demonstradas nas glândulas fetais e adultas humanas (SPENCER et al., 1992). Por outro lado, estudos usando PCR transcriptase reversa sugerem que RNAm podem ser expressos em baixas concentrações (VOUTILAINEN, ERAMAA e RITVOS, 1991).

Na adrenal, ativina suprime seletivamente a proliferação da zona fetal. Ativina-A recombinante humana facilita a secreção de cortisol, estimulada pelo ACTH, pelas células da zona fetal em cultura, mas não pelas células da zona definitiva ou células da adrenal adulta (SPENCER et al., 1992).

Estudos de transcrição do gene da α -inibina demonstram que esta proteína é também dependente de *SF-1*, sendo sinergicamente aumentada pela β catenina (GUMMOW, WINNAY e HAMMER, 2003).

Informações sobre o papel das inibinas e ativinas no crescimento e diferenciação das gônadas e da adrenal podem ser obtidas a partir de estudos com camundongos GM sem o gene da inibina alfa (INH^{-/-}), os quais apresentam desenvolvimento espontâneo de tumores gonadais e carcinomas de córtex adrenal após gonadectomia (SPENCER et al., 1992).

Tumores gonadais, das células da teca/granulosa ou das células de Leydig, apareceram com 100% de penetrância nos camundongos sem a subunidade alfa da inibina, nas idades de 5 a 8 meses, com alguns focos de tumoração no fígado e pulmões. Quando os camundongos GM foram gonadectomizados precocemente, com a intenção de se verificar se estes focos tumorais eram primários ou metastáticos dos tumores gonadais, os autores encontraram tumores adrenais nos GM, o que não ocorre nos camundongos normais (SPENCER et al., 1992). Esses achados sugeriram que fatores secretados pelas gônadas tumorais poderiam inibir a formação de tumor na adrenal. A análise da inibina demonstrou que camundongos fêmeas apresentaram altas concentrações séricas de inibina A e B, sem redução das concentrações séricas de FSH, enquanto camundongos machos apresentaram predominantemente inibina B, em menores valores, com redução das concentrações de FSH (MATZUK et al., 1992). KANANEN et al. (1996) sugeriram que a inibina pudesse ser o fator gonadal que inibia a formação de tumor adrenal, concluindo que a expressão da inibina- α adrenal é normalmente regulada negativamente por fatores gonadais.

RILIANAWATI et al. (1998) e MIKOLA et al. (2003) sugeriram que altas concentrações de hormônio luteinizante (LH) atuam como promotoras de tumor, para gônadas e adrenais e que a presença de concentrações elevadas de receptor para LH nos tumores adrenais indica que este receptor possa funcionar como promotor de tumor, quando ectopicamente expresso e estimulado por hormônios ligantes.

Vários estudos de proteínas diméricas relacionadas às inibinas e ativinas têm levado à hipótese de que elas possam estar envolvidas na formação de tumores como fatores de crescimento anti-proliferativos. A geração de camundongo deficiente em α -inibina tem identificado α -inibina como um gene supressor de tumor (MATZUK et al., 1992), porém o papel dos membros da família TGF- β na carcinogênese é complexo. Alterações na intensidade de sinal e conexão das vias de sinalização podem promover a transição complexa da via TGF- β da função supressora de tumor para função de tumorigênese, conforme apontou revisão recente (WAKEFIELD e ROBERTS, 2002).

A morfologia dos tumores e a expressão de receptores e enzimas requeridos para a produção de esteróides sexuais sugerem que a adrenal de camundongos deficientes em inibina pode adotar características normalmente restritas aos tecidos gonadais.

2.11.3 Participação de DAX-1 nos TCAs

A produção excessiva de hormônios esteróides resulta da expressão alterada das enzimas esteroidogênicas específicas, o que pode ser consequência da expressão anormal dos fatores reguladores da transcrição.

REINCKE et al. (1998), estudando TCAs de adultos, encontraram expressão elevada de DAX-1 em adenomas não-funcionantes, intermediária nos adenomas produtores de cortisol, e baixa ou ausente nos adenomas e carcinomas produtores de aldosterona.

SHIBATA et al. (2001) descreveram expressão baixa do DAX-1 nos adenomas produtores de cortisol e elevada em dois casos de adenomas produtores de deoxicorticosterona, nos quais a expressão de CYP17 é muito baixa e que, clinicamente, se apresentam como síndrome de excesso de produção de mineralocorticóides.

Aparentemente, parece existir uma correlação inversa entre a expressão do DAX-1 e a produção de hormônio esteróide nos tumores de córtex adrenal, podendo o DAX-1 influenciar no padrão de esteróide produzido pelo tumor.

2.12 GENE *TP53* NA SÍNDROME DE LI-FRAUMENI E NOS TCAs ESPORÁDICOS

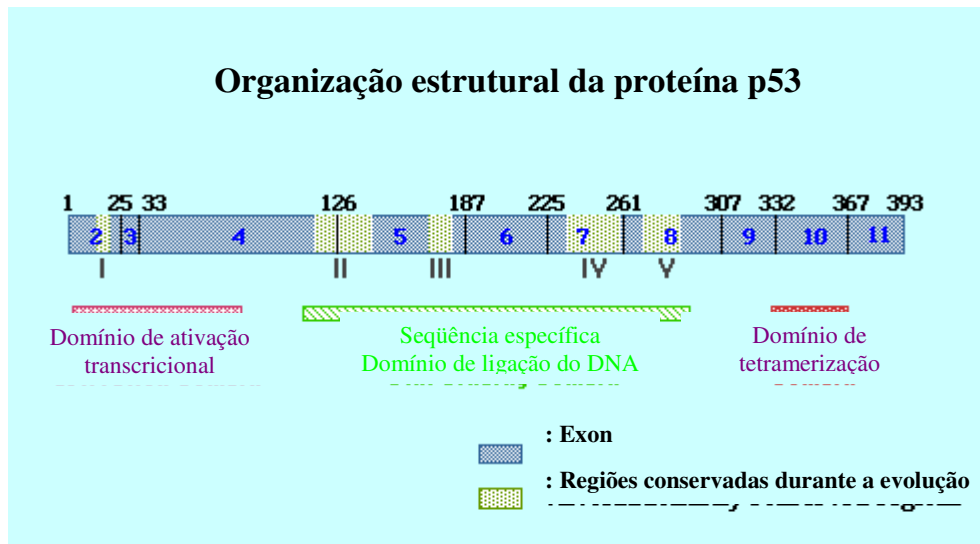
O gene *p53* está localizado no braço curto do cromossomo 17 em 17p13.1 (BENCHIMOL et al., 1985). Ele codifica uma proteína com 393 aminoácidos (53 kDa), que contém quatro domínios distintos, um domínio de N-terminal; um domínio de ligação ao DNA, na região central da proteína; um domínio de tetramerização e um domínio de regulação carboxi-terminal (Figura 5). Na célula, a proteína *p53* se liga ao DNA, na forma de tetrâmero, que então estimula outro gene a produzir a proteína *p21*, a qual interage com a proteína estimuladora da divisão celular, chamada *cdk-2*. Quando *p21* se liga a *cdk2*, a célula não prossegue para a fase seguinte do ciclo de divisão. Nesse momento, ou a célula corrige o defeito e prossegue o ciclo celular, ou entra em apoptose, através da ativação de *PUMA* pelo *p53* (EL-DEIRY et al., 1993; HEMANN et al., 2004).

O *p53* é constituído por 11 exons. A grande maioria das mutações adquiridas (80%) descobertas nos carcinomas encontra-se em quatro regiões localizadas do exon 5 ao 8 (HARRIS, 1993; HOLLSTEIN et al., 1993; REINCKE et al., 1994), entre os resíduos 102 e 292. A síndrome de Li-Fraumeni é caracterizada por uma alta incidência de sarcoma diagnosticado precocemente, e ao menos 2 parentes de primeiro grau com câncer ocorrendo antes da idade de 45 anos, entre eles, câncer de mama, tumor cerebral, leucemia e TCA (MALKIN et al., 1990). KLEIHUES et al. (1997) descreveram os tumores associados com essas mutações em 91 famílias e encontraram que os TCA responderam por 3,6% do total. Nas famílias com síndrome de Li-Fraumeni e mutações localizadas nos domínios de ligação ao DNA (exons 5-8), os códons mais afetados são 175, 248, 273 e 282. Contudo, algumas crianças com TCA, na ausência de síndrome de câncer familiar, apresentam mutações em outras regiões do *TP53* (VARLEY et al., 1999).

REINCKE et al. (1994) investigaram mutações no *TP53* nos exons 5-8, região altamente conservada, em 16 TCAs humanos e duas linhagens celulares de TCA. Mutações de ponto isoladas foram detectadas em 3 de 11 pacientes com TCA (27%) e nas duas linhagens celulares. As mutações foram encontradas nos códons 151, 152, 193 e 248 e resultaram em substituições de aminoácidos de caráter não conservativo.

LIN, LEE e TSAI (1994) relataram uma mutação no exon 4 em TCAs benignos (60% adenomas de córtex adrenal e 50% feocromocitomas), em pacientes do Taiwan. As mutações na maioria dos tumores adrenais estudados foram identificadas nos códons 100,102 e 104. REINCKE et al. (1996) não encontraram essa mutação em pacientes caucasianos dos EUA e Europa, sugerindo que fatores étnicos e ambientais possam ser responsáveis pelo espectro de mutações do *p53*.

FIGURA 5 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA p53



FONTE: KO e PRIVES. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev*, v.10, n.9, p.1054-1072, 1996.

Analisando 14 casos de TCA em crianças, VARLEY et al. (1999) encontraram mutações no códon 152 (Pro→Leu, CCG →CTG) em 6, em códon 158 (Arg →His, CGC→CAC) em 3. Um paciente apresentou uma mutação no códon 213 e outra, silenciosa, no códon 251.

SREDNI et al. (2003) analisaram a expressão de p53, por imunohistoquímica, em 21 TCAs de crianças e 36 de adultos. Nesta amostra, somente 3 tumores de crianças foram classificados como malignos e todos foram p53 positivos com acúmulo de p53 no núcleo. Entre os 18 tumores clinicamente benignos, somente 4 foram p53 positivos. Os autores concluíram que, para essa série de pacientes, a expressão de p53 foi relacionada ao comportamento clínico de TCA em crianças e que os achados sugerem um papel para p53 na progressão dos TCA. O critério, para considerar clinicamente benigno, foi a ausência de doença recorrente ou metastática após um período de 24 meses.

2.12.1 Penetrância dos TCAs

LEBIHAN¹⁰ et al., (apud VARLEY et al., 1999, p.1003), referem que as estimativas de penetrância, em indivíduos com uma mutação germinativa em *p53*, estão em torno de 90% com idade média de diagnóstico de tumores aos 28 anos. Esses dados, contudo, foram baseados na análise de pequeno número de famílias que preenchem critérios para síndrome de Li e Fraumeni (LFS) ou LFS-like (LFL ou LFS-*símile*).

Nos casos apresentados por VARLEY et al. (1999), as crianças com TCA não apresentavam história familiar de câncer típica de LFS, e as idades de início dos tumores de mama e cérebro nessas famílias foi mais tardia do que aquelas verificadas na síndrome clássica. Além disso, outros tumores foram descritos nessas famílias, habitualmente não associados com LFS, como câncer de pulmão, útero e cervical. Os autores concluíram que as mutações identificadas nos códons 152 e 158 do *p53* são de penetrância relativamente baixa.

A mutação identificada em 97% dos TCAs de crianças do Paraná foi a *TP53* R337H, localizada no exon 10, com mudança do códon CGC para CAC, e substituição de arginina por histidina (RIBEIRO et al., 2001). A penetrância da mutação R337H foi estimada por FIGUEIREDO et al., (submetido), como sendo aproximadamente 10 %, a partir da análise de 41 pacientes e mais de 900 parentes, provenientes de 30 famílias. Estes autores descreveram também o aparecimento de 2 ou mais casos de TCA em 8 famílias, e apresentaram outras 7 famílias que preencheram os critérios de LFL segundo BIRCH et al., (1994), dados não encontrados em publicação anterior de SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA, 1997.

2.12.2 Perda de Heterozigose (LOH), Hipótese de Knudson e Teoria do Fenótipo Mutador

¹⁰ LeBIHAN, C.; MOUTOU, C.; BRUGIÈRES, L.; FEUNTEUN, J.; BONAITI-PELLIÉ, C. ARCAD: a method for estimating age-dependent disease risk associated with mutation carrier status from family data. *Genet Epidemiol*, v. 12, p. 13-25, 1995

A noção de que um ou mais produtos gênicos possam inibir a proliferação de células de um tumor deriva de estudos realizados por HARRIS et al. (1969). Nestes experimentos, uma célula cancerosa, que havia formado tumor em um animal, foi fusionada com uma célula normal não causadora de tumor. As células híbridas resultantes cresceram no meio de cultura e, na maioria dos casos, retiveram muito do fenótipo da célula cancerosa que lhes deu origem, mas não produziram tumor em animais. Assim, uma célula híbrida derivada de uma célula cancerosa e outra não-cancerosa não produziu tumor, sugerindo que um ou mais genes da célula normal foram dominantes e suprimiram o potencial de indução de tumor da célula cancerosa. Esses resultados foram alcançados com células cancerosas obtidas através de transformação por agentes virais ou tratamento com carcinogênicos químicos e, também, com diferentes tecidos tumorais. Com a evolução desses estudos, foi verificado, ocasionalmente, que uma célula híbrida resultante de uma célula normal e uma célula cancerosa poderia produzir tumor em animais. A análise dessas células demonstrou que elas haviam perdido um ou mais cromossomos provenientes da célula normal que lhes deu origem. Técnicas de fusão de uma microcélula, contendo apenas o cromossomo que se pretendia analisar, com a célula cancerosa, permitiram identificar diferentes cromossomos portadores de genes supressores de tumor, capazes de bloquear a formação dos mesmos (SAXON, SRIVATSAN e STANBRIDGE, 1986). Células tumorais com diferentes mutações genéticas foram fusionadas e o resultado foi uma célula híbrida, com complementação genética, que não desenvolveu tumor. Um conceito decorrente dessa observação é o de que a célula cancerosa deve apresentar mutação em ambos os alelos desses genes, para adquirir a habilidade de desenvolver tumores.

Estudos epidemiológicos, desenvolvidos por KNUDSON, (1971), com pacientes com retinoblastoma vieram dar suporte a essa idéia. KNUDSON notou que cerca de 40% dos retinoblastomas ocorriam em crianças nos dois primeiros anos, com média de 14 meses de idade. Nesse caso, os tumores eram bilaterais, e os pacientes tinham em média três tumores em cada olho. Se os tumores eram tratados precocemente, esses pacientes teriam, mais tarde, alta incidência de sarcoma osteogênico. Alguns desses pacientes foram de famílias com história de

retinoblastoma, sugerindo uma predisposição hereditária para o desenvolvimento das neoplasias. KNUDSON também notou que 60% dos retinoblastomas não apresentavam esse padrão; nenhuma história familiar de tumor era detectada e a idade de aparecimento era mais elevada, com média de 30 meses. Eles eram unilaterais e únicos no globo ocular. Postulou então que haveria um *locus* genético, que mais tarde foi chamado de gene de susceptibilidade ao retinoblastoma (gene *RB*). Pacientes do primeiro grupo herdariam uma cópia defeituosa desse gene e a ocorrência de uma mutação no alelo normal, na célula somática, levaria ao aparecimento dos tumores (KNUDSON, 2001). Pacientes do segundo grupo, com tumor unilateral único, herdariam dois alelos normais do gene *RB*. Nos pacientes portadores de uma mutação na célula germinativa e um alelo normal (portanto, heterozigóticos), a perda do alelo normal, mediante uma segunda mutação, levaria à homozigose o que equivale à perda da heterozigose (CAVENEY et al., 1983). Assim, na forma hereditária do retinoblastoma, o alelo da célula mãe contendo uma mutação estava presente em todas as células do paciente e um segundo evento (perda do alelo normal) levava ao desenvolvimento da célula cancerosa. Na forma esporádica, dois eventos deveriam ocorrer na célula somática, o retinoblasto, para o desencadeamento do tumor. Essa é a hipótese conhecida como “mutação em dois eventos” de KNUDSON, para genes supressores de tumor.

A análise de LOH do gene *p53* nos pacientes descritos por VARLEY et al. (1999) mostrou que tumores de pacientes com mutações nos códons 158 ou 213 tiveram poucas alterações adicionais, limitadas à perda do alelo normal. Ao contrário, tumores de pacientes com mutações no códon 152 mostraram elevado número de mutações somáticas adicionais. Das 17 mutações somáticas caracterizadas, 14 envolveram a transição C→T/G →A.

RIBEIRO et al. (2001) pesquisaram a LOH em DNA de 6 TCAs, utilizando análise de seqüenciamento de DNA. Cinco dos seis apresentaram somente o alelo mutado; ensaios de reação em cadeia de polimerase com amplificação do exon 10 seguida por digestão com *HhaI* (que cliva somente a

seqüência do gene *p53* no alelo normal) confirmaram a análise de seqüenciamento. Portanto, esses tumores sofreram LOH retendo o alelo mutante R337H. Em 8 de 11 TCAs analisados por LATRONICO et al. (2001) foi observada LOH. Há duas possibilidades para não ter sido encontrada LOH em 100% dos tumores analisados: é possível que o alelo *p53* normal permaneça no TCA ou que o alelo normal encontrado pelos autores seja proveniente de outras células, como fibroblastos, presentes nos TCAs.

As taxas de mutação das células normais são insuficientes para justificar as múltiplas mutações observadas nas células cancerosas e, assim, mutações que aumentem a taxa de mutações seriam necessárias para explicar o grande número de mutações observadas nos tumores humanos. Essa é a premissa básica da hipótese do fenótipo mutador, inicialmente postulada para mutações nos genes que controlam a fidelidade da replicação do DNA e/ou a eficácia do reparo do DNA.

2.13 MUTAÇÃO *TP53* R337H CAUSANDO O TCA NO ESTADO DO PARANÁ

O alelo *TP53* R337H descrito por RIBEIRO et al. (2001) está associado ao desenvolvimento de tumor, específico do córtex adrenal. Em condições normais, a proteína *p53* assume preferencialmente a forma em tetrâmero para se ligar e ativar o DNA.

O mutante *TP53* R337H, por sua vez, não é estável na forma de tetrâmero, quando em condições de pH e/ou temperatura elevados (DIGIAMMARINO et al., 2002) (Figura 6).

Os monômeros normalmente se agrupam formando dímeros, depois, formam-se dímeros de dímeros, compostos de quatro hélices flanqueadas por fitas β no sentido anti-paralelo (cada monômero *p53* contribui com uma fita β e uma hélice). A arginina 337 forma uma ponte de sal com ácido aspártico 352 através da interface hélice-hélice nos dímeros.

conformação adequada, em temperatura fisiológica. Portanto, a proteína mutada (p53tet-R337H) é menos estável que o tipo normal (p53), sendo sensível a mudanças de pH e temperatura (LEE et al., 2003).

A extensa remodelagem tecidual que ocorre através de apoptose seletiva na glândula adrenal durante o período pré-natal e pós-natal imediato pode favorecer a desestabilização do mutante R337H. Nas células apoptóticas, frequentemente ocorre um aumento de pH e a resultante perda da função do *TP53* R337H favorece a sobrevivência de células de alto risco para transformação maligna. HAINAUT (2002) considerou R337H como sendo a “assinatura” da mutação do *p53*, de forma análoga à mutação somática R249S (arginina para serina), induzida pela aflatoxina B observada em câncer de fígado encontrado na Ásia e na África.

Após a identificação da mutação R337H pelo grupo de pesquisadores de Curitiba, LATRONICO et al. (2001) pesquisaram a presença dessa mutação em 55 pacientes (37 adultos e 18 crianças) com TCAs esporádicos, benignos ou malignos, sem características familiares de LFS. Também foram avaliados 21 parentes dos pacientes e 60 indivíduos não aparentados, sem tumor. A mutação foi identificada em 19 pacientes, 14 crianças (77,7%) e 5 adultos (13,5%), demonstrando que não é uma mutação restrita aos TCAs do grupo pediátrico.

Considerando a elevada frequência da mutação germinativa R337H na população do sul do Brasil, foi aventada a possibilidade de existir um ancestral comum. RIBEIRO et al. (2001) analisaram quatro diferentes marcadores polimórficos ao longo do braço curto do cromossomo 17 e demonstraram que, ao menos alguns alelos mutantes se originaram independentemente, assim eliminando a presença de um efeito fundador. Já, recentemente, PINTO et al. (2004) publicaram estudo no qual analisaram dois marcadores polimórficos intragênicos (VNTRp53 e p53CA). Dois alelos, ambos com 122 pares de bases, foram identificados em 56,8% (VNTRp53) e 54,5% (p53CA) dos 44 alelos dos pacientes com TCA sugerindo efeito fundador. Análise de heredogramas de famílias no Paraná indica que a mutação R337H surgiu há pelo menos 110 anos (FIGUEIREDO et al., submetido).

2.14 HIBRIDIZAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (HGC) E AMPLIFICAÇÃO DE 9q34

Alguns TCA tratados em Curitiba foram também estudados pela técnica de HGC que permite uma avaliação ampla do genoma tumoral, para identificar ganhos e perdas cromossômicas (DU MANOIR et al., 1993; HOULDSWORTH e CHAGANTI, 1994; KJELLMAN et al., 1996). No mecanismo de formação do tumor, admite-se que regiões de ganhos possam conter oncogenes, enquanto que genes supressores de tumor possam estar presentes nas regiões deletadas. A importância de alterações numéricas recorrentes, do número de cópias de cromossomos e genes, no desenvolvimento e progressão dos tumores sólidos, tem sido caracterizada em mais de 1000 publicações aplicando HGC (KNUUTILA, AUTIO e AALTO, 2000).

KJELLMAN et al. (1996) analisaram 22 tumores de adultos, pelo mesmo método, e encontraram alterações em 7 de 8 carcinomas e em 2/14 adenomas (ambos com 5 cm). Nos carcinomas, as perdas foram vistas mais freqüentemente no cromossomo 2 e regiões 11q e 17p (4/8 tumores), enquanto que os ganhos foram encontrados nos cromossomos 4 e 5 (4/8 tumores).

Em 1999, FIGUEIREDO et al. (Apêndice 1) analisaram, por meio de HGC, 9 TCAs, sendo 5 carcinomas e 4 adenomas. Ganhos de material genético foram encontrados nos seguintes cromossomos: 1, 5p, 5q, 6p, 6 8p, 8q 91, 10p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 18q, 19 e 20q enquanto que perdas foram observadas em 2q, 3, 4, 9p, 11, 13q, 18, 20p e Xq. O achado mais marcante foi o ganho do número de cópias no *locus* 9q34 em 8 de 9 tumores. JAMES et al. (1999) publicaram os resultados obtidos da análise de 11 TCAs pediátricos, analisados por HGC, confirmando a ocorrência de amplificação da região 9q34.

RUSSEL et al. (1999) detectaram ganhos no cromossomo 9 tanto em adenomas (3/14) quanto em carcinomas (5/10), porém não especificaram a região do cromossomo envolvida. A idade não foi especificada, citando apenas uma paciente com 13 anos.

A região 9q34 alberga vários genes que poderiam estar amplificados. Entre eles, salientam-se o oncogene *ABL*, envolvido na etiopatogênese de algumas leucemias mielóides

crônicas e linfóides agudas (CHISSOE et al., 1995); o gene supressor de tumor descrito como gene 1 da esclerose tuberosa (*TSC1*), presente em um amplo espectro de tumores conhecidos como hamartomas (GREEN, JOHNSON e YATES, 1994); gene ou genes envolvidos na gênese do câncer de ovário e síndrome do carcinoma basocelular nevóide familiar (síndrome de Gorlin) (DEVLIN et al., 1996); carcinoma de células transicionais da bexiga; o gene do receptor alfa X retinóide (JONES et al., 1993); o oncogene *VAV-2* (HENSKE et al., 1995); gene ϕ receptor-1 ϕ fator β transformador ϕ crescimento (*TGFBR1*) (JOHNSON et al., 1995), que é um receptor para ativina A. Entretanto, na região vizinha, 9q33, está localizado o gene envolvido na síntese das enzimas esteroidogênicas (TAKETO et al. 1995), que é conhecido como *SF-1* (RICE et al., 1991; MOROHASHI et al., 1993; PARKER et al., 2002). Juntas, as regiões 9q33 e 9q34 contêm 26 milhões de pares de bases. A sensibilidade da HGC é limitada para alterações menores que 5 a 10 megabases. Alterações afetando regiões menores que essas somente são detectáveis no caso de ampliações de alto grau (em geral ampliações de 5 a 10 vezes 1 Mb) (FOROZAN et al., 1997). Portanto, conquanto a leitura da amplificação tenha sido feita para 9q34, a região 9q33 pode estar aí representada, em função da falta de resolução do método.

É difícil conhecer as conseqüências funcionais de ganhos ou perdas de cópias únicas de regiões do genoma, pois freqüentemente se estendem por dezenas a centenas de megabases e podem afetar centenas a milhares de genes.

Numerosas associações entre anormalidades genômicas e comportamento clínico têm sido estabelecidas. A associação de amplificação do *ERBB2* com redução da sobrevivência de indivíduos com câncer de mama é um exemplo. Amplificação do *MYCN* com Nb metastático em crianças é um forte indicador prognóstico negativo (SEEGER et al., 1985). WEISS et al. (1997) demonstraram, em modelo transgênico, que o aumento do número de cópias do gene *MYCN* pode contribuir para a gênese do neuroblastoma, e de fato iniciar a seqüência de eventos que desenvolvem este tumor no camundongo.

Torna-se assim atraente a idéia de que o gene amplificado em 9q34 tenha atividade oncogênica e *SF-1*, pelo seu papel na esteroidogênese, proliferação

adrenal e interação com outros fatores de transcrição, é um forte candidato para desempenhar um papel na promoção e progressão do TCA.

Da revisão apresentada, pode-se extrair a seguinte formulação de hipótese sobre a iniciação e progressão dos TCAs nas crianças do Paraná e São Paulo. O principal fator, que representa predisposição genética ao desenvolvimento de TCA, é a mutação *TP53* R337H. Como essa mutação ocorre em um gene supressor de tumor, envolvido na gênese de muitos tumores, o *p53* pode ser o principal fator de iniciação dos TCAs, já que está presente em 97% dos tumores estudados (RIBEIRO et al., 2001). De acordo com a teoria do fenótipo mutador, mutações que ocorrem nos genes que controlam a fidelidade da replicação do DNA podem alterar os produtos que funcionam para manter a seqüência de DNA normal da célula, criando-se instabilidade genômica, de tal forma que a célula perde o controle de processos como segregação cromossômica, supervisão de danos ao DNA e resposta celular (em geral, apoptose). Como resultado dessas mutações, podem ser encontradas mutações de ponto, instabilidade de microsatélite e LOH, esta última já detectada nos TCAs de crianças. Em consequência da mutação *TP53* R337H, outras alterações podem se instalar, entre elas, a amplificação de 9q34, cujo mecanismo de origem ainda é desconhecido, e que leva à instabilidade cromossômica (LENGAUER, KINZLER e VOGELSTEIN, 1998). A diversidade de funções exercidas pelos produtos dos genes supressores de tumor, tanto em nível nuclear, quanto citoplasmático, pode desestabilizar completamente o genoma, produzindo desequilíbrios quantitativos na expressão de outros genes com papéis relevantes na proliferação celular, cujos efeitos são dependentes do seu número de cópias. E, por fim, a proposta de múltiplos passos feita para o desenvolvimento de câncer de cólon (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993) pode ser aplicada por analogia aos TCAs, salientando-se que a seqüência de eventos não precisa estar necessariamente representada numa única célula pesquisada. Tais eventos não são, na sua totalidade, obrigatoriamente permanentes, porém, embora transitórios, podem desencadear alterações que levam definitivamente à expressão do potencial maligno das células.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Revisão de Registros e Confirmação de Óbitos por TCA (grupo 1A) e Neuroblastoma (grupo 1B)

Retrospectivamente, foram analisadas todas as declarações de óbitos de crianças abaixo de 15 anos de idade, do período de 1998 a 2003. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, HC-UFPR (Anexo 1). Não houve utilização de termo de consentimento esclarecido por se tratar de um estudo com dados indiretos e porque a procura dos familiares, para solicitação da autorização, poderia causar agravo emocional.

Foram selecionadas as declarações de óbito catalogadas pela Classificação Internacional de Doenças (CID) C-74, que inclui em seus sub-itens a C74.0 (córtex da supra-renal), a C74.1 (medula da supra-renal) e a C74.9 (glândula supra-renal, não especificada). Os dados foram cedidos pelo Sistema de Informação de Mortalidade (SIM) que, desde 1997, foi estabelecido pelo Ministério da Saúde, para registro de declarações de óbito, na forma de notificação obrigatória. Este registro é feito a partir das declarações de óbitos do Estado do Paraná, sob a coordenação do Centro de Informação e Diagnóstico de Saúde, da Secretaria de Estado da Saúde do Paraná. Foram analisadas as declarações referentes apenas à região metropolitana de Curitiba, que inclui 26 municípios e uma população de 2.768.394 habitantes (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, censo demográfico 2000). Os municípios que compõem a região metropolitana de Curitiba são: Adrianópolis, Agudos do Sul, Almirante Tamandaré, Araucária, Balsa Nova, Bocaiúva do Sul, Campina Grande do Sul, Campo Largo, Campo Magro, Cerro Azul, Colombo, Contenda, Curitiba, Doutor Ulisses, Fazenda Rio Grande, Itaperuçu, Lapa, Mandirituba, Pinhais, Piraquara, Quatro Barras, Quitandinha, Rio Branco do Sul, São José dos Pinhais, Tijucas do Sul, Tunas do Paraná. As declarações contêm o local de

nascimento do indivíduo, local de residência e de óbito. A distribuição quanto aos locais de origem se baseou no endereço de residência das crianças.

A população utilizada para o cálculo da taxa de mortalidade foi a referente ao ano 2000, obtida do DATASUS/MS (Departamento de Informação e Informática do Sistema Único de Saúde/Ministério da Saúde - Censo Demográfico). Essa data foi selecionada por ser um dos anos situados no meio do período estudado, o que supõe não sofrer variações bruscas dos dados demográficos, por fatores esporádicos de migração ou epidemias. O diagnóstico de tumor de adrenal (TCA e neuroblastoma) foi investigado mediante contato telefônico com o médico que atendeu o paciente no momento do óbito ou com os oncologistas pediátricos, nos casos em que esse evento ocorreu nos hospitais que dispõem de serviços de oncologia. Cópias dos exames anátomo-patológicos foram obtidas em todos os casos.

Quando os médicos confirmaram o diagnóstico de neuroblastoma, foi solicitado informar qual a localização primária do tumor, se abdominal ou não e, quando abdominal, se originário da adrenal ou de gânglios pára-vertebrais; os médicos consultaram os prontuários e retornaram as informações, com base em laudos histopatológicos.

3.1.2 Seleção da Amostra para Análise de SF-1 e DAX-1 (grupos 2A, 2B e 2C)

Amostras de TCAs de 27 crianças foram utilizadas para análise por hibridização *in situ* fluorescente (FISH) (grupo 2A, n=9, correspondendo aos tumores dos pacientes 1 a 9), por FISH e *Western-blot* para *SF-1* (grupo 2B, n=10, correspondendo aos tumores dos pacientes 10 a 19), ou por microarranjo e *Western-blot* para *DAX-1* (grupo 2C, n=14, correspondendo aos tumores dos pacientes 10, 11, 14, 15, 16 e 20 a 27). Tecidos de 19 tumores primários e 8 recidivados (pacientes 2, 3, 14, 18, 19, 22, 23 e 27) foram utilizados. Esta pesquisa foi avaliada em projeto aprovado pelo Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, do HC-UFPR e do Hospital Erasto Gaertner, da Liga Paranaense de Combate ao Câncer (HEG-LPCC) (anexos 2 e 3). Os termos de consentimento livre e esclarecido, elaborados segundo a resolução 196/96 do Ministério da Saúde, foram assinados por um dos pais de cada

paciente com TCA e/ou glândula adrenal normal, utilizada para controle.

As amostras de tumores foram obtidas de duas formas: dos descartes das salas de cirurgia do HC-UFPR e do HEG-LPCC, e conservadas a -80°C ou em blocos de parafina arquivados e cedidos pelos Serviços de Anatomia Patológica do HC-UFPR E HEG-LPCC. As amostras de tumores congeladas foram mantidas no banco de tumores do Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC). A seleção do tecido tumoral foi feita escolhendo-se áreas de tumor macroscopicamente viável, evitando-se áreas necrosadas ou císticas.

Amostras de três adrenais normais foram obtidas por ocasião de cirurgia para tumor de Wilms, de três meninos, nos quais a referida glândula seria retirada para conseguir ressecção total do tumor.

3.1.2.1 Características dos pacientes (grupos 2A, 2B e 2C)

De acordo com os sinais ou sintomas, os pacientes foram classificados em uma das quatro formas clínicas apresentadas abaixo (JOB, 1980; NEW et al., 1990):

- a) Síndrome de Cushing, quando apresentasse os sinais: obesidade centrípeta, *fascies* de “lua cheia”, giba, pletora, retardo do crescimento, hipertensão arterial, hipotrofia muscular, acne e/ou abdome proeminente.
- b) Forma com síndrome virilizante: apresentando, no caso de meninas, clitorimegalia, pubarca precoce e/ou hirsutismo, voz grave, hipertrofia muscular, crescimento acelerado e acne; e nos meninos, pseudo-puberdade precoce, com os típicos sinais de aumento da pilificação pubiana, aumento de tamanho do pênis, sem aumento concomitante do tamanho testicular, crescimento acelerado, hipertrofia muscular.
- c) Forma mista: quando ocorresse uma combinação de sinais clínicos de virilização e síndrome de Cushing; considerou-se também como forma mista a associação de síndrome de Cushing e hiperaldosteronismo.

- d) Forma não-funcionante: na ausência de manifestações clínicas e/ou laboratoriais de aumento de produção hormonal adrenocortical.

Das 27 crianças, 19 eram do sexo feminino e 8, do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 9 a 152 meses, com média de 47 ± 42 meses, e mediana de 32 meses. Dezesesseis pacientes apresentavam a forma clínica virilizante, dez pacientes, a forma virilizante associada com síndrome de Cushing e uma paciente apresentava hiperaldosteronismo e síndrome de Cushing. Vinte e seis pacientes foram referidos à Unidade de Endocrinologia Pediátrica do HC-UFPR. Tumor de um paciente foi obtido do Serviço da Dra. Maria José Mastellaro (Clínica CLEMED, Jundiaí, SP).

Os tumores foram classificados como adenomas (tumores benignos) ou carcinomas (tumores malignos) de acordo com critérios histopatológicos convencionais, como descrito previamente (WEISS, 1984), e modificados por WEISS, MEDEIROS e VICKERY (1989) (Quadro 4).

Quadro 4 - PARÂMETROS MORFOLÓGICOS PARA CARACTERIZAÇÃO DA MALIGNIDADE OU BENIGNIDADE DE TUMORES ADRENOCORTICAIS

1. Grau nuclear	III/IV de acordo com critério de FUHRMAN, LASKY e LIMAS (1982).
2. Índice mitótico	Acima de 5 mitoses por 50 campos de grande aumento.
3. Mitoses atípicas	Distribuição anormal de cromossomos ou número excessivo de fusos mitóticos.
4. Citoplasma	As células claras representam 25% ou menos do tumor.
5. Arquitetura do tumor	Difusa se mais de 1/3 do tumor é composto por camadas de células sem um padrão definido.
6. Necrose	Presente se ocorre ao menos em ninhos confluentes de células.
7. Invasão de estruturas venosas	Invasão inequívoca de vasos endoteliais com músculos lisos como componentes da parede.
8. Invasão de estruturas sinusoidais	Invasão inequívoca de vasos endoteliais sem estrutura de suporte.
9. Invasão da cápsula do tumor	Presente se ninhos ou cordões do tumor se estendem dentro ou através da cápsula com reação correspondente do estroma.

FONTE: WEISS (1984), MODIFICADO POR WEISS, L.M.; MEDEIROS, L.J., VICKERY, A.L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 13, n. 3, p. 202-206, 1989.

NOTA: Presença de 2 caracteres: TUMOR BENIGNO (adenoma); presença de 3 ou mais caracteres: TUMOR MALIGNO (carcinoma)

Os carcinomas foram classificados em estádios de acordo com o sistema proposto por RIBEIRO et al. (1990, Quadro 5). A classificação em estádios não se aplicou para adenomas.

QUADRO 5 - ESTADIAMENTO DOS TCAs

Estádio	Descrição
I	Tumor removido completamente, ausência de metástases, volume do tumor menor que 200cm ³ e níveis hormonais normais até 2 semanas após a cirurgia;
II	Tumor residual microscópico ou tumor maior que 200cm ³ ou persistência de níveis anormais de hormônios adrenais por mais de 2 semanas após a cirurgia ou <i>spillage</i> do tumor durante a cirurgia, ou tumor recidivante;
III	Tumor residual macroscopicamente visível ou tumor inoperável;
IV	Doença metastática.

FONTE: RIBEIRO et al. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J. Clin. Oncol.**, v. 8, n. 1, p. 67-74, 1990.

NOTAS: *spillage* é definido como (1) ruptura da cápsula do tumor durante a cirurgia ou (2) exposição de trombo vascular tumoral durante a cirurgia.

Como a avaliação foi feita retrospectivamente, com base nos dados registrados nos prontuários, não houve uniformidade nas técnicas de dosagens hormonais realizadas, pelo laboratório de Medicina Nuclear do HC-UFPR, no período estudado. A unidade de determinação de cortisol foi descrita em µg/dl. Como vários métodos foram utilizados para a determinação de sulfato de deidroepiandrosterona, optou-se por apresentar os resultados em número de vezes o valor normal para cada método.

Sete tumores foram classificados como adenomas e 20 como carcinomas. A distribuição dos carcinomas quanto ao estadiamento foi a seguinte: 7 em estágio I, 9 em estágio II, 3 em estágio III e 1 em estágio IV. Essas

características, bem como os dados clínicos e laboratoriais foram coletados dos prontuários da Unidade de Endocrinologia Pediátrica e encontram-se resumidos nas tabelas 4 e 5.

TABELA 4 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES
COM TCA (PARTE 1)

NÚMERO	SEXO	IDADE (MESES)	HISTOLOGIA	ESTÁDIO	VOLUME DO TUMOR (CM ³)	SITUAÇÃO ATUAL	CORTISOL PLASMÁTICO (UG/DL)	DHEA-S PLASMÁTICO (Nº VEZES O NORMAL)
1	F	9,5	Ca	I	27	V	NR	NR
2	F	9	Ca	I	25	O	21,14	25
3	F	82	Ca	III	650	O	NR	NR
4	M	23	Ca	I	25	V	16,2	NR
5	M	13	Ca	II	380	V	47,68	9
6	F	17	Ca	I	26	V	14,1	3
7	F	27	Ad	NA	48	V	18,84	NR
8	M	35	Ad	NA	16	V	9,83	NR
9	F	68	Ad	NA	5	V	NR	NR
10	F	139	Ad	NA	90	V	19,6	9
11	F	43	Ad	NA	21	V	10,8	17
12	F	11	Ad	NA	24	V	10,9	14
13	F	52	Ca	II	1800	O	25,4	>3
14	M	110	Ca	II	968	O	51,5	10
15	M	21	Ca	I	61	V	10,1	2
16	M	25	Ca	I	108	V	23,5	NR
17	F	39	Ca	III	1450	O	13,5	NR
18	M	72	Ca	III	196	O	23,9	NR
19	F	130	Ca	II	924	V	21,5	2
20	F	32	Ad	NA	20	V	10,2	1
21	F	9	Ca	II	527	V	43,3	29
22	F	20	Ca	II	338	V	24,8	>3
23	F	59	Ca	II	384	O	12,4	5
24	M	50	Ca	II	NV	V	50,9	NR
25	F	9	Ca	II	450	V	32,2	44
26	F	18	Ca	I	120	V	11	>3
27	F	152	Ca	IV	369	O	31,3	1

NOTA: NR - Não realizada antes da cirurgia; F – feminino; M – masculino; Ad – adenoma; Ca – carcinoma; V - vivo; O – óbito; NV – não verificado.

TABELA 5 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E LABORATORIAIS DOS PACIENTES COM TCA (PARTE 2)

NÚMERO	FORMA CLÍNICA	PILIFICAÇÃO PUBIANA (TANNER)*	ACNE	VOZ GRAVE	CLITORIS / PÊNIS ↑	FASCIES "LUA CHEIA"	HIPEREMIA MALAR	GIBA TORÁCICA	OBESIDADE CENTRÍPETA	ESTRIAS	IRRITABILIDADE	OLEOSIDADE	HAS
1	Vir+C	2	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
2	Vir	3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
3	Vir+C	4	+	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+
4	Vir+C	1	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
5	Vir+C	1	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	+
6	Vir	3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
7	Vir	4	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
8	Vir	2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
9	Vir	3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Vir	5	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
11	Vir	4	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
12	Vir	3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
13	Vir	3	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
14	Vir+C	5	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	+
15	Vir	3	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
16	Vir+C	3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
17	Vir	3	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
18	Vir	1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
19	Vir+C	3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-
20	Vir	2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-
21	Vir+C	3	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
22	Vir	3	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
23	Vir	2	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
24	Vir+C	3	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
25	Vir+C	3	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
26	Vir	2	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-
27	C+HIP	4	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+

NOTAS: Vir - Síndrome virilizante; C - Síndrome de Cushing; HIP - Hiperaldosteronismo; HAS - Hipertensão arterial; * grau de pilificação pubiana de acordo com Tanner (P1 a P5) (MARSHALL & TANNER, 1969 e 1970); + = presente; - = ausente.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Cálculo do coeficiente de mortalidade e da incidência de TCA

O coeficiente de mortalidade, padronizado por idade, foi calculado pelo método direto, usando a população padrão mundial para grupos etários abaixo de 15 anos (WATERHOUSE et al., 1982) (Tabela 6). Para cálculo do coeficiente de mortalidade padronizado por idade, foi usada a fórmula 1.

TABELA 6 - COMPOSIÇÃO DA POPULAÇÃO PADRÃO MUNDIAL ABAIXO DE 15 ANOS

Idade (anos)	População padrão mundial	Coeficiente específico por idade
0	2.400	r_0
1 - 4	9.600	r_1
5 - 9	10.000	r_2
10 - 14	9.000	r_3
0 - 14	31.000	

FONTE: WATERHOUSE et al., 1982.

NOTA: r_0 , r_1 , r_2 e r_3 são coeficientes específicos para idade.

FÓRMULA 1 – CÁLCULO DO COEFICIENTE DE MORTALIDADE PADRONIZADO POR IDADE.

$$\text{Coeficiente padronizado por idade} = \frac{[(r_0 \times 2,4) + (r_1 \times 9,6) + (r_2 \times 10) + (r_3 \times 9)]}{31}$$

FONTE: WATERHOUSE et al., 1982.

O intervalo de confiança foi calculado pelo programa *epitable* do EPI-INFO versão 6.4.

O cálculo da incidência de TCA por milhão de crianças abaixo de 15 anos de

idade foi indiretamente calculado através da fórmula 2.

FÓRMULA 2 – CÁLCULO DA INCIDÊNCIA A PARTIR DA MORTALIDADE, SOBREVIDA E LETALIDADE

$$\text{Incidência} = \text{CM} \times \text{S} / \text{L} + \text{CM} \text{ (por milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade)}$$

NOTA : CM = coeficiente de mortalidade padronizado por idade; S = percentual de sobrevida (55%) ; L = percentual de letalidade (45%). O percentual de sobrevida global em 5 anos, igual a 55%, foi baseado no relato do IPACTR, onde 60% de casos registrados são do sul do Brasil (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

3.2.2 Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH)

A hibridização *in situ* fluorescente é um método que permite a visualização de seqüências específicas de ácidos nucleicos, em células individuais, em cromossomos metafásicos ou núcleos interfásicos (PINKEL, STRAUME e GRAY, 1986). O aumento do número de cópias dos genes é facilmente observado com FISH, constituindo um dos grandes impactos na detecção e diagnóstico de neoplasias malignas humanas (GOZZETTI e BEAU, 2000).

3.2.2.1 Preparação das amostras para identificação de seqüências de ácidos nucleicos por meio de FISH

Todos os experimentos de FISH foram realizados no laboratório do Centro de Genética Humana e Molecular, Universidade de Georgetown, EUA, sob orientação do Dr. BASSEM HADDAD.

Para cada tumor, um corte de tecido de 4 μm foi corado com hematoxilina e eosina e histologicamente examinado para confirmar a presença de tecido tumoral; um corte consecutivo em parafina foi avaliado por FISH usando a sonda de *SF-1*.

Cortes de 4 μm dos tumores foram feitos dos blocos de parafina e montados em lâminas. A parafina dos tecidos foi removida através de imersão em solução de xileno, e depois reidratados com concentrações decrescentes de etanol. O material foi processado

de acordo com o protocolo de BLANCATO e HADDAD (2000). Resumindo, após secagem, os cortes foram digeridos em solução ácida, preparada na seguinte proporção: 49,5 ml de água destilada, 0,5 ml de ácido clorídrico (1N) e 250 µl de pepsina a 10%, a 37° C, por 3 horas e 30 minutos. O material digerido foi então desidratado em uma série etanólica de 70, 90 e 100%, por 3 minutos em cada etapa. Após a secagem das lâminas, as proteínas contidas no tecido tumoral foram desnaturadas em solução de formamida a 70%/salina-citrato de sódio (2xSSC) a 80° C, por 4 minutos.

3.2.2.2 Preparação das sondas e hibridização

O DNA do clone genômico BAC RP11-91G7 (BACPAC Resources, Oakland, CA), contendo um fragmento do cromossomo humano 9q33-q34, que contém o gene *SF-1*, foi purificado usando o *Qiagen Large Construct Kit* e a caracterização preliminar do gene *SF-1* foi realizada usando *primers* específicos para o gene e seqüenciamento automatizado fluorescente do DNA. A análise confirmou a localização cromossômica correta do clone BAC no cromossomo 9q34. Usando o processo de *nick translation* (FEINBERG e VOLGESTEIN, 1983), a sonda de DNA foi marcada com biotina-16-dUTP (*Boehringer Mannheim Corporation* ou *Roche*, EUA) e hibridizada, a 37 °C por uma noite, aos cortes de tecido desnaturados. Os cortes foram então lavados três vezes em formamida/SSC 2x (1:1) a 42°C, e três vezes em SSC 1x a 42°C. O DNA marcado com biotina foi detectado usando avidina-fluoresceína (FITC) (*Vector Laboratories, Burlingame, CA*). O núcleo foi contra-corado com 4,6-diamino-2-fenilindol (DAPI) e embebido em agente anti-descoloração. O mapeamento do clone BAC, a eficiência da hibridização da sonda FISH, tanto quanto o número de sinais FISH detectados no núcleo diplóide normal em interfase, foram avaliados nos linfócitos normais, de acordo com o protocolo de mapeamento padrão de FISH (HADDAD et al., 1998). Foram confirmadas a localização cromossômica correta da sonda no cromossomo 9q33.3 e a presença de dois sinais por núcleo diplóide em 98% dos 200 núcleos em interfase contados.

3.2.2.3 Microscopia fluorescente e análise

Um mínimo de 50 núcleos interfásicos, com sinais de hibridização definidos, foram visualmente contados e classificados por dois observadores independentes, usando um microscópio fluorescente Leica DMRBE, equipado com filtros ópticos fluorocromo específicos TR1, TR2 (*Chroma Technology, Brattleboro, VT*). Somente núcleos bem visíveis, únicos e não superpostos foram avaliados. Núcleos nas áreas de cortes teciduais com alta interferência de sinal, ou com sinais de hibridização fracos ou inconsistentes, tanto quanto aqueles de agrupamento de células que pudessem causar ambigüidade na interpretação dos resultados, não foram contados.

Foram considerados tumores com amplificação de *SF-1* aqueles nos quais houve 4 ou mais cópias deste gene em pelo menos 30 % das 50 células pesquisadas.

3.2.3 Técnica de *Western Blot* para Avaliação da Expressão Protéica de *DAX-1* e *SF-1*

Para avaliar a expressão protéica de *SF-1* e *DAX-1*, foi utilizada a técnica de *western-blot*, com eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e dodecil de sulfato de sódio (SDS), seguida de eletrotransferência para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF), baseada no método descrito por TOWBIN, STAEHELIN e GORDON (1979).

O método da eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil de sulfato de sódio (SDS-PAGE) baseia-se na migração de proteínas dependente apenas do seu peso molecular; o SDS, detergente carregado negativamente, se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas, dando origem a longas cadeias polipeptídicas, com a neutralização da carga intrínseca da proteína (LAEMMLI, 1970), principalmente na presença de β -mercaptoetanol, que quebra as pontes dissulfídicas.

3.2.3.1 Preparação das amostras

Para preparar as amostras de tecido tumoral e das três glândulas adrenais normais, mantidas a -85°C até o dia do uso, utilizou-se o tampão Laemmli, contendo tris (30 g/l), glicina (144 g/l) e SDS (10 g/l), com inibidor de protease. Este tampão foi preparado no momento do uso e deixado em banho-maria a 100°C por, aproximadamente, 30 minutos antes de ser acrescentado às amostras. Essas foram então maceradas exaustivamente, transferidas para tubos Eppendorf e fervidas por 5 minutos. Após esse procedimento, as amostras foram fracionadas em alíquotas, para congelamento ou ensaio de eletroforese.

3.2.3.2 Eletroforese

As amostras foram dissolvidas em tampão Laemmli (5 μl /amostra) e aplicadas no gel de acrilamida/bisacrilamida. Variações nas concentrações de acrilamida e bisacrilamida permitem obter malhas de diferentes tamanhos, pela polimerização. O gel de resolução foi então submetido a uma corrente constante de 200V, durante 45 minutos. As bandas protéicas foram reveladas com azul de Coomassie, por 30 segundos e as quantidades de proteínas comparadas, visualmente, para então se proceder à eletroforese definitiva.

Foi então repetido o procedimento de eletroforese, com as quantidades de proteína igualadas entre si e a utilização de um marcador de peso molecular para determinar a posição da proteína de interesse no gel de poliacrilamida.

3.2.3.3 Transferência das proteínas para membrana de PVDF

Os fragmentos de gel de poliacrilamida permaneceram mergulhados em tampão de transferência, por 20 minutos, a fim de evitar alterações no tamanho do gel e de remover os excessos de sais e detergentes do tampão de corrida. As membranas de PVDF foram recortadas no tamanho do gel e colocadas em tampão de transferência por 10 minutos. Em seguida, géis e membranas, dispostos em sanduíches, foram colocados no equipamento de transferência como recomenda o manual do fabricante (Bio-RAD, CA, EUA). A

transferência foi feita a 250 mA, 125V, durante uma hora, sobre agitador magnético.

3.2.3.4 Incubação das membranas de PVDF com anticorpos

Após a transferência, as membranas foram coradas com solução de vermelho de *Ponceau*, corante específico de proteínas, a fim de se verificar se a eletrotransferência ocorreu adequadamente.

As membranas foram então incubadas em solução de PBS com 5% de leite em pó desnatado, durante duas horas à temperatura ambiente, para bloquear os sítios de ligação inespecífica. Em seguida, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário, em diluição 1:1000, durante toda a noite, a 4°C, em agitação suave, constante. Para as mesmas amostras, foram preparadas três membranas simultaneamente, para detecção de SF-1, β -tubulina e DAX-1, respectivamente. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários: monoclonal de camundongo dirigido contra o peptídeo correspondente aos resíduos 135 a 166 da proteína DAX-1 humana (*Chemicon GAB264, Jackson Immunoresearch*), cujo peso molecular é de 50 kDa; monoclonal anti β -tubulina (*Chemicon, Temecula, CA*) proteína humana de caráter constitutivo, de peso molecular igual a 50 kDa; anticorpo policlonal de coelho anti-AD4BP/SF-1 (cedido gentilmente pelo Dr. K. Morohashi), dirigido contra o domínio de ligação de SF-1 ao DNA, cujo peso molecular é 53 kDa. Os anticorpos anti- β -tubulina e anti-DAX-1 foram cedidos gentilmente pelos Dr. ENZO LALLI e PAOLO SASSONE-CORSI, do *Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, de Illkirch, França*.

Pela manhã, as membranas foram lavadas em solução de bloqueio (três vezes de 10 minutos cada) e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a *horseradish peroxidase* a uma diluição 1:5000, durante uma hora, em temperatura ambiente.

A seguir, as membranas foram novamente lavadas em solução de bloqueio (três vezes de 10 minutos cada) e em solução de lavagem (0,05% Tween-20 em PBS), por 10 minutos. Todas as lavagens foram executadas sob

agitação constante.

3.2.3.5 Revelação e quantificação das proteínas pesquisadas

Após a última lavagem, as membranas foram transferidas para PBS e transportadas para a sala de revelação, onde foram incubadas com solução quimioluminescente (*Super Signal® West Pico Chemiluminescent Substrate Pierce kit prod. 34080*) por cinco minutos, como recomenda o fabricante. Imediatamente depois, as membranas foram enroladas em acetato de celulose e montadas em placa de vidro fixada no écran. Finalmente, filmes KODAK foram colocados sobre as membranas e foram expostos ao RX durante vários tempos (1 a 60 minutos), dependendo da intensidade de sinal obtido. A imagem obtida foi transferida mediante *scanner* para o programa de computador ImageJ que quantifica a expressão protéica por densitometria óptica, para SF-1 e DAX-1, em relação à β -tubulina, comparadas a seguir como valor obtido para as adrenais normais.

3.2.4 Quantificação de Transcritos de DAX-1 pela Técnica de Microarranjo

3.2.4.1 Extração e preparação de RNA total

RNA total foi extraído de 50 a 100mg de cada amostra de TCA ou córtex adrenal normal de crianças, usando o *kit Qiagen RNeasy RNA Midi-Prep®* (Valencia, CA). As amostras dos tumores foram preparadas em sala com temperatura ambiente de 4°C, e cortadas em finas camadas usando uma lâmina estéril. Foram então homogeneizadas com uma agulha de calibre 18 ou 19, adaptada a uma seringa de 3 ml, em tampão RLT contendo β -mercaptoetanol em diluição 1:100. O RNA total foi então isolado, utilizando-se o “protocolo para tecidos animais” do manual do fabricante e eluído com 300 μ l de água livre de RNase. RNA total foi concentrado mediante precipitação com etanol.

3.2.4.2 Microarranjo para DAX-1

O GeneChip® U133A 2.0 do genoma humano foi usado para analisar a expressão gênica. A análise do ensaio de microarranjo foi feita pelo Centro Hartwell de Bio-informática do *St. Jude Children's Research Hospital* de Memphis, Tennessee, EUA, de acordo com o manual técnico GeneChip® proposto para análise de expressão gênica fornecido pela Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA).

3.2.5 Análise Estatística

Todos os dados coletados foram digitados em planilha (Microsoft Excel®) e posteriormente exportados para o programa Statistica®.

Para a análise dos dados, considerando a classificação dos casos em três grupos, foram aplicados testes não paramétricos tratando assim as possíveis diferenças de variância decorrentes do tamanho da amostra. Desta forma, para estudar a diferença entre as medianas encontradas para as variáveis contínuas estudadas, foi aplicado o teste de Mann-Whitney, considerando um nível mínimo de significância de 5%.

A análise de correlação de Pearson foi realizada buscando estabelecer tendências de associação entre as variáveis contínuas estudadas, considerando também a restrição de significância determinada pelo tamanho da amostra.

3.2.6 Normas para Apresentação

A elaboração do presente documento seguiu as ‘Normas para Apresentação de Documentos Científicos’ da Universidade Federal do Paraná, publicadas pela Editora UFPR, no ano de 2002, em Curitiba, sob a coordenação de Marildes Rocio Artigas Santos.

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS EPIDEMIOLÓGICOS

4.1.1 Taxa de Mortalidade por TCA abaixo de 15 Anos de Idade, na Região Metropolitana de Curitiba (RMC)

No período de 1998 a 2003, foram registrados, na RMC, 8 óbitos por TCA, sendo cinco na faixa etária de cinco a nove anos e três na faixa de 10 a 14 anos. A taxa de mortalidade por TCA padronizada por idade, para a região metropolitana de Curitiba foi de 1,6 por milhão de crianças com idade inferior a 15 anos (Tabela 7).

TABELA 7 - TAXA DE MORTALIDADE POR TCA, POR MILHÃO DE HABITANTES COM IDADE ABAIXO DE 15 ANOS, PERÍODO DE 1998 a 2003, NA RMC

FAIXA ETÁRIA	POPULAÇÃO DA RMC, ANO 2000	Nº DE ÓBITO NO PERÍODO 1998-2003	TAXA DE MORTALIDADE PADRONIZADA POR IDADE	TMB POR MILHÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA PARA TMB
0-4	257617	-	NA	-	
5-9	255794	5	NA	3,2	2,6-4,0
10-14	255615	3	NA	2,0	0,7-4,9
TOTAL	769026	8	1,6*	1,7	1,4-2,1

NOTAS: RMC – região metropolitana de Curitiba; TMB – taxa de mortalidade bruta; *intervalo de confiança = 1,3 a 1,9; NA = não se aplica

4.1.2 Taxa de Mortalidade por Nb em Pacientes com Idade Inferior a 15 Anos, na RMC

No mesmo período (1998-2003), foram registrados 10 óbitos por neuroblastoma com origem na glândula adrenal. Quando foram a óbito, cinco pacientes tinham menos de quatro anos, quatro tinham de cinco a nove anos e um, mais de 10

anos. Foram também obtidas declarações de óbito por Nb de origem extra-adrenal (Tabela 8).

A taxa de mortalidade padronizada por idade para o Nb adrenal foi de 2,0 por milhão de crianças com idade inferior a 15 anos (Tabela 9).

TABELA 8 - CARACTERÍSTICAS EPIDEMIOLÓGICAS REFERENTES AOS ÓBITOS POR Nb

IDENTIFICAÇÃO	ANO DE ÓBITO	SEXO	IDADE (ANOS) POR OCASIÃO DO ÓBITO	LOCAL DE RESIDÊNCIA	ORIGEM ANATÔMICA DO TUMOR
1Mt	1998	F	4	Curitiba	Adrenal
2Mt	1999	F	5	Curitiba	Adrenal
3Mt	2000	M	2	Curitiba	Adrenal
4Mt	2000	F	7	Curitiba	Adrenal
5Mt	2001	F	4	Curitiba	Mediastino
6Mt	2001	M	4	Colombo	Adrenal
7Mt	2002	M	1	Curitiba	Adrenal
8Mt	2002	M	5	Almirante Tamandaré	Adrenal
9Mt	2002	M	5	Campo Magro	Adrenal
10Mt	2002	F	10	Colombo	Adrenal
11Mt	2003	M	9	Curitiba	Pára-vertebral
12Mt	2003	F	4	Araucária	Adrenal
13Mt	2003	F	4	Curitiba	Pára-vertebral

NOTAS: Mt = mortalidade; M = sexo masculino; F = sexo feminino.

TABELA 9 - TAXA DE MORTALIDADE POR Nb DE ORIGEM ADRENAL, POR MILHÃO DE HABITANTES COM IDADE ABAIXO DE 15 ANOS, NA RMC (1998-2003)

FAIXA ETÁRIA	POPULAÇÃO DA RMC, ANO 2000	Nº DE ÓBITOS NO PERÍODO 1998-2003	TAXA DE MORTALIDADE PADRONIZADA POR IDADE	TMB POR MILHÃO	INTERVALO DE CONFIANÇA PARA TMB
0-4	257617	5	NA	3,2	2,6-4,0
5-9	255794	4	NA	2,6	2,0-3,3
10-14	255615	1	NA	0,7	0,4-1,1
TOTAL	769026	10	2,0*	2,2	1,9-2,5

NOTA: RMC – região metropolitana de Curitiba; TMB – taxa de mortalidade bruta;

* intervalo de confiança = 1,7 a 2,3.

4.1.3 Relação entre Taxas de Mortalidade por TCA e por Nb

A relação entre os óbitos por Nb e os óbitos por TCA foi 10/8 (1,25), e entre as taxas de mortalidade padronizadas por idade foi de 2,0/1,6, ou seja, 1,25.

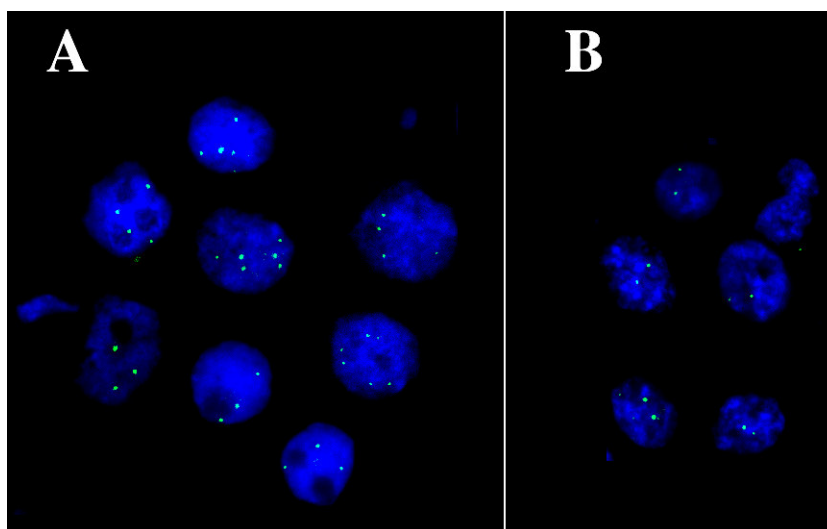
4.1.4 Estimativa da Incidência de TCA em Crianças com Idade Inferior a 15 Anos.

A estimativa da incidência de TCA em crianças com menos de 15 anos de idade foi feita com base na taxa de mortalidade encontrada neste estudo e nos dados de sobrevida publicados previamente. A sobrevida global para pacientes com TCA é de cerca de 55%, como referido em estudo retrospectivo do IPACTR, que apresentou 254 casos de TCA, incluindo os do Paraná (MICHALKIEWICZ et al., 2004). A incidência de TCA pode ser estimada como sendo aproximadamente o dobro da taxa de mortalidade (1,6 por milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade), ou seja, em torno de 3,5 casos por milhão de crianças abaixo de 15 anos.

4.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *SF-1* NOS TCAs

4.2.1 Número de Cópias do Gene *SF-1* no Grupo 2A de TCAs

Foi considerada amplificação de *SF-1* a existência de pelo menos 4 cópias do gene em 30% das células pesquisadas. A análise por FISH usando sonda específica para o gene *SF-1* mostrou aumento do número de cópias em 8 de 9 tumores (Tabela 10). Dos 8 pacientes com número de cópias do gene *SF-1* aumentado, 6 apresentaram 4 ou mais cópias do gene em pelo menos 30% das células. Exemplos de estudos de FISH para *SF-1* são mostrados na Figura 7.

FIGURA 7. FISH PARA *SF-1* EM AMOSTRAS DE TCAs

NOTA: Na figura A, nota-se uma imagem representativa da amplificação de *SF-1* por FISH numa amostra de tumor (paciente 6), enquanto em B, uma amostra de tumor com duas cópias de *SF-1* (paciente 5).

Esta análise foi feita inicialmente apenas no mesmo grupo de 9 pacientes (pacientes 1-9 citados nas Tabelas 5 e 6), previamente estudados através da técnica de hibridização genômica comparativa (HGC), que revelou a amplificação de 9q34 na maior parte dos TCAs (FIGUEIREDO et al., 1999) (Apêndice 1).

Houve excelente concordância entre os achados previamente obtidos pela HGC (amplificação de 9q34) e os dados obtidos por FISH, para cada amostra de tumor. Os 8 pacientes com número aumentado de cópias do gene *SF-1* por FISH apresentavam por HGC um ganho de 9q (ou de uma porção dele), enquanto o paciente com 2 cópias de *SF-1* também não havia apresentado ganho de 9q através da HGC. Amplificação da região 9q34 foi detectada em adenomas (2/3 casos) e carcinomas (3/6 casos). Estes 5 pacientes apresentaram síndrome virilizante (4/5 casos) ou associação de virilização com síndrome de Cushing (1/4 casos). Assim, conforme apresentado na Tabela 10, nota-se que não houve associação entre o aumento do número de cópias de *SF-1* e a forma de apresentação clínica, a faixa etária, o sexo, o prognóstico (baseado na sobrevida ou óbito), ou o padrão histológico (não houve distinção entre adenoma e carcinoma).

TABELA 10 - RESULTADOS DE FISH PARA *SF-1* E HGC PARA DETECÇÃO DA AMPLIFICAÇÃO 9q34, COMPARADOS COM AS CARACTERÍSTICAS DOS TCAs e MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS (GRUPO 2A)

PACIENTE	SEXO	IDADE (MESES)	APRESENTAÇÃO CLÍNICA	HISTOLOGIA	ESTÁDIO	9q34 (HGC)*	FISH PARA <i>SF-1</i>	MUTAÇÃO GERMINATIVA <i>TP53</i> R337H LOH *
1	F	9,5	V+C	Ca	I	Amp.	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
2	F	9	V	Ca	I	Amp.	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
3	F	82	V+C	Ca	III	Ganho	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
4	M	23	V+C	Ca	I	Ganho	Aumento n ^o cópias ¹	sem mut/sem LOH
5	M	13	V+C	Ca	II	Nenhum Ganho	Normal	mut/LOH
6	F	17	V	Ca	I	Amp.	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
7	F	27	V	Ad	-	Amp.	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
8	M	35	V	Ad	-	Amp	Aumento n ^o cópias ¹	mut/LOH
9	F	68	V	Ad	-	Ganho	Aumento n ^o cópias ¹	**

NOTAS:* Ensaio laboratoriais realizados em trabalhos anteriores à presente tese, utilizados aqui para comparação. Mut = Mutação presente, Amp = Amplificação, LOH = perda de heterozigose. ¹ Indica que 4 ou mais cópias do gene foram detectadas em pelo menos 30% das células (amplificação de *SF-1* detectada por FISH). ** Somente o DNA do tumor estava disponível para análise e mostrou mutação *TP53* R337H (não foi avaliado para LOH). Os resultados apresentados para amplificação de 9q34 foram publicados em estudo anterior (FIGUEIREDO et al., 1999) e para identificação de *TP53* R337H e LOH em outros 2 estudos (RIBEIRO et al., 2001, FIGUEIREDO et al., submetido).

4.3 NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE E EXPRESSÃO PROTÉICA DE *SF-1*

4.3.1 Número de Cópias do Gene *SF-1* no Grupo 2B de TCAs

O grupo 2B corresponde aos TCAs dos pacientes 10 a 19 (n = 10). Este estudo foi planejado para saber se existe uma correlação direta, no mesmo tumor, entre o número médio de cópias do gene e a proporção de proteínas, e precisava ser realizado

com amostras congeladas de TCA (não disponíveis para os pacientes do grupo A). A proporção de proteínas foi estimada a partir do referencial encontrado em córtex adrenal de crianças sem patologia adrenal. As amostras de córtex adrenal normal foram obtidas de crianças submetidas à ressecção de tumor de Wilms, com adrenalectomia. Como apresentado na Tabela 11, 4 cópias ou mais de *SF-1* foram observadas em mais de 30% das células de TCA dos pacientes 10, 13, 14, 15, 16 e 17, o que indica amplificação do gene *SF-1*. As respectivas médias dos amplificadores estavam acima de 3 cópias do gene/célula (num grupo de 50 células examinadas).

TABELA 11 - NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE *SF-1* NO GRUPO 2B

PACIENTE	NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>SF-1</i>							MÉDIA No. de cópias do gene
	2 No. céls (%)	3 No. céls (%)	4 No. céls (%)	5 No. céls (%)	6 No. céls (%)	7 No. céls (%)	8 OU + No. céls (%)	
10	13 (26)	17(34)	11(22)	8 (16)	1 (2)	-	-	3,34
11	36 (72)	10 (20)	3 (6)	-	-	-	1 (2)	2,44
12	30 (60)	14 (28)	5 (10)	-	1 (2)	-	-	2,56
13	10 (20)	22 (44)	15 (30)	3 (6)	-	-	-	3,22
14	3 (6)	18 (36)	16 (32)	6 (12)	5 (10)	2 (4)	-	3,96
15	-	13 (27)	11 (22)	9 (18)	6 (12)	5 (10)	5 (10)	4,78
16	5 (10)	18 (36)	10 (20)	12 (24)	2 (4)	2 (4)	1 (2)	3,96
17	5 (10)	20 (40)	18 (36)	6 (12)	-	-	1 (2)	3,6
18	35 (70)	11 (22)	3 (6)	1 (2)	-	-	-	2,4
19	36 (72)	10 (20)	4 (8)	-	-	-	-	2,36

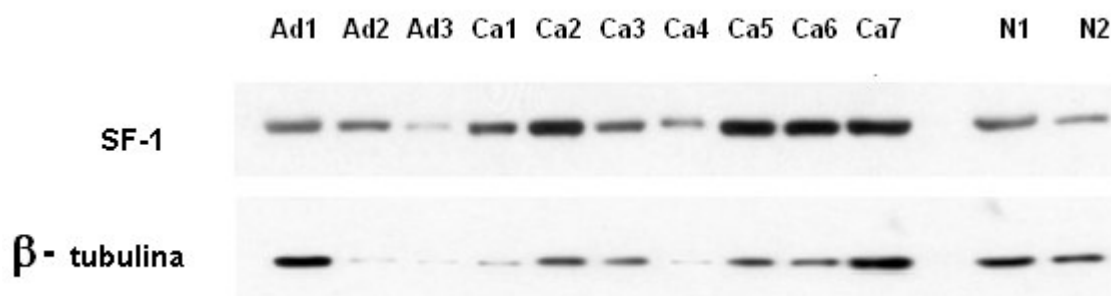
NOTA: cels – células

4.3.2 Expressão Protéica de *SF-1* no Grupo 2B de TCAs

As bandas de SF-1 dos TCAs, como apresentadas na Figura 8, foram comparadas com a média da expressão protéica de *SF-1*, estimada do córtex adrenal normal. A proporção de proteína em cada alíquota usada na eletroforese foi normalizada pela concentração da proteína β -tubulina. As intensidades das bandas de SF-1 para cada amostra foram estimadas como densidades ópticas, as quais foram divididas pela densidade óptica correspondente para proteína β -tubulina. O resultado obtido para cada tumor é apresentado na Tabela 12. A concentração mediana de

proteína SF-1 nos TCAs foi superior à encontrada no tecido adrenal normal 3,2(1,4-19), com média de 6,9 vezes o valor do córtex adrenal normal ($p=0,015$), o que está em concordância com o aumento do número de cópias do gene.

FIGURA 8 - WESTERN BLOT PARA SF-1 NOS TCAs DE CRIANÇAS



NOTAS: Bandas de SF-1, visualizadas na faixa de 53 kDa. As amostras de tumores dos pacientes estão indicadas como Ad1 a Ad3 (adenomas) e Ca1 a Ca7 (carcinomas). As amostras de córtex adrenal normal estão indicadas por N1 e N2. As bandas de β-tubulina refletem a quantidade de proteína usada de cada amostra.

A Tabela 12 apresenta os números médios de cópias do gene *SF-1* e as respectivas proporções de proteína SF-1 para cada tumor, padrão histológico (adenoma ou carcinoma), volumes dos tumores, além das características clínicas e hormonais dos pacientes. Utilizando-se o teste de Pearson, não foi encontrada correlação entre os números médios de cópias do gene *SF-1* e os respectivos valores de proteína SF-1 para todos os tumores. Também não houve diferença quanto ao número de cópias do gene *SF-1* em relação à forma clínica (síndrome virilizante ou virilização + síndrome de Cushing) ou ao tipo histológico (adenoma ou carcinoma). Da mesma forma, quando se analisou, pelo teste de Mann-Whitney, a expressão de proteína SF-1 dos TCAs em relação à da adrenal normal não se observou diferença quanto à forma clínica (virilizante ou virilizante + Cushing) ou ao tipo histológico (adenoma ou carcinoma).

TABELA 12 - EXPRESSÃO DE *SF-1* COMPARADA COM CARACTERÍSTICAS DOS TCAs e CLÍNICAS, GRUPO 2B

PACIENTE	IDADE (MESES)	SEXO	FORMA CLÍNICA	HISTOLOGIA	ESTÁDIO CLÍNICO	VOLUME DO TUMOR (cm ³)	EVOLUÇÃO*	CORTISOL PLASMÁTICO (µg/dl)	DHEA-S PLASMÁTICO (NÚMERO DE VEZES O NORMAL) **	SINAIS DE VIRILIZAÇÃO P(1-5)*** / ACNE	CÓPIAS DO GENE <i>SF-1</i> ****	PROTEÍNA SF-1 *****
10	139	F	Vir.	Ad1		90	V	19,6	9	5/sim	3,34	1,4
11	43	F	Vir.	Ad2		21	V	10,8	17	4/sim	2,44	19
12	11	F	Vir.	Ad3		24	V	10,9	14	3/não	2,56	12,9
13	52	F	Vir.	Ca1	II	1800	O	25,4	>3	3/sim	3,22	9,5
14	110	M	Vir.+C	Ca2	II	968	O	51,5	10	5/não	3,96	3
15	21	M	Vir.	Ca3	I	61	V	10,1	2	3/sim	4,78	2,3
16	25	M	Vir.+C	Ca4	I	108	V	23,5	NR	3/sim	3,96	12,6
17	39	F	Vir.	Ca5	III	1450	O	13,5	NR	3/sim	3,6	3,1
18	72	M	Vir.	Ca6	III	196	O	23,9	NR	1/não	2,4	3,3
19	130	F	Vir.+C	Ca7	II	924	V	21,5	2	3/sim	2,36	1,5
Média ± desvio padrão											3,26±0,83	6,91±6,17
Mediana											3,28	
											(2,4-4,78)	3,2(1,4-19)

NOTAS: F – sexo feminino; M – sexo masculino; Vir – virilização; Vir + C – virilização + síndrome de Cushing; Ad – adenoma e Ca – carcinoma (numerados para facilitar comparação com a Figura 8). NR = Não realizado.* Evolução referida como vivo (V) ou óbito (O). ** concentração de DHEA-S expressa em número de vezes acima do valor de referência; *** - entre os sinais de virilização avaliados, foram incluídos o grau de pilificação pubiana de acordo com Tanner (P1 a P5) (MARSHALL & TANNER, 1969 e 1970) e a presença de acne facial.**** - número de cópias do gene *SF-1* expresso como média; ***** - quantidade de proteína SF-1 expressa como razão da quantidade do córtex adrenal normal

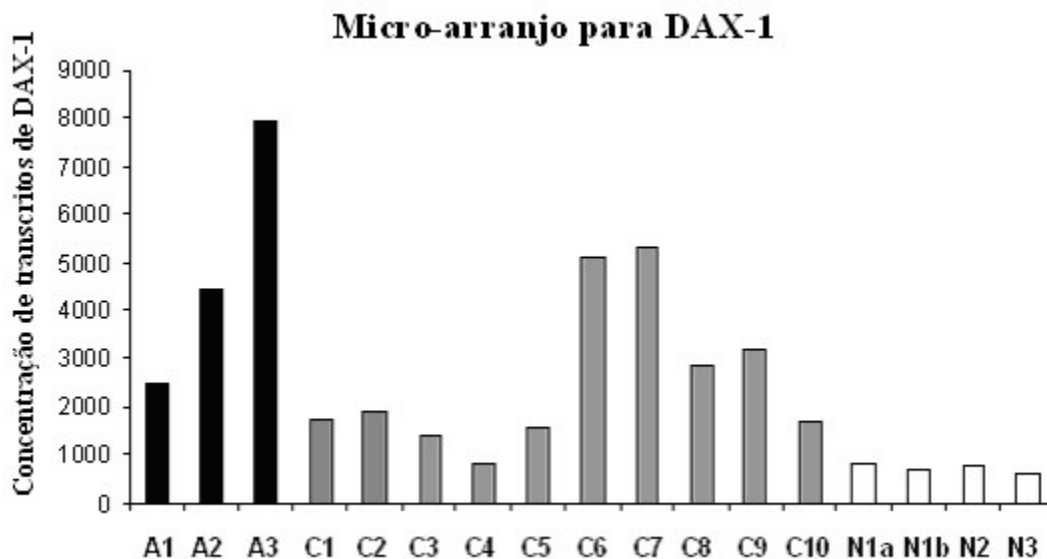
4.4 TRANSCRITOS E EXPRESSÃO PROTÉICA DE *DAX-1* NO GRUPO 2C

4.4.1 Resultados de Microarranjo para *DAX-1*

O grupo 2C de TCAs incluiu cinco pacientes do grupo B (10, 11, 14, 15 e 16) e outros oito pacientes (20 a 27). Esta pesquisa foi realizada depois da avaliação de *SF-1*, não sendo possível pesquisar *SF-1* e *DAX-1* nas mesmas amostras, por não haver material suficiente para as análises.

As concentrações relativas de transcritos de *DAX-1* foram obtidas de 13 TCAs (10 carcinomas e 3 adenomas) e de córtex adrenal normal de 3 pacientes (submetidos à cirurgia para ressecção de tumor de Wilms e conseqüente adrenalectomia), usando conjuntos de sondas com 11 oligonucleotídeos. A intensidade do sinal, representando a proporção de hibridização, e conseqüentemente a expressão gênica para cada amostra, foi apresentada no Gráfico 1. Os valores de transcritos apresentados pelos adenomas = 4952 ± 2779 unidades, não diferiram significativamente dos apresentados pelos carcinomas = 2572 ± 1560 unidades, com $p > 0,05$. O valor médio dos transcritos do conjunto (adenomas + carcinomas) = 3010 ± 2012 , mediana 2458 (816 – 7948), foi significativamente superior ao das adrenais normais = 707 ± 90 , mediana 711 (591-793), com $p = 0,01$.

GRÁFICO 1 - CONCENTRAÇÃO RELATIVA DE TRANSCRITOS DE DAX-1 (unidade arbitrária) EM TCAs E CÓRTEX ADRENAL NORMAL DE CRIANÇAS

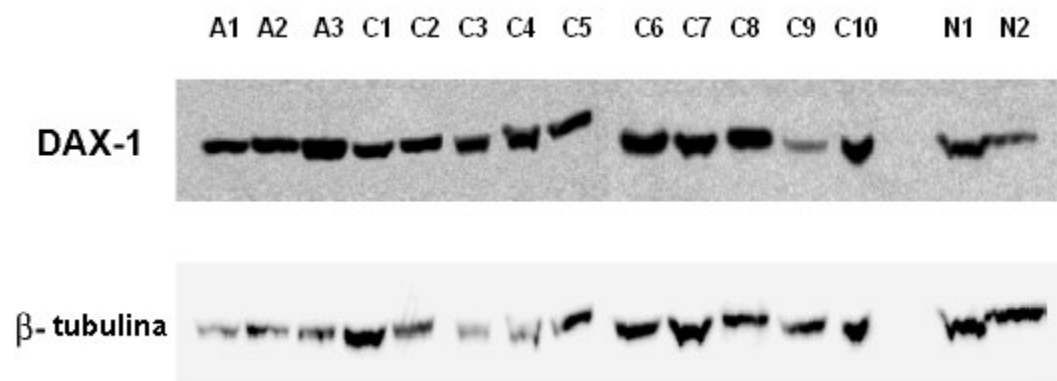


NOTAS: Adenomas (A, barras preenchidas em preto), carcinomas (C, barras preenchidas em cinza) e córtex adrenal normal (N, barras sem preenchimento).

4.4.2 Expressão da Proteína DAX-1

As bandas da proteína DAX-1 e β -tubulina foram obtidas de BTCAs (10 carcinomas e 3 adenomas) e de córtex adrenal normal dos 2 pacientes submetidos à ressecção do tumor de Wilms e conseqüente adrenalectomia. As intensidades das bandas de DAX-1 para cada amostra, como apresentadas na Figura 9, foram estimadas como densidades ópticas, as quais foram divididas pela densidade óptica correspondente para proteína β -tubulina. Os resultados da relação DAX-1/ β -tubulina para cada amostra estão apresentados na Tabela 13. Notou-se que os adenomas apresentaram expressão média da proteína DAX-1 superior à dos carcinomas = $27,36 \pm 6,44$, mediana = $30,13(20 - 31,95)$ versus $11,3 \pm 8,43$, mediana = $8,84(3,18 - 28,93)$; $p = 0,03$. Quando foi comparada a média apresentada pelos adenomas e carcinomas juntos = $15 \pm 10,48$, com a das glândulas adrenais normais (valores individuais = 4,32 e 2,38) encontrou-se $p < 0,05$.

FIGURA 9. WESTERN BLOT PARA DAX-1 NOS TCAs DE CRIANÇAS



NOTAS: Bandas de DAX-1 e β -tubulina, visualizadas na faixa próxima de 50 Kda. As amostras dos adenomas estão indicadas por A1, A2 e A3, e as amostras dos carcinomas, por C1 a C10. As amostras de córtex adrenal normal estão indicadas como N1 e N2. As bandas de β -tubulina refletem a quantidade de proteína usada de cada amostra.

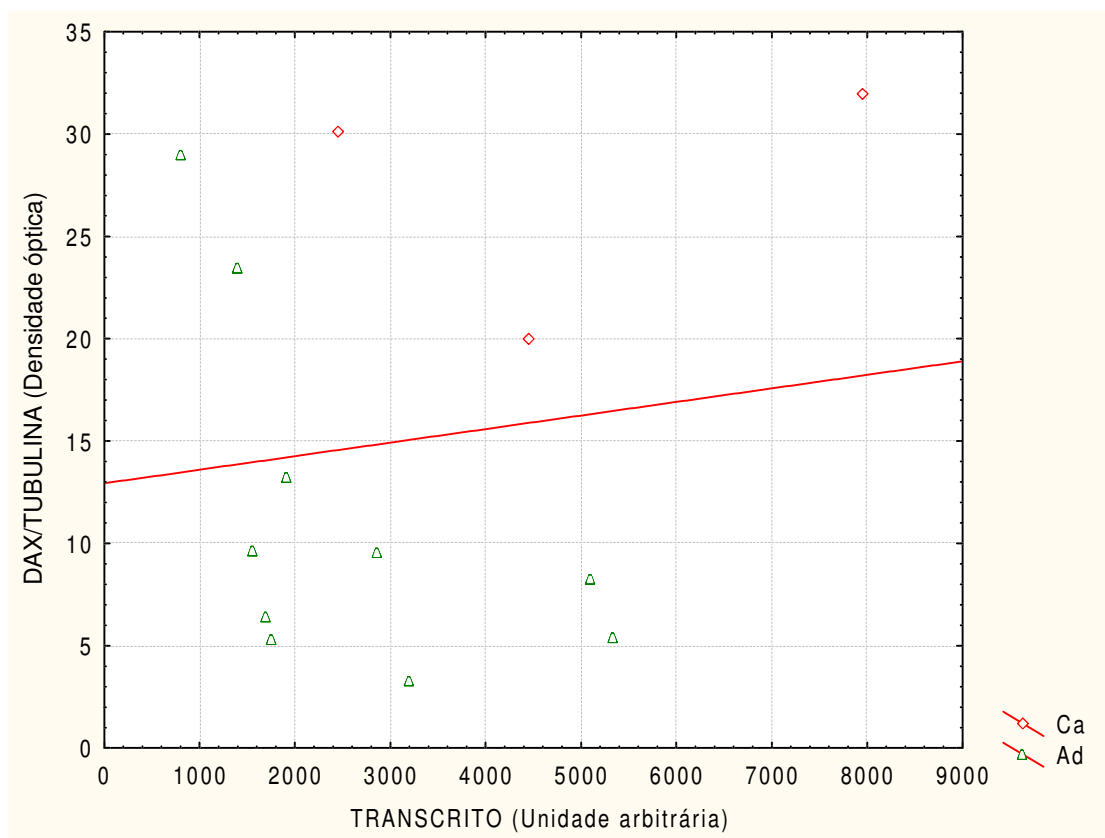
TABELA 13 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, HISTOLÓGICAS E LABORATORIAIS COMPARADAS COM AS CONCENTRAÇÕES DE TRANSCRITOS E DA PROTEÍNA DAX-1, GRUPO 2C

IDENTIFICAÇÃO	IDADE (MESES)	SEXO	FORMA CLÍNICA	HISTOLOGIA	ESTÁDIO	VOLUME DO TUMOR (cm ³)	EVOLUÇÃO *	CORTISOL PLASMÁTICO (µg/dL)	DHEA-S PLASMÁTICO (VEZES > NORMAL)**	GRAU DE VIRILIZAÇÃO P(1-5) *** / ACNE	TRANSCRITO DE DAX-1 (UNIDADES ARBITRÁRIAS)	DAX / β-tubulina (DENSIDADE ÓPTICA)	PROTEÍNA DAX-1 ****
10	139	F	Vir	Ad3		90	V	19,6	9	5-sim	7948	30,13	8,99
11	43	F	Vir	Ad2		21	V	10,8	17	4-sim	4448	20	5,97
20	32	F	Vir	Ad1		20	V	10,2	1	2-sim	2458	31,95	9,54
Média Ad						43±32					4951±2779	27,36±6,44	8,17±1,92
14	110	M	Vir+C	Ca8	II	968	O	51,5	10	5-não	2871	9,46	2,82
15	21	M	Vir	Ca9	I	61	V	10,1	2	3-sim	3213	3,18	0,95
16	25	M	Vir+C	Ca5	I	108	V	23,5	-	3-sim	1569	9,56	2,85
21	9	F	Vir+C	Ca1	II	527	V	43,3	29	3-sim	1765	5,28	1,57
22	20	F	Vir	Ca2	II	338	V	24,8	>3	3-não	1918	13,17	3,93
23	59	F	Vir	Ca4	II	384	O	12,4	5	2-sim	816	28,93	8,64
24	50	M	Vir+C	Ca3	II		V	50,9	-	3-sim	1412	23,44	7,00
25	9	F	Vir+C	Ca6	II	450	V	32,2	44	3-sim	5102	8,22	2,45
26	18	F	Vir	Ca7	I	120	V	11	>3	2-sim	5350	5,37	1,60
27	152	F	HALdo + C	Ca10	IV	369	O	31,3	1	4-não	1702	6,35	1,89
Média Ca											2480±1510	11,3±8,43	3,37±2,52
Média geral											3010±2012	15±10,48	4,48±3,13
N1											793	4,32	1,29
N1b											683		
N2											759	2,38	0,71
N3											591		
Média adrenal normal											707±90	3,35±1,37	1,00

NOTAS: ID – identificação; F – sexo feminino; M – sexo masculino; Vir – virilização; Vir+C – virilização + síndrome de Cushing; Ad – adenoma e Ca – carcinoma (numerados para facilitar comparação com a Figura 9).* V – vivo, O - óbito.** concentração de DHEA-S expressa em número de vezes acima do valor de referência; *** Puberdade de acordo com MARSHALL e TANNER, 1969 e 1870.****proteína DAX-1, razão do normal.

Houve fraca correlação ($r = 0,13$) entre a expressão protéica de DAX-1 e os transcritos conforme se observa no gráfico 2.

GRÁFICO 2 CORRELAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO PROTÉICA E OS TRANSCRITOS (RNAm) DE DAX-1



NOTA: Ad = Adenomas; Ca = Carcinomas

Não houve correlação entre o tamanho do tumor e a concentração de transcrito; quando se avaliou a expressão protéica de DAX-1 quanto à sobrevida, não foi encontrada diferença.

5 DISCUSSÃO

5.1 ESTIMATIVA DA TAXA DE MORTALIDADE POR TCA E SUA INCIDÊNCIA NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA

A primeira publicação referente à estimativa de incidência aumentada de TCA no Estado do Paraná foi feita por SANDRINI, RIBEIRO e LACERDA (1997). Até então, relatos de suspeita de maior incidência, baseados em análises de registros hospitalares de câncer, haviam sido feitos por MARIGO, MULLER e DAVIES, (1969) e BRUCK et al. (1969), porém sem avaliar o significado dessas observações no âmbito populacional. Devido à falta de registros de câncer de base populacional, devidamente estabelecidos e atuantes, no Paraná, essa afirmação é ainda hoje contestada por epidemiologistas, que questionam a forma como foi feita a projeção, a qual levou em conta dados de uma única instituição, acrescidos de comunicações pessoais entre os médicos de diferentes hospitais, especialistas em endocrinologia, oncologia ou cirurgia pediátrica.

Na maioria das séries de neoplasias na criança, observa-se que as mais frequentes são as leucemias, seguidas por tumores do sistema nervoso central e linfomas ou neuroblastomas (SMITH e RIES, 2002; DESANDES et al., 2004, JUAREZ-OCANA et al., 2004, VATHAIRE et al., 2004; SAAD e ALDRICH, 2004). Entre as neoplasias da adrenal, salienta-se o Nb, que se origina na medula adrenal e corresponde a 7,9% das neoplasias da infância, ficando o TCA referido no grupo de neoplasias raras (BIRCH, MARSDEN e SWINDELL, 1980; SMITH e RIES, 2002; SAAD e ALDRICH, 2004). DEHNER e FRANCIOSI (1984), comentaram que a relação é de 10 Nb da adrenal para um carcinoma adrenocortical, e na avaliação de STEWART, JONES e JOLLEYS (1974) essa relação é em torno de 15. No presente estudo, a relação entre o número de óbitos por Nb adrenal e óbitos por TCA foi de 10

para 8, ou seja apenas 1,25. Considerando-se a taxa de mortalidade padronizada para idade, a relação foi de 2,0 para 1,6 (1,25). A relação mortalidade por Nb/TCA nessa região do Brasil é menor do que a referida na literatura, sugerindo elevada taxa de mortalidade por TCA. Além disso, a sobrevida para pacientes com Nb, na maioria dos países desenvolvidos, é semelhante à letalidade, em torno de 50%. Em contraste, a sobrevida para crianças com Nb, em Curitiba, é de 26% (dados não publicados, do HC-UFPR, um dos principais hospitais da região metropolitana), semelhante à observada na Escócia (28%) e Dinamarca (35%) (SPIX et al., 2001).

Admite-se que a chance de cura dos pacientes com TCAs, nessa região do Paraná, esteja em torno de 55%, sendo semelhante à verificada em países desenvolvidos, pois são usados protocolos de tratamento similares (MICHALKIEWICZ et al., 2004), ou superior a 55% conforme aponta estudo com TCAs do Paraná (PEREIRA et al., 2004). Assim, apesar de haver maior mortalidade por Nb adrenal nesta região em relação ao exterior, nota-se que a relação mortalidade por Nb de origem adrenal/TCA foi apenas 1,25, considerando-se a taxa padronizada por idade, sugerindo uma mortalidade aumentada por TCA que deve ser reflexo de uma incidência elevada. Mesmo não sendo apropriado extrapolar esses dados para cálculo de incidência, se considerarmos que 45% dos pacientes com TCA vão a óbito, e que esses pacientes estão representados na taxa de mortalidade padronizada por idade de 1,6/milhão abaixo de 15 anos, podemos estimar que a incidência seja cerca de 3,5/milhão de crianças abaixo de 15 anos. Incidência e mortalidade são indicadores que se relacionam e um dos coeficientes pode se refletir no outro (TERRACINI et al., 2001). Estes autores admitem que mortalidade é o resultado de vários fatores, que incluem o número total de casos diagnosticados antes e no período, acesso aos serviços de notificação de óbitos e qualidade de tratamento existentes nas respectivas regiões. Para doenças raras, como o TCA da criança, é plausível estimar a incidência a partir da sobrevida e mortalidade (TERRACINI et al., 2001).

Como não estão disponíveis dados de registro de base populacional, no momento, a avaliação da mortalidade e da sobrevida, dados em que se pode confiar, permitem inferir que a incidência de TCA no Paraná corresponde à estimada inicialmente (3,4 - 4,5 por milhão de crianças < 15 anos) (SANDRINI et al., 1997). Embora seja questionável estimar a incidência a partir da mortalidade e sobrevida, dados publicados pelo IPACTR demonstraram que nos estádios iniciais (I e II) cerca de 91% das crianças são curadas (MICHALKIEWICZ et al., 2004), e a proporção de casos em estágio inicial (I e II) numa só instituição, HC-UFPR, nos últimos 30 anos (1966 - 2004), é de 82,4% (de um total de 125 casos). Acrescentando-se ainda os casos de TCA, nos estádios III e IV, que possam ser curados, supõe-se que a incidência calculada não deva estar sendo superestimada. MARIGO, MULLER e DAVIES (1969) encontraram 19 casos de TCA, entre 1127 diagnósticos de crianças com câncer, num período de 14 anos (1952 - 1965), em 3 instituições do estado de São Paulo. Acredita-se que a inclusão de dados de outras instituições de São Paulo poderia demonstrar uma incidência mais elevada e precisa, também para esse estado. Para outras regiões do Brasil, a incidência não parece estar aumentada, exceto para Goiânia, onde, de acordo com a citação feita pelo IARC, existe uma incidência de TCA de 2,8/milhão de crianças até 15 anos de idade. Essa estimativa se baseia em quatro casos diagnosticados num período de seis anos (1989 - 1996), para uma população de 520.890 indivíduos dessa faixa etária e incentiva a realização de estudos sobre mutações hereditárias na região de Goiânia, similares aos realizados no Paraná, para melhor compreensão da distribuição geográfica dessa neoplasia.

Os relatos sobre mortalidade são precários, e a busca ativa encontra barreiras no adequado preenchimento das declarações de óbito, onde a maioria dos médicos utiliza a codificação da CID 10, C 74.9, que não especifica de que camada se origina a neoplasia na adrenal, se do córtex (carcinoma adrenal) ou da medula (neuroblastoma ou feocromocitoma). Seria desejável também, para permitir melhor comparação entre as neoplasias, incluir a classificação morfológica, com os códigos M9490 (ganglioneuroblastoma) e M9500 (Nb). O preenchimento das declarações de óbito, baseado apenas na topografia, sem incluir a morfologia, cria a principal dificuldade na

comparação internacional de mortalidade por Nb (GAO et al., 1997). Daí a importância do presente estudo que procurou identificar todos os óbitos com diagnósticos diferenciais de TCA, e realizou a investigação dos mesmos para garantir a qualidade dos dados. Em se tratando de informações referentes apenas ao HC-UFPR, nota-se que o número de crianças atendidas por esta neoplasia é semelhante ao de crianças com Nb, tendo sido registradas, de 1998 a 2003, 23 crianças com neuroblastoma e 21 crianças com carcinoma de córtex adrenal.

Investigações laboratoriais de famílias de crianças com TCA no Paraná e São Paulo encontraram que a maioria das crianças com TCA apresenta a mutação germinal *TP53* R337H (Tabela 14), que é responsável pela incidência aumentada, sendo a penetrância do TCA igual a 10% (FIGUEIREDO et al., submetido). A aparente aglomeração de casos de TCA nos dois estados, Paraná e São Paulo, direciona para a pesquisa de fatores geográficos, genéticos e ambientais que possam esclarecer a origem da mutação *TP53* R337H em mais de 95% dos casos de TCA em crianças no Paraná (RIBEIRO et al., 2001; SANDRINI et al., 2005) e mais de 75% dos casos de São Paulo (LATRÔNICO et al., 2001) (Tabela 14).

Esse é o primeiro estudo de base populacional que apresenta a taxa de mortalidade por TCA para crianças abaixo de 15 anos, na região metropolitana de Curitiba, permitindo inferir maior incidência local de TCAs. Esta inferência pode também ser estimada a partir da menor relação entre os coeficientes de mortalidade por Nb e TCA nesta região. Como causa dessa elevada incidência existem fatores biológicos e genéticos participando na origem e/ou na evolução do TCA, os quais são discutidos a seguir.

TABELA 14 - COMPARAÇÃO DO NÚMERO DE CASOS DE TCA REGISTRADOS EM HOSPITAIS DE SÃO PAULO, PARANÁ, BAHIA, ESTADOS UNIDOS E EUROPA

INSTITUIÇÃO	LOCAL	PERÍODO	NÚMERO DE PACENTES	IDADE (ANOS)	TP53 R337H PESQUISADA/POSITIVA (%)	REFERÊNCIAS
HCACC	São Paulo	1978-2003	56	<21	NR	Latronico et al., 2004
SCSP	São Paulo	1985-2004	17	<14	NR	Latronico et al., 2004
CIDB	São Paulo	1980-2004	78	<18	20/20 (100)	Hirose et al., 2005
IC	São Paulo	1977-2002	46	<13	NR	Latronico et al., 2004
HCFMSP	São Paulo	1982-2003	27	<16	21/27 (78)	Latronico et al., 2004
HCC	Paraná	1966-2003	124	<13	61/65 (93.8)	Pereira et al., 2004
HCFMRP	São Paulo	1985-2003	21	12	12/16 (75)	Sandrini et al., 2005
ONCO/HSR	Bahia	1981-2004	6	<12	0/5 (0)	Barreto et al., 2001
SEER	USA	1975-1995	36	<20	NR	Bernstein et al., 1999
Eurocare	Europe	1983-1994	65	<15	NR	Gatta et al., 2005

NOTAS: HCACC, Hospital do Câncer AC Camargo; SCSP, Santa Casa de São Paulo; IC, Instituto da Criança da Universidade de São Paulo; CIDB, Centro Infantil Domingos Boldrini, Universidade de Campinas; HCFMSP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; HCC, Hospital de Clínicas de Curitiba, Universidade Federal do Paraná; HCFMRP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; ONCO/HSR, Sociedade de Oncologia da Bahia Ltda/Hospital São Rafael; SEER, *Surveillance Epidemiology and End Results*; NR – não realizado

5.2 AMPLIFICAÇÃO DO GENE *SF-1*

Em termos moleculares, outras anormalidades foram encontradas, além do alelo mutante *TP53* R337H, sendo uma delas um maior número de cópias do gene *SF-1* (FIGUEIREDO et al., 2005) (Apêndice 4).

Estudos sobre TCA em adultos e crianças têm mostrado que eles estão associados com grande variedade de alterações cromossômicas, alto nível de ampliações, perdas e ganhos de material do DNA de diferentes regiões cromossômicas (HENRY et al., 1989a; HENRY et al., 1989b; YANO et al., 1989; BECKERS et al., 1992). Contudo, apesar dessa heterogeneidade genética, também têm sido demonstrado que certas regiões do genoma apresentam alterações que se repetem com maior frequência: a região 9q34 é um desses exemplos apresentando ganho/amplificação em TCAs de crianças e adultos, assim justificando aprofundamentos nesta investigação (FIGUEIREDO et al., 1999; JAMES et al., 1999; DOHNA et al., 2000; FIGUEIREDO et al., 2000). Isto levou à descoberta da amplificação de *SF-1*, sendo assim contemplado o terceiro objetivo deste estudo, conforme demonstrado no Apêndice 4.

O gene para o receptor nuclear órfão conhecido como *SF-1*, que tem um papel chave na função endócrina, se localiza em 9q33.3 (TAKETO *et al.*, 1995). Esta região está em íntima proximidade ao *amplicon* 9q34, comum nos TCAs. Os múltiplos estudos que têm descrito esse *amplicon* têm usado HGC cromossômica convencional (FIGUEIREDO *et al.*, 1999; JAMES *et al.*, 1999; DOHNA *et al.*, 2000). Contudo, devido à sua baixa resolução, a HGC cromossômica convencional é incapaz de delinear os exatos limites dos *amplicons*; assim, considerou-se possível que o *amplicon* 9q34 previamente descrito estivesse incluindo a região 9q33.3 e, por conseguinte, o gene *SF-1*.

No presente estudo, foi investigado o possível ganho/amplificação do gene *SF-1* nos TCAs de crianças. Foi usada FISH para detectar alterações no número de cópias do gene na mesma série de nove tumores que tinham sido previamente avaliados por HGC. Esses tumores eram seis carcinomas e três adenomas. A HGC mostrou ganhos e perdas cromossômicas nos nove casos. Mas, apesar do elevado número de alterações, foi observado um padrão recorrente, o ganho consistente no número de cópias da região cromossômica 9q34 em 8 de 9 tumores (FIGUEIREDO *et al.*, 1999). Um achado similar de ganho em 9q34 foi independentemente observado em outros estudos de TCA de crianças (JAMES *et al.*, 1999) ou adultos (DOHNA *et al.*, 2000). Por exemplo, JAMES *et al.*, (1999), relataram um ganho de 9q34 em 10 de 11 TCAs de crianças (9 adenomas e 2 carcinomas) e DOHNA *et al.*, (2000), observaram um ganho envolvendo a região 9q34 em 12 de 25 amostras de TCAs (8 adenomas, 14 carcinomas, 1 linfonodo metastático e 2 linhagens celulares). A análise por FISH, no presente estudo, está em concordância com os achados por HGC prévios. Especificamente, os 8 pacientes que mostraram ganho no número de cópias de 9q ou de uma porção dele, incluindo 9q34, mostraram aumento do número de cópias do gene *SF-1*, por FISH. O único caso que não mostrou nenhum ganho dessa região por HGC (paciente 5), não apresentou ganho do gene *SF-1* por FISH (Tabela 10). Nesta tese, não é abordada a questão de qual é a porção do gene *SF-1* que se encontra amplificada. Contudo, está sendo coletado tecido de TCA fresco congelado para investigar esse ponto em estudos futuros.

Desvendar a complexidade que se esconde na amplificação de 9q34 poderá esclarecer que papel a expressão do gene amplificado exerce na patogênese dos TCAs. Inicialmente, levantou-se a hipótese de que a amplificação de 9q34 (FIGUEIREDO et al., 1999) poderia indicar o local onde se situa um ou mais oncogenes envolvidos na formação de TCA e, assim, foi proposto que a amplificação de 9q34 poderia envolver transcritos aberrantes do oncogene *ABL1* (BARTRAN et al., 1983; CHISSOE et al., 1995). Esta possibilidade foi afastada por análise de *Southern blot* (dados não publicados e não demonstrados nesta tese). Contudo o gene *SF-1* pode não ser o único gene encontrado no *amplicon* 9q34. Outros genes desta região podem exercer um papel na formação dos TCAs, incluindo o oncogene *VAV2* (HENSKE et al., 1995), o gene do receptor-1 do fator β transformador de crescimento (*TGFBR1*), o qual é um receptor da ativina A (JOHNSON et al., 1995), o gene do fator 2 associado ao receptor do fator de necrose tumoral (*TRAF1*) (SIEMIENSKI et al., 1997), o oncogene lipocalina 2 (*LCN2/NGAL*) (CHAN et al., 1994), e o receptor alfa X retinóide (*RXRA*) (JONES et al., 1993).

Uma consequência da amplificação do gene *SF-1*, particularmente se estiver associada com alta expressão da proteína SF-1, poderia ser a atividade esteroidogênica aumentada, com conseqüente aumento da produção de esteróides. A recente revisão de características de 254 crianças com TCAs, incluídas no IPACTR (MICHALKIEWICZ et al., 2004), mostrou que sinais de virilização foram encontrados em 84,2% dos pacientes, concordante com relatos referentes a casuísticas de outros continentes (BERGADA et al., 1996; DRIVER et al., 1998; TEINTURIER et al., 1999; WOLTHERS et al., 1999). A virilização foi observada isoladamente ou acompanhada por manifestações clínicas de produção aumentada de outros hormônios adrenocorticais além de andrógenos, incluindo glicocorticóides, aldosterona, ou estrógenos. Todos os pacientes que apresentaram amplificação ou ganho de 9q34 clinicamente demonstravam virilização, enquanto que 4 dos 9 exibiam, também, aumento nas concentrações séricas de cortisol e síndrome de Cushing.

O papel potencial do gene *SF-1* no controle do desenvolvimento do córtex adrenal se tornou bem conhecido a partir dos estudos de fenótipos de camundongo GM sem *SF-1* (BLAND et al., 2000) e de estudos de indivíduos humanos, portadores heterozigotos de mutações do *SF-1* (ACHERMANN et al., 1999). Uma publicação recente sugere um papel para o *SF-1* no controle do crescimento celular adrenal, ao demonstrar que o *LRH-1*, um receptor hormonal nuclear órfão, com forte homologia ao *SF-1*, está envolvido no controle do ciclo celular no intestino, através da regulação dos genes da ciclina G1 (BOTRUGNO et al., 2004).

No córtex adrenal, a proteína mutante *TP53* R337H poderia exercer um efeito tecido específico, induzindo instabilidade genômica. Neste contexto, células apresentando amplificação do gene *SF-1* poderiam adquirir vantagem seletiva de crescimento, assim escapando dos mecanismos normais de controle da proliferação celular e acumulando lesões genéticas que levariam à formação do tumor. A mutação germinal *TP53* R337H e a perda somática do alelo normal *TP53* foram observadas em 7 de 9 pacientes estudados. A associação entre mutação germinal *TP53* e câncer é encontrada nos casos de TCAs da criança (RIBEIRO et al., 2001). Acredita-se que esta mutação combinada com LOH (RIBEIRO et al., 2001), sob certas condições de pH e temperatura (DIGIAMMARINO et al., 2002), possa ocorrer durante o desenvolvimento do córtex adrenal e assim produzir TCA. Dos 8 pacientes cujos tumores apresentavam número aumentado de cópias de *SF-1*, por FISH, 6 tinham a mutação germinal *TP53* R337H e apresentavam perda somática no *locus TP53* (alelo selvagem) no tumor, um não apresentou a mutação (paciente 4) e outro (paciente 9) tinha a mutação *TP53* R337H no tumor, porém não foi testado para mutação na linha germinativa. O único caso com número normal de cópias do gene *SF-1*, também apresentou mutação germinal *TP53* R337H e LOH. É possível que a mutação germinal e a perda somática do alelo selvagem possam contribuir para alterações genômicas e aumento do número de cópias do *SF-1*. Instabilidade cromossômica causada por disfunção do *TP53* é um fato bem documentado (LIVINGSTONE et al., 1992). Estudos posteriores são necessários para esclarecer se a mutação *TP53* R337H e a amplificação 9q34, incluindo amplificação do *SF-1*, são parte de uma cascata de eventos levando à oncogênese dos TCAs, similar àquelas descritas em outros tumores, como a progressão de múltiplos passos no desenvolvimento do câncer cólon-retal (VOGELSTEIN e KINZLER, 1993).

Este é o primeiro estudo mostrando associação entre número aumentado de cópias do gene *SF-1* e TCAs. O significado dessa observação necessita ser posteriormente investigado usando uma população maior de casos pediátricos e de adultos. Como esse gene é detectado nos estádios iniciais de desenvolvimento do anel urogenital, de onde derivam as gônadas e o córtex adrenal, e como essa expressão é mantida desde o desenvolvimento embrionário até a vida adulta (LUO et al., 1994; WONG et al., 1997), justificaram-se estudos para examinar os mecanismos e conseqüências da amplificação deste gene nos TCAs.

Formulou-se então a hipótese de que a amplificação do gene *SF-1* esteja associada a maior expressão da proteína SF-1, e conseqüente aumento da esteroidogênese.

5.3 EXPRESSÃO DE *SF-1* E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DOS TCAs.

Dez TCAs, provenientes de 10 pacientes (grupo 2B), foram analisados quanto à expressão protéica de *SF-1* e apresentaram aumento da mesma (6,91 vezes \pm 6,17) quando comparada com a expressão do córtex adrenal normal. As concentrações da proteína SF-1 não apresentaram correlação com o aumento do número de cópias do gene (3,26 \pm 0,83). No Nb, foi observada correlação da amplificação do gene *MYCN* com aumento correspondente da concentração da fosfoproteína MYCN, estando ambos associados a parâmetros clínicos (BORDOW et al., 1998), entre eles o estágio avançado do tumor (BRODEUR et al., 1984). Em gliomas do tronco cerebral, também foi encontrada amplificação do gene *ERBB1*, com aumento de sua expressão verificada por imunohistoquímica e dependente do grau histológico, sendo maior nos mais agressivos (GILBERTSON et al., 2003). Entretanto é impossível avaliar a real correspondência da expressão protéica avaliada por *western blot* com aquela avaliada pela imunohistoquímica. Por outro lado, existe situação como a identificada para *SF-1* neste estudo, onde não se encontrou correlação entre a proporção de proteína e a anormalidade genômica. Assim, por exemplo, *p63* é um fator que ativa a transcrição dos genes alvos do *p53* (YANG et al., 1998). MASSION et al. (2003) encontraram até 8 cópias do gene *p63* nos carcinomas de células escamosas de pulmão, porém a concentração da proteína *p63* nesses tumores em relação ao referencial normal (células dos brônquios com duas cópias do gene) foi desproporcionalmente inferior (menos de 50%).

É mais comum se observar aumento da expressão protéica desproporcional à amplificação do gene. YOKOI et al. (2004) encontraram amplificação do *SKP2* em 5 (20%) de 25 linhagens celulares derivadas de carcinoma de pulmão de células não pequenas e a expressão aumentada do transcrito em 11 (44%) das 25 linhagens. SLOMOVITZ et al. (2004) encontraram aumento da expressão de *ERBB2*, em 12 de 68 carcinomas uterinos papilíferos serosos, avaliada por imunohistoquímica. Destes, somente dois mostraram amplificação gênica. BARLUND et al. (2004) encontraram amplificação do gene *CCND1* em 12% de 128 cânceres de mama masculina, sendo a sua expressão protéica aumentada em 63% deles. DURBECQ et al. (2004) avaliando o gene *topo-II* em câncer de mama, perceberam que, apesar da amplificação desse gene, seu nível de expressão, avaliado por imunohistoquímica, foi de 10% das células analisadas em comparação a 5% para células dos tumores sem amplificação, ao contrário do gene *ERBB2*, cuja amplificação quase sempre está acompanhada de aumento da expressão.

Em cada um dos TCAs avaliados no presente estudo, o número de cópias do gene de *SF-1* foi variável, de 2 a 8, sendo mais frequentes células com 3 a 5 cópias. As respectivas médias do número de cópias do gene *SF-1* não se correlacionaram com a concentração de proteína, nem apresentaram diferença quanto aos parâmetros clínicos. Da mesma forma, não foi encontrada diferença no número de cópias ou concentração de proteínas entre adenomas e carcinomas, o que sugere que *SF-1* não parece ser importante para a distinção entre os tipos histológicos de TCAs. O nível de esteróides estava aumentado em todos os tumores pesquisados, o que está em concordância com a idéia de que a proteína SF-1, com aumento médio em torno de 6,91 vezes o normal, tem um papel importante na síntese aumentada de esteróides. Para avaliar se esse aumento da expressão protéica de *SF-1* realmente contribuiu para aumento da síntese hormonal, seria necessário avaliar *SF-1* por FISH e *western blot* também no grupo de tumores não funcionantes, um sub-grupo raro na faixa pediátrica. SASANO et al. (1995) avaliaram a expressão protéica de *SF-1* no córtex de adrenal humana normal, adenoma e carcinoma adrenocortical de adultos, não tendo sido encontradas diferenças na expressão de *SF-1* entre os três grupos. Os autores concluíram que *SF-1* tem um papel constitutivo na esteroidogênese adrenal humana, sendo responsável pela iniciação e manutenção da transcrição dos genes *CYP-P450*, além de ser essencial para a manutenção das características biológicas das células adrenocorticais, mesmo após transformação maligna.

IKEDA et al. (1994) analisando a expressão de *SF-1* em embriões de camundongo, observaram que seus transcritos foram encontrados nos estádios muito precoces de desenvolvimento adrenal (dia 10,5 pós fecundação); o início dessa expressão antes do aparecimento da esteroidogênese sustenta seu papel chave na expressão das enzimas esteroidogênicas e sugere também, adicionalmente, papéis para o *SF-1* no desenvolvimento adrenal. Mutações que ocorrem nesse gene em humanos são raras e, em dois casos descritos (ACHERMANN et al., 1999), levaram à insuficiência adrenal e se associaram à presença de um alelo normal e um alelo mutante, resultando em perda de função; essa aparente haplo-insuficiência levanta a possibilidade de que a dose do gene pode ser um componente crítico para a função de *SF-1* em humanos.

Estudos referentes à formação do *primordium* adrenogonadal têm demonstrado que moléculas responsáveis pelo desenvolvimento do anel urogenital (WT-1 e WNT-4) interagem com moléculas responsáveis pelo desenvolvimento adrenal e gonadal, como SF-1 e DAX-1 (NACHTIGAL et al., 1998). Por outro lado, *SF-1* também está envolvido na proliferação celular. Estudando o crescimento compensatório da adrenal, em camundongos *SF-1^{+/-}*, BEUSCHLEIN et al., (2002), observaram que a expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na adrenal remanescente dos camundongos normais (*SF-1^{+/+}*) foi intensa, demonstrando resposta proliferativa importante, enquanto que nos camundongos haplo-insuficientes nenhuma resposta foi observada. RAMAYYA et al., (1997), encontraram elevada expressão do gene *SF-1*, por hibridização *in situ*, nos nódulos proliferativos da adrenal, sugerindo que tenha um papel na regulação do crescimento e proliferação das células corticais adrenais. Assim, além do estímulo da esteroidogênese, os mecanismos acima referidos para o *SF-1* poderiam também ocorrer nos TCAs da faixa pediátrica do sul do Brasil.

SASANO et al. (1993) estudaram a esteroidogênese em carcinoma adrenocortical humano de adultos, analisando 6 pacientes com síndrome de Cushing, 2 com tumores não funcionantes e um com hiperaldoosteronismo. Seis dos nove expressaram todas as enzimas requeridas para a síntese de cortisol ou aldosterona, porém nem todas as células demonstravam expressão de tais enzimas, quando avaliadas por imunohistoquímica. Os autores sugeriram a existência de uma expressão desorganizada das enzimas esteroidogênicas quando as células foram analisadas individualmente.

Outro receptor nuclear órfão, conhecido como DAX-1, foi avaliado por se saber que o mesmo tem papéis quase sempre opostos ao SF-1, e ambos são expressos nos mesmos tecidos. Tais funções estão tão intrinsecamente relacionadas que conhecer a expressão de *DAX-1* é uma das primeiras indagações ao se detectar alteração em *SF-1*.

5.4 EXPRESSÃO DE *DAX-1* E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E HISTOLÓGICAS DOS TCAs

Usando dois métodos diferentes, o presente estudo mostrou concordância entre a elevação da concentração de RNA mensageiro e aumento da expressão da proteína DAX-1, na maioria dos TCAs pesquisados. Os aumentos encontrados através da técnica de microarranjo foram maiores do que o aumento da expressão da proteína em quase todas as amostras, sendo superiores nos adenomas, em relação ao córtex adrenal normal e menores nos carcinomas, porém ainda maiores do que nas glândulas normais. O melhor estado de preservação dos adenomas, geralmente pequenas massas, sem focos macro ou microscópicos de necrose (VAN SLOOTEN et al., 1985; LUMACHI et al., 2001) pode contribuir para esta diferença. Os adenomas de crianças geralmente apresentam síndrome virilizante, com hiperprodução de andrógenos variável. O grau de virilização, como consequência da concentração e duração da exposição aos andrógenos, tem sido documentado por meio do padrão de pelos pubianos, tamanho de pênis ou clitóris, presença de acne ou comedões, frequência e tom da voz, e hipertrofia muscular. Neste estudo não foi encontrada correlação entre concentrações séricas de DHEA-S, antes da cirurgia, pilificação, presença de acne, e a expressão de transcritos ou da proteína DAX-1. A concentração elevada de DAX-1 pode ser parte de um mecanismo regulador contra a síntese de esteróides ativada por SF-1, cujo gene está amplificado (FIGUEIREDO et al., 2004), e a expressão de proteína aumentada, nos TCAs de criança (PIANOVSKI et al., submetido). *DAX-1* tem um papel importante no processo de formação e diferenciação do córtex adrenal no período embrionário, mas também é um inibidor da transcrição de *SF-1* (BEUSCHLEIN et al., 2002; VAL et al., 2003) e de enzimas que sintetizam andrógenos e cortisol produzidos pela adrenal (IKEDA et al., 1994; PARKER e SCHIMMER, 1997; LALLI et al., 1998).

Embora a testosterona seja capaz de inibir a expressão de *DAX-1* em camundongos (MOROHASHI et al., 2000), os andrógenos e/ou cortisol parecem não inibir a expressão de *DAX-1* nos TCAs de crianças do presente estudo. A concentração de esteróides verificada no sangue de pacientes com TCA neste trabalho foi produzida por massas tumorais com peso 1,5 a 50 vezes maior do que o peso de dois córtex adrenais normais (ORTH et al., 1992; MESIANO et al., 1997). Uma estimativa aproximada dos 3 principais esteróides (DHEA-S, testosterona e cortisol) por cm³ de tecido, na maioria dos TCAs, revelou valores mais baixos, semelhantes ou acima do observado no córtex normal. Devemos ainda considerar que esta tentativa de estimar a produção de esteróides por cm³ de tecido do córtex adrenal é falha por não considerar as áreas de necrose geralmente existentes nos carcinomas. Em contrapartida, os transcritos de *DAX-1* (analisados em amostras sem necrose macroscópica) estavam aumentados em quase todos os TCAs, sugerindo que, pelo menos em alguns destes, a inibição mediada por *DAX-1* possa atenuar a ativação da síntese de esteróides mediada por outros fatores. SF-1 é o receptor nuclear órfão que estimula a transcrição das enzimas esteroidogênicas, entre elas StAR, hidroxilases esteróides citocromo P450 e 3β-hidroxiesteróide desidrogenase (PETER e DUBUIS, 2000). Além de *SF-1*, estimulam a síntese de esteróides no córtex adrenal normal ou TCA, *ACTH* (BABU et al., 2002), *p53* (CHERIAN-SHAW et al., 2004) e *LRH-1* (FAYARD et al., 2004). Nos adultos, a maioria dos TCAs é clinicamente silenciosa (“não funcionantes”) ou se manifesta como síndrome de Cushing (LATRONICO et al., 1997). Nas crianças, os tumores produzem predominantemente andrógenos, seguidos de glicocorticóides e/ou mineralocorticóides (RIBEIRO e FIGUEIREDO, 2004). No presente estudo, a síndrome de Cushing foi observada apenas nos carcinomas, o que concorda com achados de estudos anteriores que relacionam esta condição a um pior prognóstico (GONZALES et al., 1990; BERGADA et al., 1996; MICHALKIEWICZ et al., 2004). GIORDANO et al. (2003) encontraram proporções de transcritos de *DAX-1* maiores nos adenomas e alguns carcinomas de pacientes adultos com TCA (comunicação pessoal), sem relação com a apresentação clínica ou produção hormonal (a maioria com síndrome de Cushing e/ou hiperaldosteronismo). Pelos métodos de *northern* e

western blot, REINCKE et al. (1998) analisaram TCAs de 27 adultos e mostraram que a expressão de *DAX-1* está baixa ou ausente nos tumores adrenais produtores de aldosterona, mas alta nos adenomas adrenais não-funcionantes, sugerindo existir uma correlação inversa entre a expressão de *DAX-1* e a produção de hormônios esteróides. Por outro lado, SHIBATA et al. (2001) descreveram expressão baixa de *DAX-1* nos adenomas produtores de cortisol e elevada em dois casos de adenomas produtores de deoxicorticosterona onde a expressão de *CYP17* é muito baixa, e que são clinicamente caracterizados por excesso de produção de mineralocorticóides.

A subunidade alfa da inibina é um dos genes negativamente controlados por *DAX-1*. ACHERMANN et al. (2001) mostraram que o sinergismo entre *SF-1* e AMPc na região promotora da subunidade alfa de inibina é inibido por *DAX-1*. Este elo parece ser importante para explicar a possível participação de *DAX-1* e da inibina no processo de carcinogênese das gônadas e córtex adrenal. Existem fortes evidências de que a subunidade alfa da inibina desempenha papel supressor tumoral nesses tecidos, conforme indicado pelo aparecimento de TCAs em camundongos sem a sub-unidade alfa da inibina, submetidos previamente a gonadectomia (MATZUK et al., 1992; MATZUK et al., 1994). Ainda, corroborando a hipótese de participação da inibina alfa nos TCAs de crianças, LONGUI et al. (2004) encontraram 8 de 9 crianças do sul do Brasil com perda de heterozigose para subunidade alfa, sugerindo que além do mutante *p53* R337H presente em 13 de 14 tumores desse estudo, pode co-existir diminuição ou perda da função da inibina alfa. Recentemente, ABD-ELAZIZ et al. (2003) analisaram o valor de *DAX-1* como fator prognóstico em carcinoma ovariano e encontraram correlação positiva entre a imunorreatividade para *DAX-1* e a baixa sobrevida dos pacientes. Os achados de ACHERMANN et al. (2001), e ABD-ELAZIZ et al. (2003), sugerem que *DAX-1* poderia facilitar o aparecimento de tumor no ovário, e provavelmente no córtex adrenal, através do bloqueio da atividade supressora de tumor da sub-unidade alfa da inibina. Além da inibição em termos de transcrição, *DAX-1* atua na regulação pós-transcricional o que é sugerido pelo seu deslocamento núcleo-citoplasmático, sua atividade de ligação ao RNA e sua associação com polirribossomos nas células esteroideogênicas (LALLI et al., 2000). CONDE et al.,

(2004), analisaram a expressão de *DAX-1* em câncer de mama e encontraram diferença estatisticamente significativa quando compararam doença benigna da mama e carcinoma lobular infiltrativo ($p = 0,037$).

Para a maioria dos tecidos, considera-se que *DAX-1* seja um cofator repressor da transcrição de *SF-1* (CRAWFORD et al., 1998). Contudo, BURRIS et al., (1995), sugerem que *SF-1* pode regular ou modular a expressão de *DAX-1* ligando-se a elementos de DNA encontrados na região promotora de *DAX-1* e, assim, *SF-1* se posicionaria acima de *DAX-1* na cascata reguladora de vários tecidos esteroidogênicos e/ou outros componentes do eixo hipotálamo-hipofisário-adreno-gonadal.

A correlação entre a expressão de transcritos e a concentração de proteína *DAX-1*, no presente trabalho, as duas acima do normal em quase todos os TCAs, sugere a existência de um papel importante para o *DAX-1* na etiopatogenia ou como uma simples característica fenotípica do TCA da faixa pediátrica. É possível que *DAX-1* tenha participação na inibição parcial da síntese de esteróides e/ou facilite a formação do tumor através do bloqueio da sub-unidade alfa da inibina.

5.5 CONCEITOS E HIPÓTESES RELACIONADOS À ETIOPATOGENIA E À ELEVADA INCIDÊNCIA DE TCA NO PARANÁ

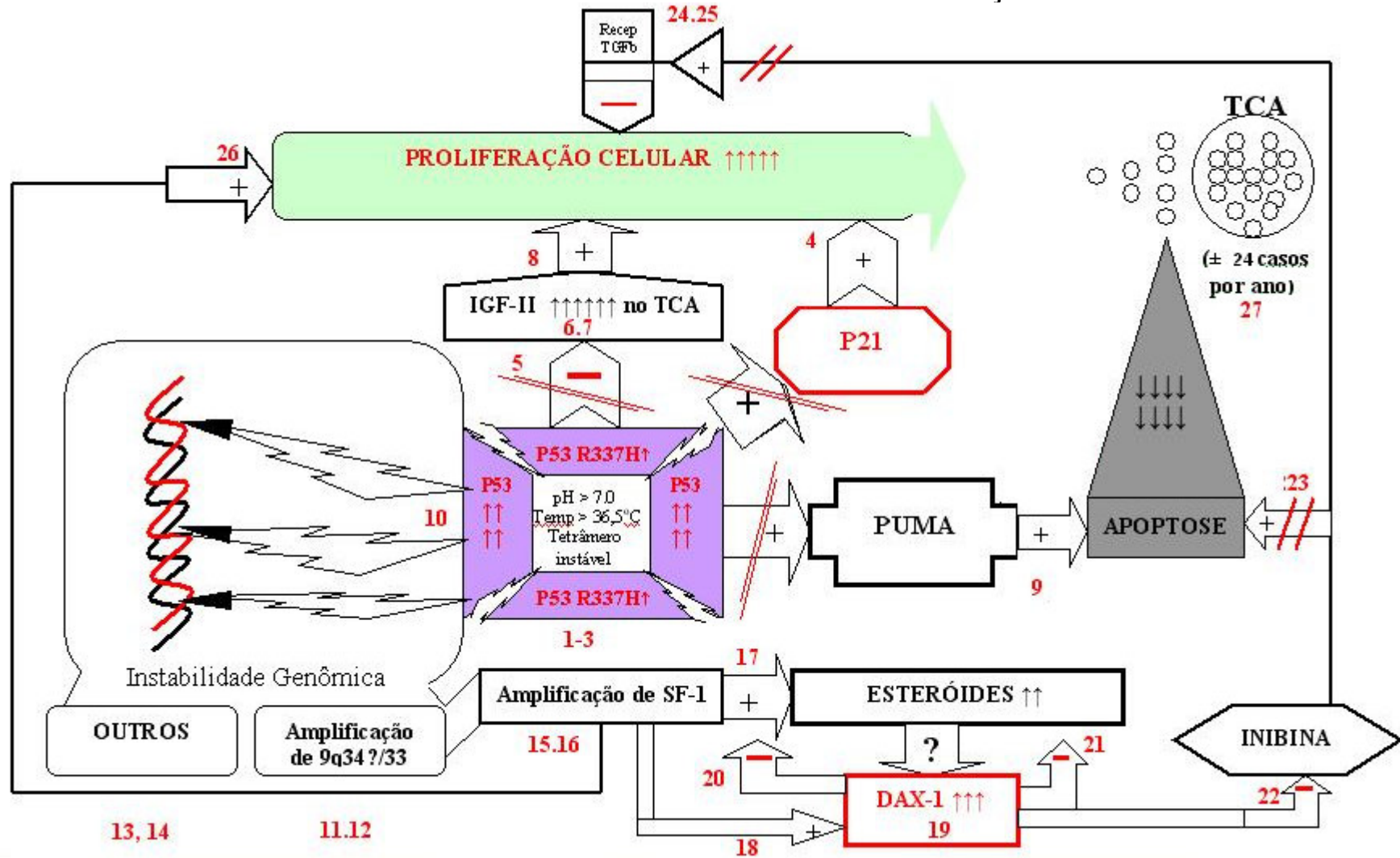
Esta tese apresenta dados inéditos que ajudam a entender parte do mecanismo relacionado à etiopatogenia dos TCAs de crianças, que ocorrem com elevada incidência na região metropolitana de Curitiba e provavelmente em todo estado do Paraná. Os fatores envolvidos são responsáveis por uma incidência de 3,5 casos/milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (PIANOVSKI et al., 2005, submetido) o que é cerca de 12 a 18 vezes maior do que a incidência observada na França (DESANDES et al., 2004) e nos Estados Unidos (BERSTEIN e GURNEY, 1999). Os resultados foram interpretados como ilustrado na Figura 10, com base nas referências citadas no Quadro 6, apresentando propostas hipotéticas para a participação do *SF-1* e *DAX-1*. O papel exato destes receptores nucleares pode não ser diretamente de fator etiológico, mas certamente eles estão relacionados à patogenia dos TCAs.

Quase todas as crianças do Paraná com TCA herdaram de um dos progenitores o gene mutante *TP53* R337H. A célula do córtex adrenal perde o alelo normal (LOH) (RIBEIRO et al., 1997), e em seguida a proteína *TP53* R337H, em pH alcalino e/ou processo febril, sofre uma perda de função ou fica incapacitada de induzir apoptose e/ou inibir a proliferação celular por não se manter na forma de tetrâmeros para se ligar ao DNA (DIGIAMMARINO et al., 2001; HAINAUT, 2002; LEE et al., 2003), podendo assim alterar o resultado final das vias metabólicas moduladas pela proteína p53. A soma dos efeitos destas vias, e mais outras que não dependam da p53 resultará na formação do TCA. No esquema da Figura 10 foram propostos três principais elementos que estariam alterados (*p21*, *PUMA* e *IGF-II*). Foi sugerido que a proliferação celular aumenta com a redução da expressão de *p21* (SHERR e ROBERTS, 1995; LI et al., 1994), e em resposta ao aumento da ação de *IGF-II* (YU e BERKEL, 1999), o qual por sua vez é regulado por p53 (ZHANG et al., 1996). Nos TCA de criança e adulto, *IGF-II* foi identificado em elevadas concentrações (ILVESMAKI et al., 1993; HOEFLICH et al., 2000; WILKIN et al., 2000; WEBER, FOTTNER e WOLF, 2000). Acredita-se também que uma falha na apoptose aconteça por não ocorrer o aumento esperado de *PUMA* em resposta ao *TP53* R337H em alguma condição de dano irreparável ao DNA, como relatado *in vitro* (HEMANN et al., 2004; YU et al., 2003). O ritmo de crescimento dos TCAs parece ser variável como sugerem alguns casos clínicos (FIGUEIREDO et al., 2004). Identificou-se que a maior parte dos TCAs pesquisados no presente estudo apresentava amplificação de *SF-1* (FIGUEIREDO et al., 2005), que representava, pelo menos em parte, a amplificação de 9q34 (FIGUEIREDO et al., 1999). Esta alteração genômica e outras relatadas em diferentes estudos parecem acontecer em decorrência da instabilidade genômica que se instala com a perda parcial ou total da função da p53 (DASIKA et al., 1999). O aumento da expressão de *SF-1* pode resultar em duas alterações: no aumento da esteroidogênese, como sugere o fato de a maioria das crianças com TCA apresentar virilização, com ou sem síndrome de Cushing (MICHALKIEWICZ et al., 2004) ou no provável estímulo da proliferação celular por um mecanismo semelhante ao que acontece com seu homólogo, o *LRH-1* (BOTRUGNO et al., 2004). O excesso de

andrógenos e glicocorticóides poderia induzir aumento de um fator regulador inibidor da esteroidogênese como o *DAX-1* (SHIBATA et al., 2001). Por sua vez, o *DAX-1* é o principal inibidor da ação do *SF-1* (CRAWFORD et al., 1998; SUZUKI et al., 2003) e pode inibir diretamente enzimas envolvidas na síntese de esteróides (ZAZOPOULOS et al., 1997), porém, esta inibição não é superior à soma dos estímulos a favor da esteroidogênese, caso contrário não haveria predomínio de manifestações clínicas decorrentes de excesso hormonal, confirmado pelas concentrações séricas dos esteróides. A grande maioria das células do TCA de crianças produz hormônios, enquanto menos que 5% são capazes de causar apenas efeitos de massa, e portanto são os que têm um diagnóstico tardio (MICHALKIEWICZ et al., 2004). Foi proposto ainda que o aumento da expressão de *DAX-1* no TCA pode resultar em inibição da expressão da subunidade alfa da inibina (ACHERMANN et al., 2001). Por sua vez, sabe-se que a inibina é considerada como fator de supressão tumoral por inibir a proliferação celular através da ligação aos receptores de TGF beta (LEWIS et al., 2000; KINGSLEY, 1994) e interferir na ação de ativina (RISBRIDGER, SCHMITT e ROBERTSON et al., 2001). Parece não haver dúvidas quanto ao papel de supressor tumoral da inibina, inibidor da proliferação celular, mas ainda se questiona seu papel como ativador da apoptose (ZHANG et al., 1999).

Todas estas etapas, ainda apresentadas de maneira não clara e bastante simplificadas, contribuem para explicar a baixa penetrância do TCA com este mutante *TP53 R337H*, de cerca de 10% (FIGUEIREDO et al., submetido). O processo de formação do TCA é multifatorial e não se sabe ainda o que determina o fenótipo maligno. O acúmulo de alterações moleculares pode ser responsável pela definição do prognóstico final. No presente estudo, a análise de *SF-1* e de *DAX-1* não encontrou significado prognóstico na evolução dos TCAs de crianças do Paraná.

FIGURA 10 - HIPÓTESES PARA ETIOPATOGENIA DO TCA DE CRIANÇAS DO PARANÁ



QUADRO 6 – REFERÊNCIAS RELATIVAS À HIPÓTESE SOBRE ETIOPATOGENIA DO TCA DE CRIANÇAS DO PARANÁ

REFERÊNCIAS			
1	RIBEIRO et al., 2001	15	FIGUEIREDO et al., 2005 (Apêndice 4)
2	DIGIAMMARINO et al., 2002	16	PIANOVSKI et al., (Apêndice 5)
3	LEE et al., 2003	17	PARKER e SCHIMMER, 1997
4	STOJADINOVIC et al., 2002	18	YU et al., 1998
5	HENGST et al., 1998	19	FIGUEIREDO et al., (Apêndice 6)
6	ZHANG et al., 1996	20	LALLI e SASSONE-CORSI, 1999
7	WILKIN et al., 2000	21	ZAZOPOULOS et al., 1997
8	ILVESMAKI et al., 1993	22	ACHERMAN et al., 2001
9	HEMANN et al., 2004	23	ZHANG et al., 1999
10	YU et al., 2002	24	RISBRIDGER et al., 2001
11	FIGUEIREDO et al., 1999	25	LEWIS et al., 2000
12	JAMES et al., 1999	26	BEUSCHLEIN et al., 2002
13	ZHAO et al., 1999	27	PIANOVSKI et al., 2005 (Apêndice 3)
14	KJELMANN et al., 1996		

6 CONCLUSÕES

A realização desta pesquisa permitiu a identificação de questões importantes para a elucidação das várias etapas da etiopatogenia e carcinogênese responsáveis pelo aparecimento do TCA em crianças. Assim, concluiu-se que:

1 - A mortalidade padronizada por idade, por TCA, na região metropolitana de Curitiba, é igual a 1,6/milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade.

2 - A incidência de TCA é em torno de 3,5/milhão de crianças com idade inferior a 15 anos, ou seja, 18 vezes maior do que na França.

3 - A taxa de mortalidade padronizada por idade para o neuroblastoma adrenal é de 2,0/milhão de crianças com idade inferior a 15 anos/ano. A relação entre mortalidade, padronizada por idade, por TCA e por neuroblastoma adrenal, na região metropolitana de Curitiba, é 1,25, enquanto o esperado seria cerca de 15 óbitos por Nb para cada óbito por TCA.

4 - A maior parte dos TCAs do Paraná apresenta aumento no número de cópias de *SF-1*, confirmando que este é um dos genes amplificados associados à amplificação 9q34. A amplificação foi detectada em adenomas e carcinomas, tanto na forma clínica virilizante quanto na forma mista (virilizante + Cushing), não apresenta diferença quanto à evolução e sexo e não se correlaciona com idade ou estágio do tumor.

5 - A expressão protéica de *SF-1* está aumentada nos TCAs, porém não há correlação entre o número de cópias do gene *SF-1* e sua expressão protéica, indicando diferentes taxas de metabolismo para o transcrito e a proteína ou, ainda, fatores que silenciam parcialmente a expressão gênica. Da mesma forma, a expressão protéica de *SF-1* não está associada às variáveis idade, sexo, forma clínica, estadiamento, tipo histológico, concentrações séricas de cortisol e/ou sulfato de deidroepiandrosterona, nem à sobrevida.

6 - TCAs apresentam, em média, aumento da concentração de transcritos do gene *DAX-1* em relação às adrenais normais. A expressão protéica média de *DAX-1* também está aumentada nos TCAs em relação às adrenais normais. Nem a concentração de transcrito de *DAX-1* nem sua expressão protéica diferem quanto às formas clínicas (virilizante, virilização associada à síndrome de Cushing, hiperaldoesteronismo associado à síndrome de Cushing), sexo ou evolução e não se correlacionam com o estágio do tumor.

REFERÊNCIAS

- ABD-ELAZIZ, M.; AKAHIRA, J.; MORIYA, T.; SUZUKI, T.; YAEGASHI, N.; SASANO, H. Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: an independent prognostic factor of clinical outcome. **Cancer Science**, v. 94, n. 11, p. 980-985, 2003.
- ACHERMANN, J.C.; ITO, M.; ITO, M.; HINDMARSH, P. C.; JAMESON, L. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. **Nature Genetics**, v. 22, n. 2, p. 125-126, 1999.
- ACHERMANN, J.C.; MEEKS, J. J.; JAMESON, J L. Phenotypic spectrum of mutations in *DAX-1* and *SF-1*. **Molecular and Cell Endocrinology**, v. 185, n. 1-2, p. 17-25, 2001.
- AIGUEPERSE, C.; VAL, P.; PACOT, C.; DARNE, C.; LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P.; VEYSSIERE, G.; JEAN, C.; MARTINEZ, A. SF-1 (steroidogenic factor-1), C/EBPbeta (CCAAT/enhancer binding protein), and ubiquitous transcription factors NF1 (nuclear factor 1) and Sp1 (selective promoter factor 1) are required for regulation of the mouse aldose reductase-like gene (*AKR1B7*) expression in adrenocortical cells. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 93-111, 2001.
- AROLA, J.; LIU, J.; HEIKKILA, P.; ILVESMAKI, V.; SALMENKIVI, K.; VOUTILAINEN, R.; KAHRI, A.I. Expression of inhibin alpha in adrenocortical tumours reflects the hormonal status of the neoplasm. **Journal of Endocrinology**, v. 165, n. 2, p. 223-229, 2000.
- ARON, D.C.; TYRRELL, B. Glucocorticoids & adrenal androgens. In: GREENSPAN, F.S.; BAXTER, J.D. **Basic & Clinical Endocrinology**. Connecticut: Appleton & Lange, 1994. p. 307-346.
- ATTARDI, L.D. The role of p53-mediated apoptosis as a crucial anti-tumor response to genomic instability: lessons from mouse models. **Mutation Research**, v. 569, n. 1-2, p. 145-157, 2005.
- AUSTGEN, L.; BOWEN, R.A.; ROUGE, M. Pathophysiology of the endocrine system.. Disponível em: <http://arbl.cvmb.colostate.edu/> Acesso em 05 dezembro 2004.
- BABU, P. S.; BAVERS, D.L.; BEUSCHLEIN, F.; SHAH, S.; JEFFS, B.; JAMESON, J.L.; HAMMER, G.D. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 665-673, 2002.
- BAMBERGER, A.M.; EZZAT, S.; CAO, B.; WONG, M.; PARKER, K.L.; SCHULTE, H.M.; ASA, S.L. Expression of steroidogenic factor-1 (SF-1) mRNA and protein in the human placenta. **Molecular Human Reproduction**, v. 2, n. 6, p. 457-461, 1996.

BARDONI, B.; ZANARIA, E.; GUIOLI, S.; FLORIDIA, G.; WORLEY, K. C.; TONIM, G.; FERRANTE, E.; CHIUMELLO, G.; McCABE, E. R. B.; FRACCARO, M. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nature Genetics**, v. 7, n. 4, p. 497-501, 1994.

BARILI, C.; GRASSI, P.; CZEPIELEWSKI, M.A. Mortalidade por carcinoma adrenocortical (adrenoca) no Rio Grande do Sul. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 36, n. 1, p. 225, 1992, resumo.

BARLUND, M.; KUUKASJARVI, T.; SYRJAKOSKI, K.; AUVINENE, A., KALLIONIEMI, A. Frequent amplification and overexpression of CCND1 in male breast cancer. **International Journal of Cancer**, v. 111, n. 6, p. 968-971, 2004.

BARRETO, J.H.S.; DOREA, M.D.F.; MENDONÇA, N. Carcinoma do córtex adrenal na infância. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 45, p. 383, 2001.

BARTON, D.E.; YANG-FENG, T.L.; MASON, A.J.; SEEBURG, P.H.; FRANCKE, U. Mapping of genes for inhibin subunits alpha, beta a, and beta b on human and mouse chromosomes and studies of *jsd* mice. **Genomics**, v. 5, n. 1, p. 91-99, 1989.

BARTRAM, C.R.; DE KLEIN, A.; HAGEMEIJER, A.; VAN AGTHOVEN, T.; GEURTS VAN KESSEL, A.; BOOTSMA, D.; GROSVELD, G.; FERGUSON-SMITH, M.A.; DAVIES, T.; STONE, M. Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. **Nature**, v. 306, n. 5940, p. 277-280, 1983.

BARZON, L.; CHILOSI, M.; FALLO, F.; MARTIGNONI, G.; MONTAGNA, L.; PALU, G.; BOSCARO, M. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. **European Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 2, p. 207-212, 2001.

BECKERS, A.; ABS, R.; WILLEMS, P. J.; VAN DER AUWERA, B.; KOVACS, K.; REZNIK, M.; STEVENAERT, A. Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 2, p. 564-570, 1992.

BENCHIMOL, S.; LAMB, P.; CRAWFORD, L.V.; SHEER, D.; SHOWS, T.B.; BRUNS, G.A.; PEACOCK, J. Transformation associated p53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. **Somatic Cell & Molecular Genetics**, v. 11, n. 5, p. 505-510, 1985.

BERGADA, I.; VENARA, M.; MAGLIO, S.; CIACCIO, M.; DIEZ, B.; BERGADA, C.; CHEMES, H. Functional adrenal cortical tumors in pediatric patients: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a long term follow-up series. **Cancer**, v. 77, n. 44, p. 771-777, 1996.

BERNSTEIN, M.L.; LECLERC, J.M.; BUNIN, G.; BRISSON, L.; ROBISON, L.; SHUSTER, J.; BYRNE, T.; GREGORY, D.; HILL, G.; DOUGHERTY, G. A population-based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America. **Journal of Clinical Oncology**, v. 10, n. 2, p. 323-329, 1992.

BERNSTEIN, L.; GURNEY, J.G. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al, eds. **Cancer and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995** Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER program, 139-147. 1999.

BEUSCHLEIN, F.; REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. D., JAURSCHANCKE, C.; ABDELHAMID, S.; CHROUSOS, G. P.; ALLOLIO, B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. **Cancer Research**, v. 54, n. 15, p. 4927-4932, 1994.

BEUSCHLEIN, F.; MUTCH, C.; BAVERS, D.L.; ULRICH-LAI, Y.M.; ENGELAND, W.C.; KEEGAN, C.; HAMMER, G.D. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 3122-3135, 2002.

BIASON-LAUBER, A.; SCHOENLE, E.J. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor-1 (NRA1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1563-1568, 2000.

BIRCH, J.M.; BLAIR, V. Increase in childhood carcinomas in north-west England. **Lancet**, v. 1, n. 8588/8600, p. 833, 1988.

BIRCH, J.M.; HARTLEY, A.L.; TRICKER, K.J.; PROSSER, J.; CONDIE, A.; KELSEY, A.M.; HARRIS, M.; JONES, P. H.; BINCHY, A.; CROWTHER, D.; CRAFT, A.W.; EDEN, O.B.; GARET, D.; EVANS, R.; THOMPSON, E.; MANN, J.R.; MARTIN, J.; MITCHELL, E.L.D.; SANTIBANEZ-KOREF, M.F. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Research**, v. 54, n. 5, p. 1298-1304, 1994.

BIRCH, J.M.; HEIGHWAY, J.; TEARE, M.D.; KELSEY, A.M.; HARTLEY, A. L.; TRICKER, K.J.; CROWTHER, D.; LANE, D.P.; SANTIBANEZ-KOREF, M.F. Linkage studies in a Li-Fraumeni family with increased expression of p53 protein but no germline mutation in p53. **British Journal of Cancer**, v. 70, n. 6, p. 1176-1181, 1994.

BIRCH, J.M.; MARSDEN, H.B.; SWINDELL, R. Incidence of malignant diseases in childhood: a 24-year review of the Manchester Children's Tumor Registry data. **British Journal of Cancer**, v. 42, n. , p. 215-223, 1980.

BLANCATO, J.K.; HADDAD, B.R. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in pathology. In H.L.F. Mark (ed), **Medical Cytogenetics**. New York Kager Press, 2000. p. 141-164.

BLAND, M.L.; JAMIESON, C.A.; AKANA, S.F.; BORNSTEIN, S.R.; EISENHOFER, G.; DALLMAN, M.F.; INGRAHAM, H.A. Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 97, n. 26, p. 14488-14493. 2000.

BOCIAN-SOBKOWSKA, J.; WOZNIAK, W.; MALENDOWICZ, L.K. Postnatal involution of the human adrenal fetal zone: stereologic description and apoptosis. **Endocrine Research**, v. 24, n. 3-4, p. 969-973, 1998.

BORDOW, S.B.; NORRIS, M.D.; HABER, P. S.; MARSHALL, G.M.; HABER, M. Prognostic significance of MYCN expression in childhood neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 3286–3294, 1998.

BORNSTEIN, S.R.; STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. **Annals of Internal Medicine**, v. 130, n. 9, p. 759-771, 1999.

BOSTON, B.A.; MANDEL, S.; LaFRANCHI, S.; BLIZIOTES, M. Activating mutation in the stimulatory guanine-nucleotide-binding protein in an infant with Cushing's syndrome and nodular adrenal hyperplasia. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, n. 3, p. 890-893, 1994.

BOTRUGNO, O.A.; FAYARD, E.; ANNICOTTE, J.-S.; HABY, C.; BRENNAN, T.; WENDLING, O.; TANAKA, T.; KODAMA, T.; THOMAS, W.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. Synergy between LRH-1 and betacatenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. **Molecular Cell**, v. 15, n. 4, p. 499-509, 2004.

BRODEUR, G.M.; SEEGER, R.C.; SCHWAB, M.; VARMUS, H.E.; BISHOP, J.M. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. **Science**, v. 224, n. 4653, p. 1121-1124, 1984.

BRUCK, I.; SANDRINI, R.; VIEIRA, L. M.; MARINONI, L. P.; De LACERDA, L. Tumores de supra-renal na infância: apresentação de 5 casos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PEDIATRIA (16:1969:Curitiba). Resumo.

BUGALHO, M.J.; LI, X.; RAO, C.V.; SOARES, J.; SOBRINHO, L.G. Presence of a Gs alpha mutation in an adrenal tumor expressing LH/hCG receptors and clinically associated with Cushing's syndrome. **Gynecology & Endocrinology**, v. 14, n. 1, p. 50-54, 2000.

BUGG, M.F.; RIBEIRO, R.C.; ROBERTSON, P. K.; LLOYD, R.V.; SANDRINI, R.; SILVA, J.B.; EPELMAN, S.; SHAPIRO, D.N.; PARHAM, D.M. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a brazilian population. Brazilian group for treatment of childhood adrenocortical tumors. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 101, n. 5, p. 625-629, 1994.

BURRIS, T.P.; GUO, W.; LE, T.; McCABE, E.R.B. Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX-1 promoter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 2, p. 576-581, 1995.

CAGLE, P.T.; HOUGH, A.J.; PYSHER, T.J.; PAGE, D.L.; JOHNSON, E.H.; KIRKLAND, R.T.; HOLCOMBE, J.H.; HAWKINS, E.P. Comparison of adrenal cortical tumors in children and adults. **Cancer**, v. 57; n. 11, p. 2235-2237, 1986.

CALL, K.M.; GLASER, T.; ITO, C.Y.; BUCKLER, A.J.; PELLETIER, J.; HABER, D.A.; ROSE, E.A.; KRAL, A.; YEGER, H.; LEWIS, W.H. Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. **Cell**, v. 60, n. 3, p. 509-520, 1990.

CAMUTO, P.; SCHINELLA, R.; GILCHRIST, K.; CITRIN, D.; FREDRICKSON, G. Adrenal cortical carcinoma: flow cytometric study of 22 cases, an ECOG study. **Urology**, v. 37, n. 4, p. 380-384, 1991.

CAVENEY, W.K.; DRYJA, T.P.; PHILLIPS, R.A.; BENEDICT, W.F.; GODBOUT, R.; GALLIE, B.L.; MURPHREE, A.L.; STRONG, L.C.; WHITE, R.L. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. **Nature**, v. 305, n. 5937, p. 779-784, 1983.

CHAN, P.; SIMON-CHAZOTTES, D.; MATTEI, M.G.; GUENET, J.L.; SALIER, J.P. Comparative mapping of lipocalin genes in human and mouse: the four genes for complement C8 g chain, prostaglandin-D-synthase, oncogene-24p3, and progesterone-associated endometrial protein map to HSA9 and MMU2. **Genomics**, v. 23, n. 1, p. 145-150, 1994.

CHERIAN-SHAW, M.; DAS, R.; VANDEVOORT, C.A.; CHAFFIN, C.L. Regulation of steroidogenesis by p53 in macaque granulosa cells and H295R human adrenocortical cells. **Endocrinology**, v. 145, n. 12, p. 5734-5744, 2004.

CHISSOE, S.L.; BODENTEICH, A.; WANG, Y. F.; WANG, Y. P.; BURIAN, D.; CLIFTON, S.W.; CRABTREE, J.; FREEMAN, A.; IYER, K.; JIAN, L., MA, Y.; MCLAURY, H.J.; PAN, H.Q.; SARHAN, O.H.; TOTH, S.; WANG, Z.; ZHANG, G.; HEISTERKAMP, N.; GROFFEN, J.; ROE, B.A. Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. **Genomics**, v. 27, n. 1, p. 67-82, 1995.

CONDE, I.; ALFARO, J.M.; FRAILE, B.; RUIZ, A.; PANIAGUA, R.; ARENAS, M.I. DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 140-148, 2004.

COULTER, C.L.; GOLDSMITH, P.C.; MESIANO, S.; VOYTEK, C.C.; MARTIN, M.C.; HAN, V. K.M.; JAFFE, R.B. Functional maturation of the primate fetal adrenal *in vivo*: 1. Role of insulin-like growth factors, IGF-I receptor and IGF binding proteins in growth regulation. **Endocrinology**, v. 137, n. 10, p. 4487-4498, 1996.

CRAWFORD, P.A.; DORN, C.; SADOVSKY, Y.; MILBRANDT, J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 5, p. 2949-5629, 1998.

DANIELIAN, P. S.; WHITE, R.; LEES, J.A.; PARKER, M.G. Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. **EMBO Journal**, v. 11, n. 3, p. 1025-1033, 1992.

DASIKA, G.K.; LIN, S.C.; ZHAO, S.; SUNG, P.; TOMKINSON, A.; LEE, E.Y. DNA damage-induced cell cycle checkpoints and DNA strand break repair in development and tumorigenesis. **Oncogene**, v. 18, n. 55, p. 7883-99, 1999.

DAVIES, E.; BONNARDEAUX, A.; PLOUIN, P. F.; CORVOL, P.; CLAUSER, E. Somatic mutations of the angiotensin II (AT1) receptor gene are not present in aldosterone-producing adenoma. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 2, p. 611-615, 1997.

DE JONG, F.H.; GROOTENHUIS, A.J.; STEENBERGEN, J.; VAN SLUIJS, F.J.; FOEKENS, J.A.; TEN KATE, F.J.; OOSTERHUIS, J.W.; LAMBERTS, S.W.; KLIJN, J.G. Inhibin immunoreactivity in gonadal and non-gonadal tumors. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 6, p. 863-866, 1990.

DEHNER, L.P.; FRANCIOSI, R.A. Adrenocortical neoplasia in the pediatric age group. A clinicopathologic study of seven cases. In: HUMPRHEY, G.B.; GRINDEY, G.B.; DEHNER, L.P. et al. **Adrenal and endocrine tumors in children**. Adrenal cortical carcinoma and multiple endocrine neoplasia. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984, p. 291-302.

DEVLIN, J.; ELDER, P.A.; GABRA, H.; STEEL, C.M.; KNOWLES, M.A. High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour-suppressor loci. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 4, p. 420-423, 1996.

DESANDES, E.; CLAVEL, J.; BERGER, C.; BERNARD, J.L.; BLOUIN, P.; LUMLEY, L.; DEMEOCQ, F.; FREYCON, F.; GEMBARA, P.; GOUBIN, A.; LE GALL, E.; PILLON, P.; SOMMELET, D.; TRON, I.; LACOUR, B. Cancer incidence among children in France, 1990-1999. **Pediatric Blood & Cancer**, v. 43, n. 7, p. 749-757, 2004.

DIGIAMMARINO, E.L.; LEE, A.S.; CADEWELL, C.; ZHANG, W.; BOTHNER, B.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; KRIWACKI, R.W. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 12-16, 2002.

DOHNA, M.; REINCKE, M.; MINCHEVA, A.; ALLOLIO, B.; SOLINAS-TOLDO, S.; LICHTER, P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. **Genes Chromosomes & Cancer**, v. 28, n. 2, p. 145-152, 2000.

DRIVER, C.P.; BIRCH, J.; GOUGH, D.C.; BRUCE, J. Adrenal cortical tumors in childhood. **Pediatric Hematology and Oncology**, v. 15, n. 6, p. 527-532, 1998.

Du MANOIR, S.; SPEICHER, M.R.; JOOS, S.; SCHRÖCK, E.; POPP, S.; DÖHNER, H.; KOVACS, G.; ROBERT-NICOUD, M.; LICHTER, P. CREMER, T. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. **Human Genetics**, v. 90, n. 6, p. 590-610, 1993.

DURAI, R.; YANG, W.; GUPTA, S.; SEIFALIAN, A.M.; WINSLET, M.C. The role of the insulin-like growth factor system in colorectal cancer: review of current knowledge. **International Journal of Colorectal Disease**. Jan 14; 2005 [Epub ahead of print]

DURBECQ, V.; DESMED, C.; PAESMANS, M.; CARDOSO, F.; DI LEO, A.; MANO, M.; LEROY, J.Y.; SOTIRIOU, C.; PICCART, M.; LARSIMONT, D. Correlation between topoisomerase-IIalpha gene amplification and protein expression in HER-2 amplified breast cancer. **International Journal of Oncology**, v. 25, n. 5, p. 1473-1479, 2004.

EDGREN, M.; ERIKSSON, B.; WILANDER, E.; WESTLIN, J.E.; NILSSON, S.; OBERG, K. Biological characteristics of adrenocortical carcinoma: a study of p53, IGF, EGF-r, Ki-67 and PCNA in 17 adrenocortical carcinomas. **Anticancer Research**, v. 17, n. 2B, p. 1303-1309, 1997.

EL-DEIRY, W.S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D.B.; PARSONS, R.; TRENT, J.M.; LIN, D.; MERCER, W.E.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. **Cell**, v. 75, n. 4, p. 817-825, 1993.

ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.A.. Orphan nuclear receptors – the first eight years. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 11, p. 1293-1307, 1996.

FAYARD, E.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 250-260, 2004.

FEINBERG, A.P.; VOGELSTEIN, B. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. **Analytical Biochemistry**, v. 132, n. 1, p. 6-13, 1983.

FIGUEIREDO, B.C. **Tumores de córtex adrenal**. Fisiologia, Clínica, Epidemiologia, Patologia, Genética e Tratamento. 2ª. Edição, Curitiba, PR. 2004.

FIGUEIREDO, B.C.; CAVALLI, L.R.; PIANOVSKI, M.A.; LALLI, E.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; DELACERDA, L.; RODRIGUES, G.A.; HADDAD, B.R. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 90, n. 2, p. 615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B.C.; PIANOVSKI, M.D.; WEST, A.; LALLI, E.; SANDRINI, R.; CALEFFE, L.; RIBEIRO, R.C.; GONÇALVES, A.; MASTELLARO, M.J.; MICHALKIEWICZ, E.; ZAMBETTI, G. Correlation between the DAX-1 array transcript and protein expression in childhood adrenocortical tumors . Submetido para publicação.

FIGUEIREDO, B.C.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; HADDAD, B.; PIANOVSKI, M.D.; PEREIRA, R.M.; DELACERDA, L.; SANDRINI, R. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 33, n. 10, p. 1217-1224, 2000.

FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G.P.; PEREIRA, R.M.; CHENG, C.; LIU, W.; LACERDA, L.; PIANOVSKI, M.A.; MICHALKIEWICZ, E.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; MASTELLARO, M.J.; VIANNA, S.; WATANABE, F.; SANDRINI, F.; ARRAM, S.I.B.; BOFFETTA, P.; RIBEIRO, R.C. Penetrance of Adrenocortical Tumors Associated with the Germline *TP53* R337H Mutation (submetido ao **Journal of Medical Genetics**)

FIGUEIREDO, B.C.; STRATAKIS, C.A.; SANDRINI, R.; DeLACERDA, L. PIANOVSKI, M.D.; GIATZAKIS, C.; YOUNG, H.M.; HADDAD, B.R. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 3, p. 1116-1121, 1999.

FOROZAN, F.; KARHU, R.; KONONEN, J.; KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O-P. Genome screening by comparative genomic hybridization. **Trends in Genetics**, v. 13, n. 10, p. 405-409, 1997.

FOWKES, R.C.; BURRIN, J.M. Steroidogenic factor-1: a key regulator of gonadotroph gene expression. **Journal of Endocrinology**, v. 177, n. 3, p. 345-350, 2003.

GANDOUR, M.J.; GRIZZLE, W.E. A small adrenocortical carcinoma with aggressive behavior. An evaluation of criteria for malignancy. **Archives of Pathology and Laboratory Medicine**, v. 110, n. 11, p. 1076-1079, 1986.

GAO, R.N.; LEVY, I.G.; WOODS, W.G.; COOMBS, B.A.; GAUDETTE, L.A.; HILL, G.B. Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers. **Cancer Causes & Control**, v. 8, n. 5, p. 745-754, 1997.

GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; GASTON, V.; COSTE, J.; LOUVEL, A.; BAUDIN, E.; BERTHERAT, J.; CAPUIS, Y.; DUCLOS, J.M.; SCHLUMBERGER, M.; PLOUIN, P. F.; LUTON, J. P.; BOUC, Y.L. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. **Cancer Research**, v. 61, n. 18, p. 6762-6767, 2001.

GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; SCHNEID, H. FRANCILLARD-LEBLOND, M.; LUTON, J.P.; GIRARD, E.; LE BOUC, Y. Rearrangement at the 11p15 locus and overexpression of IGF-II gene in sporadic adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 6, p. 1444-1453, 1994.

GICQUEL, C.; BERTHERAT, J.; LE BOUC, Y.; BERTAGNA, X Pathogenesis of adrenocortical incidentalomas and genetic syndromes associated with adrenocortical neoplasms. **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America**, v. 29, n. 1, p. 1 -13, 2000.

GICQUEL, C.; DIB, A.; BERTAGNA, X.; AMSELEM, S.; LeBOUC, Y. Oncogenic mutations of alpha-Gi2 protein are not determinant for human adrenocortical tumourigenesis. **European Journal of Endocrinology**, v. 133, n. 2, p. 166-172, 1995.

GICQUEL, C.; RAFFIN-SANSON, M.R.; GASTON, V.; BERTAGNA, X.; PLOUIN, P. F.; SCHLUMBERGER, M.; LOUVEL, A.; LUTON, J.P.; BOUC, Y.L. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 8, p. 2559-2565, 1997.

GILBERTSON, R.J.; HILL, D.A.; HERNAN, R.; KOCAK, M.; GEYER, R.; OLSON, J.; GAJJAR, A.; RUSH, L.; HAMILTON, R.L.; FINKELSTEIN, S.D.; POLLACK, I.F. ERBB1 is amplified and overexpressed in high-grade diffusely infiltrative pediatric brain stem glioma. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 10, p. 3620-3624, 2003.

GIORDANO, T.J.; THOMAS, D.G.; KUICK, R.; LIZYNESS, M.; MISEK, D.E.; SMITH, A.L.; SANDERS, D.; ALJUNDI, R.T.; GAUGER, P. G.; THOMPSON, N. W.; TAYLOR, J.M.; HANASH, S.M. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **American Journal of Pathology**, v. 162, n. 2, p. 521-531, 2003.

GONZALEZ, G.; ARTEAGA, E.; RODRIGUEZ, J.A.; LOPEZ, J.M.; MICHAUD, P.; CODNER, E. Cushing's syndrome: the diagnostic and treatment problems in 27 cases. **Revista Médica de Chile**, v. 118, n. 9, p. 979-987, 1990.

GORDON, R.; GARTSIDE, M.; TUNNY, T.; STOWASSER, M. Different allelic patterns at chromosome 11q13 in paired aldosterone-producing tumours and blood DNA. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 23, n. 6, p. 594-596, 1996.

GORTZ, B.; ROTH, J.; SPEEL, E.J.; KRAHENMANN, A.; DE KRIJGER, R.R.; MATIAS-GUIU, X.; MULETTA-FEURER, S.; RUTMANN, K.; SAREMASLANI, P.; HEITZ, P. U.; KOMMINOTH, P. MEN1 gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions. **International Journal of Cancer**, v. 80, n. 3, p. 373-379, 1999.

GOZZETTI, A.; LE BEAU, M.M. Fluorescence in situ hybridization: uses and limitations. **Seminars in Hematology**, v. 37, n. 4, p. 320-333, 2000.

GREEN, A.J.; JOHNSON, P. H.; YATES, J.R. The tuberous sclerosis gene on chromosome 9q34 acts as a growth suppressor. **Human Molecular Genetics**, v. 3, n. 10, p. 1833-1834, 1994.

GUMMOW, B.M.; WINNAY, J.N.; HAMMER, G.D. Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin alpha gene. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 29, p. 26572-26579, 2003.

GURATES, B.; SEBASTIAN, S.; YANG, S.; ZHOU, J.; TAMURA, M.; FANG, Z.; SUZUKI, T.; SASANO, H.; BULUN, S.E. WT1 and DAX-1 inhibit aromatase P450 expression in human endometrial and endometriotic stromal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 9, p. 4369-4377, 2002.

HAAK, H.R.; CORNELISSE, C.J.; HERMANS, J.; COBBEN, L.; FLEUREN, G.J. Nuclear DNA content and morphological characteristics in the prognosis of adrenocortical carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 68, n. 1, p. 151-155, 1993.

HABER, D.A.; BUCKLER, A.J.; GLASER, T.; CALL, K.M.; PELLETIER, J.; SOHN, R.L.; DOUGLASS, E.C.; HOUSMAN, D.E. An internal deletion within an 11p13 zinc finger gene contributes to the development of Wilms' tumor. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1257-1269, 1990.

HADDAD, B.; PABON-PENA, C.R.; YOUNG, H.; SUN, W.H. Assignment1 of STAT1 to human chromosome 2q32 by FISH and radiation hybrids. **Cytogenetics Cell Genetics**, v. 83, n. 1-2, p. 58-59, 1998.

HAINAUT, P. Tumor-specific mutations in p53: the acid test. **Nature Medicine**, v. 8, n. 1 p. 21-23, 2002.

HALVORSON, L.M.; ITO, M.; JAMESON, J.L.; CHIN, W.W. Steroidogenic factor-1 and early growth response protein 1 act through two composite DNA binding sites to regulate luteinizing hormone β -subunit gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 24, p. 14712–14720, 1998.

HAMMER, G.D.; INGRAHAM, H.A. Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 20, n. 3, p. 199–223, 1999.

HAMMER, G.D.; PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Transcriptional Regulation of Adrenocortical Development. **Endocrinology**, v. 146, n. 3, p. 1018-1024, 2004.

HAMMES, A.; GUO, J.K.; LUTSCH, G.; LEHESTE, J.R.; LANDROCK, D.; ZIEGLER, U.; GUBLER, M.C.; SCHEDL, A. Two splice variants of the Wilms' tumor 1 gene have distinct functions during sex determination and nephron formation. **Cell**, v. 106, n. 3, p. 319-329, 2001.

HANLEY, N. A.; RAINEY, W.E.; WILSON, D.I.; BALL, S.G.; PARKER, K.L. Expression profiles of SF-1, DAX-1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. **Molecular Endocrinology**, v. 15, n. 1, p. 57-68, 2001.

HARRIS, C.C. p53: at the crossroads of molecular carcinogenesis and risk assessment. **Science**, v. 262, n. 5142, p. 1980-1981, 1993.

HARRIS, H.; MILLER, O.J.; KLEIN, G; WORST, P.; TACHIBANA, T. Suppression of malignancy by cell fusion. **Nature**, v. 223, n. 204, p. 363-368, 1969.

HATANO, O.; TAKAYAMA, K.; IMAI, T.; WATERMAN, M.R.; TAKAKUSU, A.; OMURA, T.; MOROHASHI, K. Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. **Development**, v. 120, n. 10, p. 2787-2797, 1994.

HATANO, O.; TAKAKUSU, A.; NOMURA, M.; MOROHASHI, K. Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Genes to Cells**, v. 1, n. 7, p. 663-671, 1996.

HENGST, L.; REED, S.I. Inhibitors of the Cip/Kip family. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 227, p. 25-41, 1998.

HEMANN, M.T.; ZILFOU, J.T.; ZHAO, Z.; BURGESS, D.J.; HANNON, G.J.; LOWE, S.W. Suppression of tumorigenesis by the p53 target PUMA. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 25, p. 9333-9338, 2004.

HENRY, I.; GRANDJOUAN, S.; COUILLIN, P.; BARICHARD, F.; HUERRE-JEANPIERRE, C.; GLASER, T.; PHILIP, T.; LENOIR, G.; CHAUSSAIN, J.L.; JUNIEN, C. Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 86, n. 9, p. 3247-3251, 1989.

HENRY, I.; JEANPIERRE, M.; COUILLIN, P.; BARICHARD, F.; SERRE, J.L.; JOURNEL, H.; LAMOUREUX, A.; TURLEAU, C.; DE GROUCHY, J.; JUNIEN, C. Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. **Human Genetics**, v. 81, n 3, p. 273–277, 1989.

HENSKE, E. P.; SHORT, M.P.; JOZWIAK, S.; BOVEY, C.M.; RAMLAKHAN, S.; HAINES, J. L.; WIATKOWSKI, D. J. Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. **Annals of Human Genetics**, v. 59, n. 1, p. 25–37, 1995.

HEPPNER, C.; REINCKE, M.; AGARWAL, S.K.; MORA, P.; ALLOLIO, B.; BURNS, A.L.; SPIEGEL, A.M.; MARX, S.J. *MEN1* gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 1, p. 216-219, 1999.

HIROSE, P. F.; CAPELLANNO, A.M.; OLIVEIRA, A. Adrenocortical tumors in children: The Brazilian experience in a single institution. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, 16S, A8506, 2005.

HOEFLICH, A.; FETTSCHER, O.; LAHM, H.; BLUM, W.F.; KOLB, H.J.; ENGELHARDT, D.; WOLF, E.; WEBER, M.M. Overexpression of insulin-like growth factor-binding protein-2 results in increased tumorigenic potential in Y-1 adrenocortical tumor cells. **Cancer Research**, v. 60, n. 4, p. 834-838, 2000.

HOLLSTEIN, M.C.; WILD, C.P.; BLEICHER, F.; CHUTIMATAEWIN, S.; HARRIS, C.C.; SRIVATANAKUL, P.; MONTESANO, R. *p53* mutations and aflatoxin B1 exposure in hepatocellular carcinoma patients from Thailand. **International Journal of Cancer**, v. 53, n. 1, p. 51-55, 1993.

HONDA, S.; MOROHASHI, K.; NOMURA, M.; TAKEYA, H.; KITAJIMA, M.; OMURA, T. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 Gene is a member of the steroid receptor superfamily. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n.10, p. 7494-7502, 1993.

HOSAKA, Y.; RAINWATER, L.M.; GRANT, C.S.; YOUNG, W.F. JR; FARROW, G.M.; VAN HEERDEN, J.A.; LIEBER, M.M. Adrenocortical carcinoma: nuclear deoxyribonucleic acid ploidy studied by flow cytometry. **Surgery**, v. 102, n. 6, p. 1027-1034, 1987.

HOUGH, A.J.; HOLLIFIELD, J.W.; PAGE, D.L.; HARTMANN, W.H. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 72, n. 3, p. 390-399, 1979.

HOULDSWORTH, J.; CHAGANTI, R.S.K. Comparative genomic hybridization: an overview. **American Journal of Pathology**, v. 145, n. 6, p. 1253-1260, 1994.

HOYLE, C.; NARVAEZ, V. ALLDUS, G.; LOVELL-BADGE, R.; SWAIN, A. Dax-1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 4, p. 747-756, 2002.

HUMPHREY, G.B.; PYSHER, T.; HOLCOMBE, J.; GROSS, M.; CHAN, H.; CUSHING, B.; D' ANGIO, G.J.; SCHEIN, P.; LEMERLE, J.; CARNEY, J.A.; RANEY JR., B. Overview on the management of adrenocortical carcinoma (ACC). In : HUMPHREY, G.B.; GRINDEY, G.B.; DEHNER, L.P. *et al.* **Adrenal and endocrine tumors in children**. Adrenal cortical carcinoma and multiple endocrine neoplasia. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984. p. 349-358.

IIDA, A.; BLAKE, K.; TUNNY, T.; KLEMM, S.; STOWASSER, M.; HAYWARD, N.; GORDON, R.; NAKAMURA, Y.; IMAI, T. Allelic losses on chromosome band 11q13 in aldosterone-producing adrenal tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 12, n. 1, p. 73-75, 1995.

IKEDA, Y.; LALA, D.S.; LUO, X.; KIM, E.; MOISAN, M.P.; PARKER, K.L. Characterization of the mouse *FTZ-F1* gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 7, p. 852-860, 1993.

IKEDA, Y.; LUO, X.; ABBUD, R.; NILSON, J.H.; PARKER, K.L. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. **Molecular Endocrinology**, v. 9, n. 4, p. 478-486, 1995.

IKEDA, Y.; SHEN, W.; INGRAHAM, H.A.; PARKER, K.L. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Molecular Endocrinology**, v. 8, n. 5, p. 654-662, 1994.

IKEDA, Y.; SWAIN, A.; WEBER, T.J.; HENTGES, K.E.; ZANARIA, E.; LALLI, E.; TAMAI, K.T.; SASSONE-CORSI, P.; LOVELL-BADGE, R.; CAMERINO, G.; PARKER, K.L. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 10, p. 1261-1272, 1996.

IKEDA, Y.; TAKEDA, Y.; SHIKAYAMA, T.; MUKAI, T.; HISANO, S.; MOROHASHI, K.I. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. **Developmental Dynamics**, v. 220, n. 4, p. 363-376, 2001.

ILVESMAKI, V.; KAHRI, A.I.; MIETTINEN, P. J.; VOUTILAINEN, R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 3, p. 852-858, 1993.

ITO, M.; YU, R.; JAMESON, J. L. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. **Molecular and Cellular Biology**, v. 17, n. 3, p. 1746-1483, 1997.

JAMES, L.A.; KELSEY, A.M.; BIRCH, J.M., VARLEY, J.M. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 2, p. 300-304, 1999.

JOB, J.C. Supra-renais. In: JOB, J.C.; PIERSON, M. **Endocrinologia Pediátrica e Crescimento**. Cap. IV. São Paulo. Edit. Manole, 1980. p. 189-232.

JOENSUU, H.; KLEMI, P.J. DNA aneuploidy in adenomas of endocrine organs. **American Journal of Pathology**, v. 132, n. 1, p. 145-151, 1988.

JOHANNISSON, E. The foetal adrenal cortex in the human. Its ultrastructure at different stages of development and in different functional states. **Acta Endocrinologica**, v. 58, n. 130, p. 1-107, 1968.

JOHNSON, D.W.; QUMSIYEH, M.; BENKHALIFA, M.; MARCHUK, D.A. Assignment of human transforming growth factor-beta type I and type III receptor genes (TGFB1 and TGFB3) to 9q33-q34 and 1p32-p33, respectively. **Genomics**, v. 28, n. 2, p. 356-357, 1995.

JONES, K.A.; FITZGIBBON, J.; WOODWARD, K.J.; GOUDIE, D.; FERGUSON-SMITH, M.A., POVEY, S.; WOLFE, J.; SOLOMON, E. Localization of the retinoid X receptor alpha gene (RXRA) to chromosome 9q34. **Annals of Human Genetics**, v. 57, n. 3, p. 195-201, 1993.

JORDAN, B.K; MOHAMMED, M.; CHING, S.T.; DELOT, E.; CHEN, X.N.; DEWING, P.; SWAIN, A.; RAO, P.N.; ELEJALDE, B.R.; VILAIN, E. Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, n. 5, p. 1102-1109, 2001.

JUAREZ-OCANA, S.; GONZALEZ-MIRANDA, G.; MEJIA-ARANGURE, J.M.; RENDON-MACIAS, M.E.; MARTINEZ-GARCIA MDEL, C.; FAJARDO-GUTIERREZ, A. Frequency of cancer in children residing in Mexico City and treated in the hospitals of the Instituto Mexicano del Seguro Social (1996-2001). **BMC Cancer**. v. 4, n. 1, p. 50-58, 2004.

KANANEN, K.; MARKKULA, M.; MIKOLA, M.; RAINIO, E-M.; McNEILLY, A.; HUHTANIEMI, I. Gonadectomy permits adrenocortical tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin α -subunit promoter/simian virus 40 T-antigen

fusion gene: evidence for negative autoregulation of the inhibin α -subunit gene. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 1667-1677, 1996.

KAWABE, K.; SHIKAYAMA, T.; TSUBOI, H.; OKA, S.; OBA, K.; YANASE, T.; NAWATA, H.; MOROHASHI, K. Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. **Molecular Endocrinology**, v. 13, n. 8, p. 1267-1284, 1999.

KAY, S. Hyperplasia and neoplasia of the adrenal gland. **Pathology Annals**, v. 11, p. 103-139, 1976.

KAMIO, T.; SHIGEMATSU, K.; SOU, H.; KAWAI, K.; TSUCHIYAMA, H. Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. **Human of Pathology**, v. 21, n. 3, p. 277-282, 1990.

KEEGAN, C.E.; HAMMER, G.D. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 13, n. 5, p. 200-208, 2002.

KIM, J.; PRAWITT, D.; BARDEESY, N.; TORBAN, E.; VICANER, C.; GOODYER, P.; ZABEL, B.; PELLETIER, J. The Wilms' tumor suppressor gene (*wt1*) product regulates *Dax-1* gene expression during gonadal differentiation. **Molecular and Cell Biology**, v. 19, n. 3, p. 2289-2299, 1999.

KINGSLEY, D.M. The TGF-beta superfamily: new members, new receptors, and new genetic tests of function in different organisms. **Genes & Development**, v. 8, n. 2, p. 133-146, 1994.

KIRSCHNER, L.S.; CARNEY, J.A.; PACK, S.D.; TAYMANS, S.E.; GIATZAKIS, C.; CHO, Y.S.; CHO-CHUNG, Y.S.; STRATAKIS, C.A. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. **Nature Genetics**, v. 26, n. 1, p. 89-92, 2000.

KJELLMAN, M.; KALLIONIEMI, O.P.; KARHU, R.; HÖÖG, A.; FARNEBO, L.O.; AUER, G.; LASSON, C.; BÄCKDAHL, M. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. **Cancer Research**, v. 56, n. 18, p. 4219-4223, 1996.

KJELLMAN, M.; ROSHANI, L.; THE, B.; KALLIONIEMI, O.; HOOG, A.; GRAY, S.; FARNEBO, L.O.; HOLST, M.; BACKDAHL, M.; LARSSON, C. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 2, p. 730-735, 1999.

KLEIHUES, P.; SCHAUBLE, B.; ZUR HAUSEN, A.; ESTEVE, J.; OHGAKI, H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. **American Journal of Pathology**, v. 150, n. 1, p. 1-13, 1997.

KLOOS, R.T.; GROSS, M.D.; FRANCIS, I.R.; KOROBKIN, M.; SHAPIRO, B. Incidentally discovered adrenal masses. **Endocrine Review**, v. 16, n. 4, p. 460-484, 1995.

KNUDSON, A.G. Two genetic hits (more or less) to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 1, n. 2, p. 157-162, 2001.

KNUUTILA, S.; AUTIO, K.; AALTO, Y. Online access to CGH data of CNA sequence copy number changes. **American Journal of Pathology**, v. 157, n. 2, p. 689-690, 2000.

KO, L.J.; PRIVES, C. p53: puzzle and paradigm. **Genes & Development**, v. 10, n. 9, p. 1054-1072, 1996.

KOBAYASHI, H.; USUI, T.; FUKATA, J.; YOSHIMASA, T.; OKI, Y.; NAKAO, K. Mutation analysis of Gs alpha, adrenocorticotropin receptor and *p53* genes in Japanese patients with adrenocortical neoplasms: including a case of Gs alpha mutation. **Endocrine Journal**, v. 47, n. 4, p. 461-466, 2000.

KOCH, C.A.; PACAK, K.; CHROUSOS, G.P. Genetics of endocrine disease. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 87, n. 12, p. 5367-5384, 2002.

KOUFOS, A.; HANSEN, M.F.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; LAMPKIN, B.C.; CAVENEE, W.K. Loss of heterozygosity in three embryonal tumours suggests a common pathogenetic mechanism. **Nature**, v. 316, n. 6026, p. 330-334, 1985.

KOSKIMIES, P.; LEVALLET, J.; SIPILA, P.; HUHTANIEMI, I.; POUTANEN, M. Murine relaxin-like factor promoter: functional characterization and regulation by transcription factors steroidogenic factor 1 and DAX-1. **Endocrinology**, v. 143, n. 3, p. 909-919, 2002.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 277, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LALA, D.S.; RICE, D.A., PARKER, K.L. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of *fushi tarazu*-factor I. **Molecular Endocrinology**, v. 6, n. 8, p. 1249-1258, 1992.

LALLI, E.; BARDONI, B.; ZAZOPOULOS, E.; WURTZ, J.M.; STROM, T.M.; MORAS, D.; SASSONE-CORSI, P. A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. **Molecular Endocrinology**, v. 11, n. 13, p. 1950-1960, 1997.

LALLI, E.; MELNER, M.H.; STOCCO, D.M.; SASSONE-CORSI, P. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4237-4243, 1998.

LALLI, E.; OHE, K.; HINDELANG, C.; SASSONE-CORSI, P. Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. **Molecular and Cellular Biology**, v. 20, n. 13, p. 4910-1921, 2000.

LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P. DAX-1 and the adrenal cortex. **Current Opinion in Endocrinology & Diabetes**, v. 6, p. 185-190, 1999.

LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P. DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 8, p. 1445-1453, 2003.

LATRONICO, A.C.; CHROUSOS, G.P. Extensive personal experience adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 5, p. 1317-1324, 1997.

LATRONICO, A.C.; MENDONÇA, B.B. Adrenocortical tumors - new perspectives. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, p. 642-646, 2004.

LATRONICO, A.C.; MENDONÇA, B.B.; BIANCO, A.C.; VILLARES, S.M.; LUCON, M.A.; NICOLAU, W.; WAJCHENBERG, B.L. Calcium-dependent protein kinase-C activity in human adrenocortical neoplasms, hyperplastic adrenals, and normal adrenocortical tissue. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 79, n. 3, p. 736-739, 1994.

LATRONICO, A.C.; PINTO, E.M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M.C.; MARTIN, R.M.; ZERBINI, M.C.; LUCON, A.M.; MENDONÇA, B.B. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 86, n. 10, p. 4970-4973, 2001.

LATRONICO, A.C.; REINCKE, M.; MENDONÇA, B.B.; ARAI, K.; MORA, P.; ALLOLIO, B.; WAJCHENBERG, B.L.; CHROUSOS, G.P.; TSIGOS, C. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 3, p. 875-877, 1995.

LEE, A.S.; GALEA, C.; DiGIAMMARINO, E.L.; JUN, B.; MURTI, G.; RIBEIRO, R.C.; ZAMBETTI, G.; SCHULTZ, C.P.; KRIWACKI, R.W. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. **Journal of Molecular Biology**, v. 327, n. 3, p. 699-709, 2003.

LEFRANÇOIS-MARTINEZ, A.-M.; BERTHERAT, J.; VAL, P.; TOURNAIRE, C.; GALLO-PAYET, N.; HYNDMAN, D.; VEYSSIÈRE, G.; BERTAGNA, X.; JEAN, C.; MARTINEZ, A. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 89, p. 3010-3019 2004

LEHMANN, S.G.; LALLI, E.; SASSONE-CORSI, P. X-linked adrenal hypoplasia congenita is caused by abnormal nuclear localization of the DAX-1 protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 99, n. 12, p. 8225-8230, 2002.

LENGAUER, C.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B. Genetic instabilities in human cancers. **Nature**, v. 396, n. 6712, p. 643-649, 1998.

LEWINSKY, B.S.; GRIGOR, K.M.; SYMINGTON, T.; NEVILLE, A.M. The clinical and pathologic features of 'non-hormonal' adrenocortical tumors: Report of twenty new cases and review of literature. **Cancer**, v. 33, n. 3, p. 778-790, 1974.

LEWIS, K.A.; GRAY, P. C.; BLOUNT, A.L.; MACCONELL, L.A.; WIATER, E.; BILEZIKJIAN, L.M.; VALE, W. Betaglycan binds inhibin and can mediate functional antagonism of activin signalling. **Nature**, v. 404, n. 6776, p. 411-414, 2000.

LI, Y.; JENKINS, C.W.; NICHOLS, M.A.; XIONG, Y. Cell cycle expression and p53 regulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21. **Oncogene**, v. 9, n. 8, p. 2261-2268, 1994.

LIGHT, K.; JENKINS, P. J.; WEBER, A.; PERRET, C.; GROSSMAN, A.; PISTORELLO, M.; ASA, S.I.; CLAYTON, R.N.; CLARK, A.J. Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? **Life Science**, v. 56, n. 18, p. 1523-1527, 1995.

LIN, S.R.; LEE, Y.J.; TSAI, J.H. Mutations in the *p53* gene in human functional neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 2, p. 483-491, 1994.

LIN, S.R.; TSAI, J.H.; YANG, Y.C.; LEE, S.C. Mutations of *K-ras* oncogene in human adrenal tumors in Taiwan. **British Journal of Cancer**, v. 77, n. 7, p. 1060-1065, 1998 (a).

LIN, S.R.; YANG, Y.; TSAI, J.H.; HSU, C. Alterations of *RET* oncogene in human adrenal tumors. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 89, n. 6, p. 634-636, 1998 (b).

LIOU, L.S.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. Review and recent innovations. **Urology Clinics of North America**, v. 27, n. 3, p. 403-421, 2000.

LITTLE, M.; WELLS, C. A clinical overview of *WT1* gene mutations. **Human Mutation**, v. 9, n. 3, p. 209-225, 1997.

LIU, J.; KAHRI, A.I.; HEIKKILA, P.; VOUTILAINEN, R. Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, *p53*, *IGF2*, and *H19*, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 6, p. 1766-1771, 1997.

IVINGSTONE, L.R.; WHITE, A.; SPROUSE, J.; LIVANOS, E.; JACKS, T.; TLSTY, T.D. Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. **Cell**, v. 70, n. 6, p. 923-935, 1992.

LONGUI, C.A.; LEMOS-MARINI, S.H.; FIGUEIREDO, B.; MENDONÇA, B.B.; CASTRO, M.; LIBERATORE, R JR; WATANABE, C.; LANCELLOTTI, C.L.; ROCHA, M.N.; MELO, M.B.; MONTE, O.; CALLIARI, L.E.; GUERRA-JUNIOR, G.; BAPTISTA, M.T.; SBRAGIA-NETO, L.; LATRONICO, A.C.; MOREIRA, A.; TARDELLI, A.M.; NIGRI, A.; TAYMANS, S.E.; STRATAKIS, C.A. Inhibin alpha-subunit (*INHA*) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from *TP53* R337H mutation heterozygote carriers. **Journal of Medical Genetics**, v. 41, n. 5, p. 354-359, 2004.

LOPEZ, D.; SHEA-EATON, W.; SANCHEZ, M.D.; MCLEAN, M.P. DAX-1 represses the high-density lipoprotein receptor through interaction with positive regulators sterol regulatory element-binding protein-1a and steroidogenic factor-1. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5097-5106, 2001.

LUMACHI, F.; BORSATO, S.; BRANDES, A.A.; BOCCAGNI, P.; TREGNAGHI, A.; ANGELINI, F.; FAVIA, G. Fine-needle aspiration cytology of adrenal masses in noncancer patients: clinicoradiologic and histologic correlations in functioning and nonfunctioning tumors.. **Cancer**, v. 93, n. 5, p. 323-329, 2001.

LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, v. 77, n. 4, p. 481-490, 1994.

LYONS, J.; LANDIS, C.A.; HARSH, G.; VALLAR, L.; GRUNEWALD, K.; FEICHTINGER, H.; DUH, Q.Y.; CLARK, O.H.; KAWASAKI, E.; BOURNE, H.R. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science**, v. 249, n. 4969, p. 655-659, 1990.

MALKIN, D.; LI, F.P.; STRONG, L.C.; FRAUMENI JR, J.F.; NELSON, C.E.; KIM, D.H., KASSEL,J.; GRYKA,M.A.; BISCHOFF, F.Z.; TAINSKY, M.A. Germ line *p53* mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v. 250, n. 4985, p. 1233-1238, 1990.

MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835-839, 1995.

MARIGO, C.; MULLER, H.; DAVIES, J. N. P. Survey of cancer in children admitted to a brazilian charity hospital. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 43, n. 6. p1231-1240, 1969.

MASSION, P. P.; TAFLAN, P. M.; RAHMAN, S.M.J.; YILDIZ, P.; SHYR, Y. EDGERTON, M.E.; WESTFALL, M.D., ROBERTS, J.R.; PIETENPOL, J.A.; CARBONE, D. P.; GONZALEZ, A.L.. Significance of *p63* amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. **Cancer Research**, v. 63, n. 21, p. 7113-7121, 2003

MATZUK, M.M.; FINEGOLD, M.J.; SU, J.G.J.; AARON, J.W.H.; BRADLEY, A. α -inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. **Nature**, v. 360, n. 26, p. 313-319, 1992.

MATZUK, M.M.; FINEGOLD, M.J.; MATHER, J.P.; KRUMMEN, L., LU, H.; BRADLEY, A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 19, p. 8871-8821, 1994.

MCCLUGGAGE, W.G.; BURTON, J.; MAXWELL, P.; SLOAN, J.M. Immunohistochemical staining of normal, hyperplastic, and neoplastic adrenal cortex with a monoclonal antibody against alpha inhibin. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, n. 2, p. 114-116, 1998.

MENDONÇA, B.B.; LUCON, A. M.; MENEZES, C.A.V.; SALDANHA, L.B.; LATRONICO, A.C.; ZERBINI, C.; MADUREIRA, G.; DOMENICE, S.; ALBERGARIA, M.A.P.; CAMARGO, M.H.A.; HALPERN, A.; LIBERMAN, B.; ARNHOLD, I.J.P.; BLOISE, W.; ANDRIOLO, A.; NICOLAU, W.; SILVA, F.A. Q.; WROCLASKI, E.; ARAP, S.; WAJCHENBERG, B.L. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. **Journal of Urology**, v. 154, n. 6, p. 2004-2009, 1995.

MESIANO, S.; COULTER, C.L.; JAFFE, R.B. Localization of cytochrome P450 cholesterol side chain cleavage, cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase, and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase isomerase steroidogenic enzymes in the human and rhesus fetal adrenal gland: reappraisal of functional zonation. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1184–1189, 1992.

MESIANO, S.; JAFFE, R.B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 378-403, 1997.

MEUNIER, H.; RIVIER, C.; EVANS, R.M.; VALE, W. Gonadal and extragonadal expression of inhibin alpha, beta A, and beta B subunits in various tissues predicts diverse functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, n. 1, p. 247-251, 1988.

MICHAEL, M.D.; KILGORE, M.W.; MOROHASHI, K.; SIMPSON, E.R. Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. **Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 22, p. 13561-13566, 1995.

MICHALKIEWICZ, E.L.; SANDRINI, R.; BUGG, M.F.; CRISTOFANI, L.; CARAN, E.; CARDOSO, A.M.; DE LACERDA, L.; RIBEIRO, R.C. Clinical characteristics of small functional adrenocortical tumors in children. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 28, n. 3, p. 175-178, 1997.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E.C.; CARAN, E.; OLIVEIRA-FILHO, A.G.; MARQUES, R.; PIANOVSKI, M.A.; LACERDA, L.; CRISTOFANI, L.M.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; RIBEIRO, R.C. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 5, p. 838-845, 2004.

MIKOLA, M.; KERO, J.; NILSON, J.H.; KERI, R.A.; POUTANEN, M.; HUHTANIEMI, I. High levels of luteinizing hormone analog stimulate gonadal and adrenal tumorigenesis in mice transgenic for the mouse inhibin- α -subunit promoter/Simian virus 40 T-antigen fusion gene. **Oncogene**, v. 22, n. 21, p. 3269-3278, 2003.

MIZUSAKI, H.; KAWABE, K.; MUKAI, T.; ARIYOSHI, E.; KASAHARA, M.; YOSHIOKA, H.; SWAIN, A.; MOROHASHI, K. *Dax-1* (dosage-sensitive Sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by Wnt4 in the female developing gonad. **Molecular Endocrinology**, v. 17, n. 4, p. 507-519, 2003.

MITANI, F.; MUKAI, K.; MIYAMOTO, H.; SUEMATSU, M.; ISHIMURA, Y. The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1619, n. 3, p. 317-324, 2003.

MOORE, A.W.; MC INNES, L.; KREIDBERG, J.; HASTIE, N. D.; SCHEDL, A. YAC complementation shows a requirement for Wt1 in the development of epicardium, adrenal gland and throughout nephrogenesis. **Development**, v. 126, n. 9, p. 1845-1857, 1999.

MOROHASHI, K-I.; ZANGER, U.M.; HONDA, S.I.; HARA, M.; WATERMAN, M.R.; OMURA, T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Molecular Endocrinology**, v. 7, n. 9, p. 1196-1204, 1993.

MOUL, J.W.; BISHOFF, J.T.; THEUNE, S.M.; CHANG, E.H. Absent ras gene mutations in human adrenal cortical neoplasms and pheochromocytomas. **Journal of Urology**, v. 149, n. 6, p. 1389-1394, 1993.

MUNRO, L.M.A.; KENNEDY, A.; McNICOL, A.M. The expression of inhibin/activin subunits in the human adrenal cortex and its tumours. **Journal of Endocrinology**, v. 161, n. 2, p. 341-347, 1999.

MUSCATELLI, F.; STROM, T.M.; WALKER, A.P.; ZANARIA, E.; RÉCAN, D.; MEINDL, A.; BARDONI, B.; GUIOLI, S.; ZEHETNER, G.; RABL, W.; SCHWARTZ, H.P.; KAPLAN, J.C.; CAMERINO, G.; MELTINGER, T. MONACO, A.P. Mutations in the *DAX-1* gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 672-676, 1994.

NACHTIGAL, M.W.; HIROKAWA, Y.; ENYEART-VANHOUTEN, D.L.; FLANAGAN, J.N.; HAMMER, G.D.; INGRAHAM, H.A. Wilms'tumor 1 and DAX-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 445-454, 1998.

NEBLETT, W.W.; FREXES-STEED, M.; SCOTT JR., H.W. Experience with adrenocortical neoplasms in childhood. **American Surgery**, v. 53, n. 3, p. 117-125, 1987.

NEW, M.I.; DEL BAZO, P.; CRAWFORD, C.; SPEISER, P.W. The adrenal cortex. In: KAPLAN, S.A. **Clinical Pediatric Endocrinology**, 2 ed., cap. 6, Philadelphia, P. A.: W.B. Saunders, 1990, p. 181-234.

NISHI, Y.; HAJI, M.; TAKAYANAGI, R.; YANASE, T.; IKUYAMA, S.; NAWATA, H. In vivo and in vitro evidence for the production of inhibin-like immunoreactivity in human adrenocortical adenomas and normal adrenal glands: relatively high secretion from adenomas manifesting Cushing's syndrome. **European Journal of Endocrinology**, v. 132, n. 3, p. 292-299, 1995.

OBA, K.; YANASE, T.; NOMURA, M.; MOROHASHI, K.; TAKAYANAGI, R.; NAWATA, H. Structural characterization of human Ad4BP (*SF-1*) gene. **Biochemical and Biophysical Research Communication**. v. 226, n. 1, p. 261-267, 1996.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HEITZ, P.U. *p53* mutations in sporadic adrenocortical tumors. **International Journal of Cancer**, v. 54, n. 3, p. 408-410, 1993.

OMIM - On Line Mendelian Inheritance in Man - disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=OMIM&cmd=search&term=omim> . Acesso em 02 julho 2005.

ORTH, D.N.; KOVACS, W.J.; DEBOLD, R. The adrenal cortex. In: **Willians Textbook of Endocrinology**, ed by Wilson JD & Foster DW. WB Saunders Company, p 389-619, 8 ed., 1992.

OZISIK, G.; ACHERMANN, J.C.; MEEKS, J.J.; JAMESON, J.L. SF-1 in the development of the adrenal gland and gonads. **Hormone Research**, v. 59, n. 1, p. 94-98, 2003.

PARKER, K. L.; RICE, D. A.; LALA, D. S.; IKEDA, Y.; LUO, X.; WONG, M.; BAKKE, M.; ZHAO, L.; FRIGERI, C.; HANLEY, N. A.; STALLINGS, N.; SCHIMMER, B.P. Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 19-36, 2002.

PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. **Endocrine Reviews**, v. 18, n. 3, p. 361-377, 1997.

PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Genetics of the development and function of the adrenal cortex. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v. 2, n. 3, p. 245-252, 2001.

PARKIN, D.M.; KRAMÁROVÁ. E.; DRAPER, G.J., MASUYER E, MICHAELIS J, NEGLIA J, QURESHI S, STILLER CA editors. **International Incidence of Childhood Cancer**, vol. II, IARC Scientific Publication, n° 144, 1998. 500 p.

PATI, D.; HADDAD, B.R.; HAEGELE, A.; THOMPSON, H.; KITTRELL, F.S.; SHEPARD, A.; MONTAGNA, C.; ZHANG, N.; GE, G.; OTTA, S.K.; MCCARTHY, M.; ULLRICH, R.L.; MEDINA, D. Hormone-induced chromosomal instability in p53-null mammary epithelium. **Cancer Research**, v. 64, n. 16, p. 5608-5616, 2004.

PATIL, K.K.; RANSLEY, P. G.; MCCULLAGH, M.; MALONE, M.; SPITZ, L. Functioning adrenocortical neoplasms in children. **BJU International**, v. 89, n. 6, p. 562-565, 2002

PEREIRA, R.M.; MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.C.; PIANOVSKI, M.; FRANÇA, S.N.; BOGUZEWSKI, M.C.S.; COSTA, O.; CAT, I.; DE LACERDA, L.; SANDRINI, R. Tumores do Córtex Adrenal na Infância. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 651-658, 2004.

PETER, M.; DUBUIS, J.M. Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n 3, p. 14-20, 2000.

PIANOVSKI, M.D.; CAVALLI, L.; FIGUEIREDO, B.C.; HADDAD, B.; LIMA, C.S.; RIBEIRO, R.C.; MICHALKIEVICZ, E.; ZAMBETTI, G.; LALLI, E. SF-1 gene amplification and protein expression in childhood adrenocortical tumor. Submetido para publicação, 2005.

PIANOVSKI, M.D.; MALUF, E.M.C.P.; CARVALHO, D.S., RIBEIRO, R.C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; BOFFETTA, P. FIGUEIREDO, B.C. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**. Submetido para publicação, 2005.

PILON, C.; PISTORELLO, M.; MOSCON, A.; ALTAVILLA, G.; PAGOTTO, U.; BOSCARO, M.; FALLO, F.J. Inactivation of the *p16* tumor suppressor gene in adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 8, p. 2776-2779, 1999.

PINKEL, D.; STRAUME, T.; GRAY, J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 9, p. 2934-2938, 1986.

PINTO, E.M.; BILLERBECK, A.E.C.; VILLARES, M.C.B.F.; DOMENICE, S.; MENDONÇA, B.B.; LATRONICO, A.C. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor *p53* in brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 48, n. 5, p. 647-650, 2004.

RAINEY, W.E.; CARR, B.R.; WANG, Z.N.; PARKER, C.R. JR. Gene profiling of human fetal and adult adrenals. **Journal of Endocrinology**, v. 171, n. 2, p. 209-215, 2001.

RAMAYYA, M.S.; ZHOU, F.; KINO, T.; SEGARS, J.H.; BONDY, C.A.; CHROUSOS, G.P. Steroidogenic Factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: northern blot and *in situ* hybridization studies. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 6, p. 1799-1806, 1997.

REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W.; CHROUSOS, G.P. No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 77, n. 5, p. 1419-1422, 1993.

REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W.H.; MASTORAKOS, G.; ALLOLIO, B.; LINEHAN, H.M.; CHROUSOS, G.P. *p53* mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 78, n. 3, p. 790-794, 1994.

REINCKE, M.; MORA, P.; BEUSCHLEIN, F.; ARLT, W.; CHROUSOS, G.P.; ALLOLIO, B. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 9, p. 3054-3058, 1997.

REINCKE, M.; REINCKE, M.; BEUSCHLEIN, F.; LALLI, E.; ARLT, W.; VAY, S.; SASSONE-CORSI, P.; ALLOLIO, B. DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83, n. 7, p. 2597-2600, 1998.

REINCKE, M.; WACHENFELD, C.; MORA, P.; THUMSER, A.; JAURSCHANCKE, C.; ABDELHAMID, S.; CHROUSOS, G.P; ALLOLIO, B. *p53* mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 81, n. 10, p. 3636-3638, 1996.

REUTENS, A.T.; ACHERMANN, J.C.; ITO, M.; ITO, M.; GU, W.X.; HABIBY, R.L.; DONOHOUE, P. A.; PANG, S.; HINDMARSH, P. C.; JAMESON, J.L. Clinical and functional effects of mutations in the *DAX-1* gene in patients with adrenal hypoplasia congenital. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 2, p. 504-511, 1999.

RIBEIRO, R.C.; CARAN, E.; FIGUEIREDO, B.; De LACERDA, L.; HAYS, P.; MICHALKIEWICZ, E.L.; MIRANDA, E.; MARQUES, R.P.; PIANOVSKI, M.D.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. **International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry**. Disponível em www.stjude.org/ipactr. Acesso em 20 maio 2005.

RIBEIRO, R.C.; FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 8, p. 1117-1126, 2004.

RIBEIRO, R.C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.; ZAMBETTI, G.P.; MICHALKIEWICZ, E.; LAFFERTY, A.R.; DeLACERDA, L.; RABIN, M.; CRADEWLL, C.; SAMPAIO, G.; CAT, I.; STRATAKIS, C.A.; SANDRINI, R. An inherited *p53* mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

RIBEIRO, R.C.; SANDRINI NETO, R.; SCHELL, M. J.; LACERDA, L.; SAMPAIO, G.A.; CAT, I. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **Journal of Clinical Oncology**, v. 8, n. 1, p. 67-74, 1990.

RICE, D.A.; MOUW, A. R.; BOGERD, A.; PARKER, K.L. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. **Molecular Endocrinology**, v. 5, n. 10, p. 1552-1561, 1991.

RILIANAWATI, T.P.; KERO, J.; ZHANG, F.P.; RAHMAN, N.; KANANEN, K.; HUHTANIEMI, I. Direct luteinizing hormone action triggers adrenocortical tumorigenesis in castrated mice transgenic for the murine inhibin α -subunit promoter/simian virus 40 T-antigen fusion gene. **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 6, p. 801-809, 1998.

RISBRIDGER, G.P.; SCHMITT, J.F.; ROBERTSON, D.M. Activins and inhibins in endocrine and other tumors. **Endocrine Reviews**, v. 22, n. 6, p. 836-858, 2001.

RODRIGUEZ-GALINDO, C.; FIGUEIREDO, B.C.; ZAMBETTI, G.P.; RIBEIRO, R.C. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatric Blood & Cancer**. 2005 Mar 3; [Epub ahead of print]

RUSSELL, A.J.; SIBBALD, J.; HAAK, H.; KEITH, W.N.; McNICOL, A.M. Increasing genome instability in adrenocortical carcinoma progression with involvement of chromosomes 3,9 and X at the adenoma stage. **British Journal of Cancer**, v. 81, n. 4, p. 684-689, 1999.

SAAD F, ALDRICH T. Pediatric cancer in Kentucky: good news. **Journal of the Kentucky Medical Association**, v. 102, n. 10, p. 483-487, 2004.

SACHSE, R.; SHAO, X.J.; RICO, A.; FINCKH, U.; ROLFS, A.; REINCKE, M.; HENSEN, J. Absence of angiotensin II type 1 receptor gene mutations in human adrenal tumors. **European Journal of Endocrinology**, v. 137, n. 3, p. 262-266, 1997.

SANDRINI, F.; VILLANI, D.P.; TUCCI, S.; MOREIRA, A.C.; DE CASTRO, M.; ELIAS, LL Inheritance of R337H *p53* gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Hormone and Metabolic Research**, v. 37, n. 4, p. 231-235, 2005.

SANDRINI NETO, R. **Tumor do córtex da supra-renal na infância. Estudo de 58 pacientes.** Curitiba, 1993. 307 f. Tese (Concurso de Professor Titular de Pediatria) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

SANDRINI R, RIBEIRO RC, De LACERDA L: Childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 82, n. 7, p. 2027-2031, 1997.

SASANO, H.; SHIZAWA, S.; SUZUKI, T.; TAKAYAMA, K.; FUKAYA, T.; MOROHASHI, K.; NAGURA, H. Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 80, n. 8, p. 2378-2380, 1995.

SASANO, H.; SUZUKI, T.; NAGURA, H.; NISHIKAWA, T. Steroidogenesis in human adrenocortical carcinoma: biochemical activities, immunohistochemistry, and in situ hybridization of steroidogenic enzymes and histopathologic study in nine cases. **Human of Pathology**, v. 24, n. 4, p. 397-404, 1993.

SASANO, H.; SUZUKI, T.; SHIZAWA, S.; KATO, K.; NAGURA, H. Transforming growth factor α , epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Modern Pathology**, v. 7; n. 7, p. 741-746, 1994.

SAXON, P. J.; SRIVATSAN, E.S.; STANBRIDGE, E.J. Introduction of human chromosome 11 via microcell transfer controls tumorigenic expression of HeLa cells. **EMBO Journal**, v. 5, n. 13, p. 3461-3466, 1986.

SCHEDL. A.; HASTIE, N. Multiple roles for the Wilms tumor suppressor gene, *Wt1* in genitourinary development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, n. 1-2 p. 65-69, 1998.

SCHUBERT, B.; FASSNACHT, M.; BEUSCHLEIN, F.; ZENKERT, S.; ALLOLIO, B.; REINCKE, M. Angiotensin II type 1 receptor and ACTH receptor expression in human adrenocortical neoplasms. **Clinical Endocrinology**, v. 54, n. 5, p. 627-632, 2001.

SCHULTE, K.M.; HEINZE, M.; MENGEL, M.; SIMON, D.; SCHEURING, S.; KOHRER, K.; ROHER, H.D. *MEN 1* gene mutations in sporadic adrenal adenomas. **Human Genetics**, v. 105, n. 6, p. 603-610, 1999.

SCHULTE, K.M.; HEINZE, M.; MENGEL, M.; SCHEURING, S.; KOHRER, K.; ROHER, H.D. Complete sequencing and mRNA expression analysis of the *MEN-1* gene in adrenal myelolipoma. **Hormone and Metabolic Research**, v. 32, n. 5, p. 169-173, 2000.

SEEGER, R.C.; BRODEUR, G.M.; SATHER, H.; DALTON, A.; SIEGEL, S.E.; WONG, K.Y.; HAMMOND, D. Association of multiple copies of the *N-myc* oncogene with rapid progression of neuroblastomas. **New England Journal of Medicine**, v. 313, n. 18, p. 1111-1116, 1985.

SHAPIRO, D.B.; PAPPALARDO, A.; WHITE, B.A.; PELUSO, J.J. Steroidogenic factor-1 as a positive regulator of rat granulosa cell differentiation and a negative regulator of mitosis. **Endocrinology**, v. 137, n. 4, p. 1187-1195, 1996.

SHERR, C.J.; ROBERTS, J.M. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. **Genes Development**, v. 9, n. 10, p. 1149-1163, 1995.

SHIBATA, H.; IKEDA, Y.; MUKAI, T.; MOROHASHI, K.; KURIHARA, I.; ANDO, T.; SUZUKI, T.; KOBAYASHI, S.; MURAI, M.; SAITO, I.; SARUTA, T. Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 74, n. 1-2, p. 206-216, 2001.

SIEMIENSKI, K.; PETERS, N.; SCHEURICH, P.; WAJANT, H. Organization of the human tumour necrosis factor receptor-associated factor 1 (*TRAF1*) gene and mapping to chromosome 9q33-34. **Gene**, v. 195, n. 1, p. 35-39, 1997.

SKOGSEID, B.; LARSSON, C.; LINDGREN, P. G.; KVANTA, E.; RASTAD, J.; THEODORSSON, E.; WIDE, L.; WILANDER, E.; OBERG, K. Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 75, n. 1, p. 76-81, 1992.

SLOMOVITZ, B.M.; BRAODDUS, R.R.; BURKE, T.W.; SNEIGE, N.; SOLIMAN, P.T.; WU, W.; SUN, C.C.; MUNSELL, M.F.; GERSHENSON, D.M.; LU, K.H. Her-2/neu overexpression and amplification in uterine papillary serous carcinoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 22, n. 15, p. 3126-3132, 2004.

SMITH, M.A.; RIES, L.A.G. Childhood cancer: incidence, survival, and mortality. In: PIZZO, P. A. & POPLACK, D.G. **Principles and Practice of Pediatric Oncology**. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hon Kong, Sydney, Tokyo, 2002, p. 1-12.

SPENCER, S.J.; MESIANO, S.; JAFFE, R.B. Programmed cell death in remodelling of the human fetal adrenal cortex: possible role of activin-A. **Program of the 42nd Annual Meeting of the Society for Gynecological Investigation**, Chicago, IL, 1995, Abstract O27.

SPENCER, S.J.; RABINOVICI, J.; MESIANO, S.; GOLDSMITH, P.C.; JAFFE, R.B. Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. **Journal of Clinical Investigation**, v. 90, n. 1, p. 142-149, 1992.

SPIX, C.; AARELEID, T.; STILLER, C.; MAGNANI, C.; KAATSCH, P.; MICHAELIS, J. Survival of children with neuroblastoma. time trends and regional differences in Europe, 1978--1992. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 6, p. 722-729, 2001.

SREDNI, S.T.; ZERBINI, M.C.; LATORRE, M.R.; ALVES, V.A.. *p53* as a prognostic factor in adrenocortical tumors of adults and children. **Brazilian Journal Medical of Biology Research**, v. 36, n. 1, p. 23-27, 2003.

STEWART, D.R.; JONES, P.H.M.; JOLLEYS, A. Carcinoma of the adrenal gland in children. **Journal of Pediatric Surgery**, v. 9, n. 1, p. 59-67, 1974.

STILLER, C.A.; PARKIN, D.M. Geographic and ethnic variations in the incidence of childhood cancer. **British Medical Bulletin**, v. 52, n. 4, p. 682-703, 1996.

STOJADINOVIC, A.; GHOSSEIN, R.A.; HOOS, A.; NISSAN, A.; MARSHALL, D.; DUDAS, M.; CORDON-CARDO, C.; JAUQUES, D.P.; BRENNAN, M.F. Adrenocortical carcinoma: clinical, morphologic, and molecular characterization. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 4, p. 941-950, 2002.

SUZUKI, T.; KASAHARA, M.; YOSHIOKA, H.; MOROHASHI, K.; UMESONO, K. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 e LRH-1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 23, n. 1, p. 238-249, 2003.

SWAIN, A.; NARVAEZ, V.; BURGOYNE, P.; CAMERINO, G.; LOVELL-BADGE, R. Dax1 antagonizes Sry action in mammalian sex determination. **Nature**, v. 391, n. 6669, p. 761-767, 1998.

SWAIN, A.; ZANARIA, E.; HACKER, A.; LOVELL-BADGE, R.; CAMERINO, G. Mouse Dax1 expression is consistent with a role in sex determination as well as in adrenal and hypothalamus function. **Nature Genetics**, v. 12, n. 4, p. 404-409, 1996.

TAKETO, M.; PARKER, K.L.; HOWARD, T.A.; TSUKIYAMA, T.; WONG, M.; NIWA, O.; MORTON, C.C.; MIRON, P.M.; SELDIN, M.F. Homologs of *Drosophila Fushi-Tarazu* factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. **Genomics**, v. 25, n. 2, p. 565-567, 1995.

TAMAI, K.T., MONACO, L.; ALASTALO, T.P.; LALLI, E.; PARVINEN, M.; SASSONE-CORSI, P. Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. **Molecular Endocrinology**, v. 10, n. 12, p. 1561-1569, 1996.

TANABE, A.; NARUSE, M.; ARAI, K.; NARUSE, K.; YOSHIMOTO, T.; SEKI, T.; IMAKI, T.; MIYAZAKI, H.; ZENG, Z.P.; DEMURA, R.; DEMURA, H. Gene expression and roles of angiotensin II type 1 and type 2 receptors in human adrenals. **Hormone and Metabolic Research**, v. 30, n. 8, p. 490-495, 1998.

TEINTURIER, C.; PAUCHARD, M.S.; BRUGIERES, L.; LANDAIS, P.; CHAUSSAIN, J.L.; BOUGNERES, P.F. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. **Medical and Pediatric Oncology**, v. 32, n. 2, p. 106-111, 1999.

TERRACINI, B.; COEBERGH, J.W.; GATTA, G.; MAGNANI, C.; STILLER, C.; VERDECCHIA, A.; ZAPPONE, A. Childhood cancer survival in Europe: an overview. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 6, p. 810-816, 2001.

TOWBIN, H.; STAEBELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 76, n. 9, p. 4350-4354, 1979.

TSUKYAMA, T.; UEDA, H.; HIROSE, S.; NIWA, O. Embryonal long terminal repeat binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. **Molecular and Cellular Biology**, v. 12, n. 3, p. 1286-1291, 1992

UTTLEY, W.S. Familial congenital adrenal hypoplasia. **Archives of Disease in Childhood**, v. 43, n. 232, p. 724-730, 1968.

VAL, P.; LEFRANÇOIS-MARTINEZ, A.M.; VEYSSIERE, G.; MARTINEZ, A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nuclear Receptors**, v. 1, n. 1, p. 8-31, 2003

VAN SLOOTEN, H.; SCHABERG, A.; SMEENK, D.; MOOLENAAR, A. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer**, v. 55, n. 4, p. 766-773, 1985.

VARLEY, J.M.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M.; JAMES, L.A.; MARGISON, G.P.; FORSTER, G.; EVANS, D.G.; HARRIS, M.; KELSEY, A.M.; BIRCH, J.M. Are there low-penetrance *TP53* Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. **American Journal of Human Genetics**, v. 65, n. 4, p. 995-1006, 1999.

- VASSILOPOULOU-SELLIN, R.; SCHULTZ, P.N. Adrenocortical carcinoma. Clinical outcome at the end of the 20th century. **Cancer**, v. 92; n. 5, p. 1113-1121, 2001.
- VATHAIRE, C.C.; DE VATHAIRE, F.; VU, B.L.; GLEIZE, L.; SUN, L.Y.; GESTAS, P.; PAAOFAITE, J.; PASCHE, J.; CHAMPENOIS, S.; LHOUMAU, F.; LAUDON, F. Childhood malignancies in French Polynesia during the 1985-1995 period. **Tropical Medicine and International Health**. v. 9, n. 9, p. 1005-1011, 2004.
- VIERHAPPER, H. Adrenocortical tumors: clinical symptoms and biochemical diagnosis. **European Journal of Radiology**, v. 41, n. 2, p. 88-94, 2002.
- VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. The multistep nature of cancer. **Trends in Genetics**, v. 9, n. 4, p. 138-141, 1993
- VOUTILAINEN, R.; ERAMAA, M.; RITVOS, O. Hormonally regulated inhibin gene expression in human fetal and adult adrenals. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 73, n. 5, p. 1026-1030, 1991.
- WAJCHENBERG, B.L.; ALBERGARIA PEREIRA, M.A.; MEDONÇA, B.B.; LATRONICO, A.C.; CAMPOS CARNEIRO, P.; ALVES, V. A.; ZERBINI, M.C.; LIBERMAN, B.; CARLOS GOMES, G.; KIRSCHNER, M.A.. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, v. 88, n. 4, p. 711-736, 2000.
- WACHENFELD, C. BEUSCHLEIN, F.; ZWEMANN, O.; MORA, P.; FASSNACHT, M.; ALLOLIO, B.; REINCKE, M. Discerning malignancy in adrenocortical tumors: are molecular markers useful? **European Journal of Endocrinology**, v. 145, n. 3, p. 335-341, 2001.
- WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 12, n. 1, p. 22-29, 2002.
- WANG, Z.J.; JEFFS.B.; ITO, M.; ACHERMANN, J.C.; YU, R.N.; HALES, D.B.; JAMESON, L. Aromatase (Cyp 19) expression is up-regulated by targeted disruption of *Dax 1*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 98, n. 14, p. 7988-7993, 2001.
- WATERHOUSE, J.; MUIR, C.S.; SHANMUGARATNAM, K.; POWELL, J. eds. (1982) **Cancer Incidence in Five Continents**, vol. IV (IARC Scientific Publications, n. 42), Lyon, International Agency for Research on Cancer.
- WEATHERBY, R.P.; CARNEY, J.A. Pathologic features of childhood adrenocortical tumors. In: HUMPRHEY, G.B.; GRINDEY, G.B.; DEHNER, L.P. et al. **Adrenal and endocrine tumors in children**. Adrenal cortical carcinoma and multiple endocrine neoplasia. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984, p. 239-248.

WEBER, M.M.; FOTTNER, C.; WOLF, E. The role of the insulin-like growth factor system in adrenocortical tumourigenesis. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 30, n. 3, p. 69-75, 2000.

WEI, X.; SASAKI, M.; HUANG, H.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor 1, regulates neuronal nitric oxide synthase gene expression in pituitary gonadotropes. **Molecular Endocrinology**, v. 16, n. 12, p. 2828–2839, 2002.

WEINSTEIN, L.S.; SHENKER, A.; GEJMAN, P.V.; MERINO, M.J.; FRIEDMAN, E.; SPIEGEL, A.M. Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 325, n. 24, p. 1688-1695, 1991.

WEISS, A.W.; ALDAPE, K.; MOHAPATRA, G.; FEUERSTEIN, B.G.; BISHOP, J.M. Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. **EMBO Journal**, v. 16, n. 11, p. 2985-2995, 1997.

WEISS, L.M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 8, n. 3, p. 163-169, 1984.

WEISS, L.M.; MEDEIROS, L.J., VICKERY, A.L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 13, n. 3, p. 202-206, 1989.

WILKIN, F.; GAGNE, N.; PAQUETTE, J.; OLIGNY, L.L.; DEAL, C. Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 85, n. 5, p. 2048-2056, 2000.

WILSON, T. E.; FAHRNER, T. J.; MILBRANDT, J. The orphan receptors NGF1-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 9, p. 5794-5804, 1993.

WOLTERS, O.D.; CAMERON, F.J.; SCHEIMBERG, I.; HONOUR, J.W.; HINDMARSH, P. C.; SAVAGE, M.O.; STANHOPE, R.G.; BROOK, C.G. Androgen secreting adrenocortical tumours. **Archives of Disease in Childhood**, v. 80, n. 1, p. 46-50, 1999.

WONG, M.; IKEDA, Y.; LUO, X.; CARON, K.M.; WEBER, T.J.; SWAIN, A.; SCHIMMER, B.P.; PARKER, K.L. Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 52, p. 167-182, 1997.

WORLEY, K.C.; ELLISON, K.A.; ZHANG, Y-H; WANG, D-F.; MASON, J.; ROTH, E.J.; ADAMS, V.; FOGT, D.D.; ZHU, X.M.; TOWBIN, J.A.; CHINAULT, A.C.; ZOGHBI, H.; McCABE, E.R.B. Yeast artificial chromosome cloning in the glycerol kinase and adrenal hypoplasia congenita region of Xp21. **Genomics**, v. 16, n. 2, p. 407-416, 1993.

YANG, A.; KAGHAD, M.; WANG, Y.; GILLETT, E.; FLEMING, M.D.; DOTSCHE, V.; ANDREWS, N.C.; CAPUT, D.; McKEON, F. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. **Molecular Cell**, v. 2, n. 3, p. 305-316, 1998.

YANO, T.; LINEHAN, M.; ANGLARD, P.; LERMAN, M.I.; DANIEL, L.N.; STEIN, C.A.; ROBERTSON, C.N.; LARocca, R.; ZBAR, B. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 81, n. 7, p. 518-523, 1989.

YASHIRO, T.; HARA, H.; FULTON, N.C.; OBARA, T.; KAPLAN, E.L. Point mutations of *ras* genes in human adrenal cortical tumors: absence in adrenocortical hyperplasia. **World Journal of Surgery**, v. 18, n. 4, p. 455-460, 1994.

YING, S.Y. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. **Endocrine Reviews**, v. 9, n. 2, p. 267-293, 1988.

YOKOI, S.; YASUI, K.; MORI, M.; LIZASA, T.; FUJISAWA, T.; INAZAWA, J. Amplification and overexpression of SKP2 are associated with metastasis of non-small-cell lung cancers to lymph nodes. **American Journal of Pathology**, v. 165, n. 1, p. 175-180, 2004.

YOSHIMOTO, K.; IWAHANA, H.; FUKUDA, A.; SANO, T.; ITAKURA, M. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. **Cancer**, v. 72, n. 4, p. 1386-1393, 1993.

YU, H.; BERKEL, H. Insulin-like growth factors and cancer. **Journal of de Louisiana State Medical Society**, v. 151, n. 4, p. 218-223, 1999.

YU, R. N.; ITO, M.; JAMESON, J.L. The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. **Molecular Endocrinology**, v. 12, n. 7, p. 1010-1022, 1998.

YU, J.; WANG, Z.; KINZLER, K.W.; VOGELSTEIN, B.; ZHANG, L. PUMA mediates the apoptotic response to p53 in colorectal cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 4, p. 1931-1936, 2003.

ZANARIA, E.; BARDONI, B.; DABOVIC, B.; CALVARI, V.; FRACCARO, M.; ZUFFARDI, O.; CAMERINO, G. Xp duplications and sex reversal. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London Biology Science**, v. 350, n. 1333, p. 291-296, 1995.

ZANARIA, E.; MUSCATELLI, F.; BARDONI, B.; STROM, T. M.; GULOLI, S.; GUO, W.; LALLI, E.; MOSER, C.; WALKER, A.P.; McCABE, E.R.B.; MELTINGER, T.; MONACO, A.P.; SASSONE-CORSI, P.; CAMERINO, G. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 635-641, 1994.

ZAZAPOULOS, E.; LALLI, E.; STOCCO, D.M.; SASSONE-CORSI, P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. **Nature**, v. 390, n. 6657, p. 311-315, 1997.

ZERBINI, C.; KOZAKEWICH, H.P.; WEINBERG, D.S.; MUNDT, D.J.; EDWARDS, J.A.; LACK, E.E. Adrenocortical neoplasms in childhood and adolescence: analysis of prognostic factors including DNA content. **Endocrine Pathology**, v. 3, p. 116-119, 1992.

ZHANG, L.; KASHANCHI, F.; ZHAN, Q.; ZHAN, S.; BRADY, J.N.; FORNACE, A.J.; SETH, P.; HELMAN, L.J. Regulation of insulin-like growth factor II P3 promoter by p53: a potential mechanism for tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 56, n. 6, p. 1367-1373, 1996.

ZHAO, J.; SPEEL, E.J.; MULETTA-FEURER, S.; RUTIMANN, K.; SAREMASLANI, P.; ROTH, J.; HEITZ, P.U.; KOMMINOTH, P. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. **American Journal of Pathology**, v. 155, n. 4, p. 1039-1045, 1999.

8 APÊNDICES

1. Comparative Genomic Hybridization Analysis of Adrenocortical Tumors of Childhood

2. Amplification of 9q34 in Childhood Adrenocortical Tumors: a Specific Feature Unrelated to Ethnic Origin or Living Conditions

3. Mortality Rate of Adrenocortical Tumors in Children Under 15 Years of Age in Curitiba, Brazil

4. Amplification of the Steroidogenic Factor-1 Gene in Childhood Adrenocortical Tumors

5. SF-1 Overexpression in Childhood Adrenocortical Tumors

6. Correlation Between the DAX-1 Array Transcript and Protein Expression in Childhood Adrenocortical Tumors

Os dois primeiros artigos (identificados como apêndices 1 e 2) não pertencem ao período de elaboração da presente tese. No entanto, foram os responsáveis pelas hipóteses que deram origem aos objetivos deste trabalho. Por esta razão, são aqui apresentados como apêndices.

**APÊNDICE 1 – COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION ANALYSIS OF
ADRENOCORTICAL TUMORS OF CHILDHOOD**

J Clin Endocrinol Metab, v. 84, p. 1116-1121, 1999

Comparative Genomic Hybridization Analysis of Adrenocortical Tumors of Childhood*

BONALD C. FIGUEIREDO, CONSTANTINE A. STRATAKIS, ROMOLO SANDRINI, LUIZ DELACERDA, MARA A. D. PIANOVSKY, CHRISTOFOROS GIATZAKIS, HANNAH M. YOUNG, AND BASSEM R. HADDAD

Department of Pediatrics, Division of Endocrinology, Federal University of Paraná (B.C.F., R.S., L.D., M.A.D.P.), Curitiba, Brazil; the Unit on Genetics and Endocrinology, Section on Pediatric Endocrinology, Developmental Endocrinology Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Bethesda (B.C.F., C.A.S.), Maryland 20892-1862; the Institute for Molecular and Human Genetics and the Department of Obstetrics and Gynecology (H.Y., B.R.H.), and the Department of Pediatrics, Division of Pediatric Endocrinology (C.A.S.), Georgetown University, Washington, D.C. 20007-2197

ABSTRACT

Although several genes have been investigated in adrenal tumorigenesis, the genetic background of adrenocortical tumors (ACT) remains poorly characterized. In southern Brazil, the annual incidence of ACT is unusually high, ranging from 3.4–4.2/million children, compared with a worldwide incidence of 0.3/million children younger than 15 yr. Environmental factors have been implicated because the distribution of these tumors follows a regional, rather than a familial, pattern. However, decreased penetrance of a particular gene defect cannot be excluded. Because linkage or other traditional genetic analyses would not be appropriate to investigate the defect(s) associated with ACT in this population, we used comparative genomic hybridization (CGH) to screen for DNA sequence copy number changes in 9 nonfamilial ACT (6 carcinomas and 3 adenomas) from unrelated patients from this region. Six female (aged 10 months to 6 3/4 yr) and 3 male (1 1/12 to 3 1/4 yr) patients were studied. Three carcinomas were at stage I, 1 was at stage II, and another was at stage III. Two carcinomas had evidence of invasion of the vena cava, and 3 were more than 3 cm in size. All patients underwent surgical excision of their tumors; chemotherapy was administered to cancer patients. Cur-

rently, all patients are alive and in remission, with the exception of 1 patient with stage III cancer. High mol wt DNA was extracted from tumor tissue obtained at surgery and frozen at -70 C. This DNA was labeled and used for CGH according to standard procedures. Digital image analysis was performed to detect chromosomal gains or losses. CGH evaluation revealed extensive genetic aberrations in both adenomas and carcinomas; there were no significant differences relative to age, gender, size, or stage of the tumor ($P > 0.1$). Chromosomes and chromosomal regions 1q, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 9q, 10p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 18q, 19, and 20q demonstrated gains, whereas 2q, 3, 4, 9p, 11, 13q, 18, 20p, and Xq showed losses. The most striking finding was consistent copy number gain of chromosomal region 9q34 in 8 of the 9 tumors. We conclude that both benign and malignant ACT from southern Brazil show multiple genetic aberrations, including a consistent gain of chromosomal region 9q34. This genomic area may harbor genetic defects that predispose to ACT formation and are shared by the patients who were investigated in this study or are accumulated ontogenetically under the influence of a common factor, such as an environmental mutagen. (*J Clin Endocrinol Metab* 84: 1416–1421, 1999)

ALTHOUGH several genes (reviewed in Ref. 1) have been investigated in adrenal tumorigenesis, the genetic background of adrenocortical tumors (ACT) remains poorly characterized. Adrenocortical hyperplasia is a polyclonal process, but ACT are mostly monoclonal lesions (2), indicating that genetic changes at specific loci in the genome are needed for adrenal tumorigenesis. A number of chromosomal abnormalities have been implicated in this process, including genomic loci on 11p and 17p (3–6), which harbor genes with tumor suppression or oncogenic function in the adrenal cortex. These include the genes coding for the p53 (on

17p13.1) (7, 8) and p57 (on 11p15.5) (*KIP2*) (9, 10), and the insulin-like growth factor type II (on 11p15.5) (11–13) proteins.

However, none of these genes appears to be specific for ACT pathogenesis. Patients with Li-Fraumeni syndrome (LFS), who have germline p53 mutations (7), rarely develop adrenal cancer. An analysis of 475 tumors in 91 families with LFS revealed that breast cancer, bone and soft tissue sarcoma, and brain tumors are most frequent, whereas adrenal cancer developed in only 1% of the patients (14). In sporadic ACT, somatic p53 mutations may be present in approximately 30–50% of the malignant lesions (1, 15, 16). However, p53 expression does not correlate with prognosis, and it is rarely seen in sporadic, highly differentiated tumors, indicating that p53 mutations in malignant ACT are a late event in the process of tumorigenesis (17, 18). Thus, other genetic events precede and may even predispose to p53 mutations in ACT formation.

Comparative genomic hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique that allows a genomewide screening of tumor DNA to identify chromosomal gains and losses (19,

Received July 20, 1998. Revision received November 23, 1998. Accepted December 10, 1998.

Address all correspondence and requests for reprints to: Constantine A. Stratakis, M.D., D.Sc., Unit on Genetics and Endocrinology, Section on Pediatric Endocrinology, Developmental Endocrinology Branch, National Institute of Child Health and Human Development, National Institutes of Health, Building 10, Room 10N262, 10 Center Drive, MSC1862, Bethesda, Maryland 20892-1862. E-mail: stratak@ccl.nichd.nih.gov.

*This work was supported in part by a CNPq grant (522775/96–9) and was presented (in part) in abstract form at the 80th Annual Meeting of The Endocrine Society, New Orleans, LA, June 21–27, 1998.

20). Regions of gains may contain dominantly acting oncogenes, whereas tumor suppressor genes may map to deleted regions (21). One important advantage of CGH is that frozen or paraffin-embedded samples can be evaluated because only tumor DNA, not cells in culture, is required for the analysis.

Other studies have shown genetic aberrations in ACTs from adult patients, but there is a paucity of information about these tumors in childhood. Kjellman *et al.* investigated by CGH the chromosomal imbalances of 8 carcinomas and 14 adenomas from adult patients. The most common genetic aberrations in carcinomas were gains of chromosomes 4 and 5 and losses of chromosomes 11 and 17 (22). However, many of the epidemiological and clinical features observed in children with ACT are different from those seen in ACT of adult patients, suggesting that childhood and adulthood ACT may be different disease entities and, perhaps, caused by different genetic processes (1). The great majority of the tumors in children cause signs and symptoms due to increased production of hormones, sex steroids, and/or glucocorticoids. By contrast, most of the tumors in adults do not cause Cushing's syndrome and/or virilization (23–26; reviewed in Refs. 27 and 28).

In the present study, we used CGH to investigate genetic events leading to ACTs in children from a region in southern Brazil (Curitiba), which, along with the state of Sao Paulo, has the highest incidence of these tumors worldwide (3.4–4.2/million children below 15 yr of age) (29). These patients do not have a diagnosis of any genetic syndrome; they are mostly female and under 4 yr of age, and their tumors have better prognosis than those of adults with comparable stages of tumor development (29). These features suggested that particular genetic events, germline or somatic, may be inducing tumorigenesis in this population. Indeed, CGH showed that 8 of the 9 tumors that were investigated exhibited, among other changes, copy number gain of a segment of chromosome 9 corresponding to cytogenetic band 9q34, suggesting that a gene(s) in this locus may play a role in the molecular process leading to ACT formation in this population.

Subjects and Methods

Patients

The adrenocortical tumors were diagnosed by criteria described previously (24, 29). Eight families were chosen for the present studies based on availability of patients for tumor sampling during surgery. All patients signed a written consent form for a research protocol approved by our hospital. All kindreds are genetically heterogeneous descendants of European origin (Italian, Polish, Portuguese, Spanish, or German) mixed with the local Indian population. There was no known consanguinity, and patients with known genetic conditions were excluded from this analysis.

All patients, six girls (aged 9–82 months) and three boys (aged 13–35 months), were referred to the Pediatric Endocrinology Unit of Hospital de Clínicas from Federal University of Paraná (Curitiba, Brazil). The profiles of all nine patients are given in Table 1. The clinical appearance was 1) virilization and Cushing's syndrome ($n = 3$), 2) only virilization ($n = 5$), and 3) only Cushing's syndrome ($n = 1$). The extent of the tumor by image analysis, the treatment regimens, and follow-up times are also given in Table 1. Steroidogenesis was evaluated by measurement of dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, testosterone, 17-hydroxyprogesterone, and cortisol. Computed tomography scan of the abdomen and an angiographic exam of inferior vena cava (when computed tomography indicated invasion of the vena cava) were performed in all patients.

Tumors and DNA extraction

The tumors were classified as adenomas or carcinomas according to conventional pathological criteria, as previously described (29). After surgical excision, the tumor mass was sectioned, and the tumor fragments were frozen in liquid nitrogen. Before DNA extraction, the samples were examined by a pathologist, and only those specimens with pathological cells were used for DNA analysis. Thus, the vast majority of the cells of the eight primary tumors were tumor cells. One tumor (from patient 3) was a secondary local recurrent adrenocortical carcinoma, which was diagnosed almost 2 yr after resection of the primary mass. In this case, the neoplasm was highly vascularized, and a larger percentage of normal cells were present; the tissue was carefully resected for DNA extraction to avoid contamination by normal cells. DNA was extracted from all samples, as previously described (20, 30), and processed for CGH (20) in a way similar to that described for other ACT (22, 31).

CGH

CGH was performed according to standard procedures (20). Normal control DNA was prepared from peripheral blood lymphocytes of a cytogenetically normal male. Genomic DNA was extracted from the

TABLE 1. Clinical profile and management of patients with adrenocortical tumors investigated in this study

Patient no.	Gender	Age (months)	Imaging		Surgery	Tumor			Chemotherapy	Follow-up (months)
			CT	CAVA		Stage ^a	Vol (ml ³)	Pathology		
1	F	9.5	Nodular		TCE	I	27	CA		Well (15)
2	F	9	Nodular		TCE	I	25	CA		Well (41)
3 ^b	F	82	Nodular	CIA	PR CI	III	650	CA	ICEM	D (19)
4	M	23	Nodular		TCE	I	25	CA		Well (24)
5	M	13	Nodular	CIA	TCE	II	380	CA		Well (7)
6	F	17	Nodular		TCE	I	26	CA		Well (17)
7	F	27	Nodular		TCE		48	Ad		Well (10)
8	M	35	Nodular		TCE		16	Ad		Well (14)
9	F	68	Nodular		TCE		5	Ad		Well (9)

F, Female; M, male; CT, computed tomographic scan of the adrenal glands; CAVA, inferior vena cava angiography; CI, inferior vena cava invasion as seen in CT; CIA, inferior vena cava invasion to the right atrium; nod, nodular appearance of the adrenal glands on CT; PR, partially removed; TCE, tumor completely excised; CA, carcinoma; Ad, adenoma; Chemo, chemotherapy; ICEM, ifosfamide, carboplatinum, etoposide, and mitotane; DS, deceased.

^a Tumor staging as reported previously (1, 29).

^b This patient died of complications of tracheostomy during his hospitalization in the intensive care unit.

frozen tissue using the Qiagen kit (Qiagen, Inc., Chatsworth, CA). Nick translation was performed to label tumor DNA with bio-16-deoxy-UTP (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and control DNA with digoxigenin-11-deoxy-UTP (Boehringer Mannheim). Five hundred nanograms of each of the labeled genomes were hybridized in the presence of excess Cot-1 DNA (50 181 g; Life Technologies, Gaithersburg, MD) to metaphase chromosomes prepared from a karyotypically normal donor. The biotin-labeled tumor genome was visualized with avidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA), and the digoxigenin-labelled control DNA was detected with a mouse antidigoxin antibody (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO), followed by detection with a goat antimouse antibody conjugated to tetra-methyl-rhodamine isothiocyanate (Sigma Chemical Co.). Chromosomes were counterstained with 4',6'-diamidino-2-phenylindole and embedded in antifading agent to reduce photobleaching.

Microscopy and digital image analysis

Gray scale images of the fluorescein isothiocyanate-labeled tumor DNA, the tetra-methyl-rhodamine isothiocyanate-labeled control DNA, and the 4',6'-diamidino-2-phenylindole counterstain from at least eight metaphases from each hybridization were acquired with a cooled charge-coupled device CCD camera (CH250, Photometrics, Tucson, AZ) connected to a Leica Corp. (Deerfield, IL) DMRBE microscope equipped with fluorochrome specific optical filters TR1, TR2, and TR3 (Chroma Technology, Brattleboro, VT). Quantitative evaluation of the hybridization was performed using commercially available software (Applied Imaging, Pittsburgh, PA). Average ratio profiles were computed as the mean value of at least eight ratio images to identify chromosomal copy number changes in all cases.

Results

Clinical description

The clinical profile of the patients is summarized in Table 1. Six female (aged 10 months to 6 3/4 yr) and 3 male (1 1/12 to 3 1/4 yr) patients were studied. Clinical symptomatology differed in that none of the patients with adenomas (cases 7, 8, and 9) presented with signs of Cushing's syndrome; five of the six patients with carcinoma (cases 1–6) had Cushingoid features, although only two had consistently elevated urinary cortisol levels. Hirsutism and biochemical hyperandrogenism were shared by almost all patients regardless of the final pathological diagnosis. Carcinomas were diagnosed at stages I (3), II (1), and III (1). Two carcinomas had evidence of invasion of the inferior vena cava, and three were more than 3 cm in size. All patients underwent surgical excision of their tumors; chemotherapy was administered to one patient (case 3). Currently all patients are alive and in remission, with the exception of one patient with stage III cancer, who died in the intensive care unit as a result of complications of a tracheostomy.

CGH analysis

CGH was used to map DNA copy number aberrations that occur in these tumors; the DNA was extracted from frozen tumor samples. For patient 3, who was diagnosed with a stage III carcinoma, only metastatic tumor was available. Average ratio profiles were used for the mapping of copy number changes in all instances. A summary of all the changes is presented in Fig. 1, and an example of CGH analysis for chromosome 9 is presented for patients 5, 7, and 8 as an average ratio profile of 17, 20, and 21 metaphases, respectively, in Fig. 2. Chromosomal aberrations were detected in all 9 cases, and the average number of chromosomal

aberrations per case was 8.2. There was no difference in the average number of changes seen in adenomas and carcinomas; there were also no significant differences with regards to age, gender, size, or stage of the tumor ($P > 0.1$).

Despite the high number of chromosomal aberrations, a recurrent pattern emerged. The most consistent finding was a gain of the long arm of chromosome 9 (or a portion of it), which was detectable in eight of the nine patients (89%). The smallest region of overlap that showed copy number gain was 9q34. A high level copy number increase (amplification) of 9q34 was observed in five of nine cases (56%). Figure 2 shows chromosome 9 profiles from three representative cases. In the ACT from patient 5 (*top panel*), chromosome 9 was normal; in the ACT from patient 8 (*middle panel*), CGH showed gain of 9q22qter and an amplification of 9q34; in the ACT from patient 7 (*lower panel*) CGH revealed amplification of just the chromosomal area corresponding to cytogenetic band 9q34.

The second most common chromosomal gain was the gain of the long arm of chromosome 12 (12q) or a portion of it (seven of the nine ACT, or 78%). In particular, the 12q23q24 region showed a gain in five of the nine ACT (56%). Other chromosomal areas that showed gain of genetic material were also identified on chromosomes 5 (four of the nine tumors, 44%), 19 (44%) and 20 (44%). Smaller regions that showed high level copy number increases (amplifications) were mapped to chromosomal bands 6p21, 9q34, 11q13, 12q11q22, 12q23q24, and 13q22qter.

Losses of genetic material were not as frequent as gains. The most common chromosomal copy number decrease were mapped to chromosome 4 [in four of the nine ACT it included the entire chromosome 4, and in one of the nine tumors it included only the long arm (4q)] and to chromosomal region 2q22q34 (four of the nine ACT). Chromosome 17 loss (the chromosome that harbors the p53 gene) was not seen in any of the tumors.

Discussion

ACT are often diagnosed on the basis of the clinical appearance, steroid testing, and imaging studies. In most children, the adrenocortical carcinoma is still in stage II of the disease (27–29) when medical help is sought. In our series of six carcinomas, four of them were diagnosed at stage I, and only 1 was diagnosed at stage III. In addition, the male to female ratio in our patients (who were below the age of 4 yr) was 2:1 [it is 4:1 for our entire population studied by Sandrini *et al.* (29)], whereas a ratio of 3:2 for this age group has been reported by others (24, 25). It is possible that these differences in clinical appearance may point to variable genetic background of these tumors, as has been suggested for the ACTs occurring in various age groups of children (29, 32).

Chromosomal imbalances may be associated with malignancy or, rarely, may indicate the genetic origin of the tumor (19, 20, 22, 31, 32). In the latter case we would expect to find it in both benign and malignant ACT, assuming that the carcinoma could arise from monoclonal expansion of an adenoma, as previously suggested (1). In total, 3 benign and 6 malignant ACT from our patients were examined by CGH. This analysis showed that 8 of these tumors (3 adenomas and 5 carcinomas) had copy number gains of the long arm of

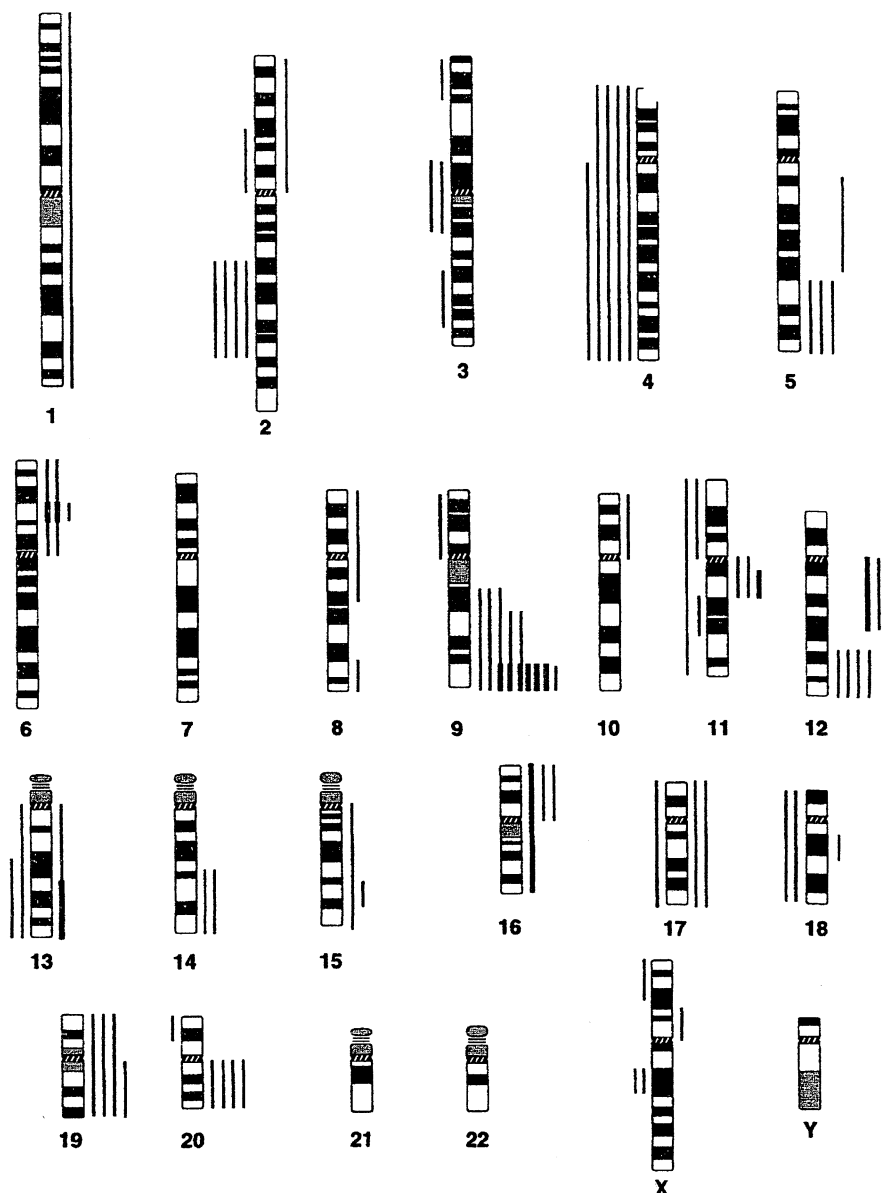


FIG. 1. Karyograms of chromosomal gains and losses in childhood adrenocortical tumors from southern Brazil (Curitiba). Bars to the right of the chromosome ideogram indicate a gain, whereas bars to the left indicate a loss of genetic material. Bold lines indicate amplifications.

chromosome 9. Region 9q34 was the smallest area of overlap and showed amplification in 5 tumors (4 carcinomas and 1 adenoma). Previous CGH survey of ACT genome from 22 adult patients found only 1 adenoma with gain of 9q (among 14 adenomas and 8 carcinomas) (22). This may indicate differences in the genetics of ACT formation between children and adults, which would be consistent with the epidemiological and other clinical differences in this disease in the 2 groups. Alternatively, 9q may only be involved in ACT formation in this population of children from Curitiba, southern Brazil. However, the fact that gain of 9q was seen in an adenoma in the study by Kjellman *et al.* (22), whereas it was seen in both adenomas and carcinomas in our study, indicates that this chromosomal region may indeed harbor a

gene(s) important for early ACT formation in other patient groups as well.

One of the three most common regions of increased relative copy number reported by Kjellman *et al.* was 5q, which was found only in carcinomas (22). Indeed, gain of 5q31-qter (two of six carcinomas) and 5q14-q21 (one of six carcinomas) were also found in our study. The other two most common gains reported by Kjellman *et al.*, involving chromosomal areas 4p and 5p, were also found in one of the tumors of our study (a carcinoma).

Chromosomal gains were far more common than losses in our study. It is noteworthy that Reincke *et al.* also reported an excess of gains in their study of CGH of ACTs (31). As in our investigation, the chromosomal areas involved were the

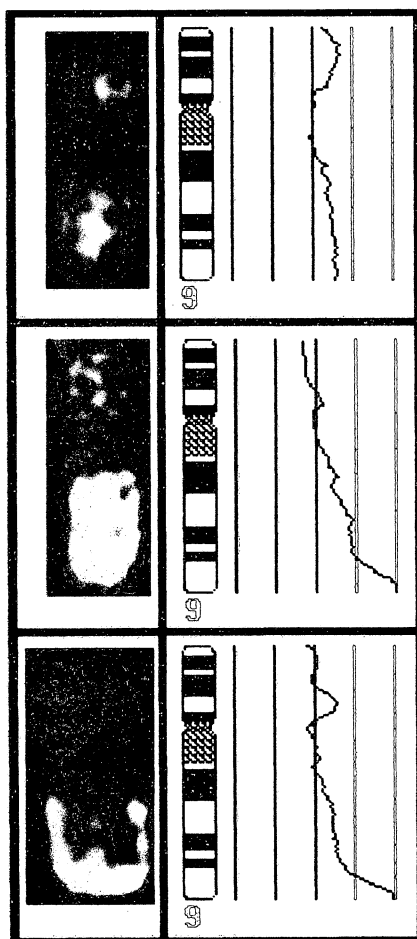


FIG. 2. Chromosome 9 CGH profiles from three representative cases. In case 5 (*top panel*), the profile was normal; in case 8 (*middle panel*), the profile showed a gain of 9q22qter and an amplification of 9q34; in case 7 (*bottom panel*), the profile showed an amplification of 9q34. The five vertical lines on the right of the chromosome ideograms reflect different values of the fluorescence ratio between the tumor DNA and the normal DNA. The values are 0.5, 0.75, 1, 1.25, and 1.5, from left to right. The middle line represents a 1:1 ratio and reflects a balance between the tumor DNA and the normal control DNA. The ratio profile (*curve*) was computed as a mean value of at least eight metaphase spreads. For each case, a representative chromosome 9 hybridized with tumor DNA is shown to the left of the ideogram. Notice that the regions of chromosomal gain correlate to an increased hybridization intensity. Chromosomal regions showing an amplification (9q34 for cases 8 and 7) show a further increase in the signal intensity compared to the rest of the chromosome.

same in adenomas and carcinomas. In our study, the most frequently lost chromosome region, found in four of our carcinomas, was deletion of 2q22q34. Kjellman *et al.* have also described loss in chromosome 2, although more common losses in their study were those involving chromosomes 11q and 17p (22). Although we also found a deletion of the area 11q14q22 in two carcinomas, we did not see loss of 17p in any of our tumors. This is particularly important, because chromosome 17 harbors the gene for p53 (7).

The p53 tumor suppressor gene is the most commonly

altered gene in human cancers. Germline mutations in p53 are the genetic alteration underlying predisposition to multiple cancers in LFS. Most cases referred to the Hospital de Clinicas at Curitiba in southern Brazil (>85 tumors in the last 30 yr) are not associated with families presenting features of LFS. In the present series of affected children, 2 of them are relatives, but their families did not meet the diagnostic criteria of LFS. Furthermore, although our present study did not exclude the possibility of p53 mutations in these neoplasms, it is noteworthy that we did not find any loss of chromosome 17. A study by Ohgaki *et al.* found p53 mutations in only 3 of 15 adrenocortical carcinomas and 1 of 18 adenomas (18), suggesting that in sporadic ACT, p53 mutations are a late event in the multistep process of malignant transformation (1, 17). This is also supported by the finding of germline p53 mutations in 3 of 6 children with adrenocortical carcinoma (15).

It has been suggested that environmental mutagens may increase the rates at which cancer-predisposing somatic mutations occur (33). The role of agrototoxic compounds in the pathogenesis of ACT is controversial (29). The use of such compounds in agriculture in many areas of Brazil is arbitrary. As most ACT found in patients from southern Brazil and the state of Sao Paulo are sporadic, we have speculated that these compounds may play a role in the high incidence of ACT in these regions, especially as the incidence of other childhood tumors in these regions is not increased (29). We have been led to this speculation by the finding that mutations in the p53 and other genes are known to be selectively induced by environmental agents, such as aromatic amines, benzopyrene, and aflatoxin B (34–36). Although the present study was quite small and did not indicate that any tumor suppressor genes were of importance for ACT development in our patients, it is possible that environmental agents could cause additional "hits" required for adrenal tumorigenesis (6, 29), as predicted by Knudson's hypothesis (37). A larger study is required to examine this hypothesis and evaluate the consistency of losses of chromosomal material (indicating, perhaps, regions of loss of heterozygosity) that were found by CGH in our patients.

On the other hand, the finding of 9q34 amplification in our patients' tumors may indicate the site of the oncogene(s) important for ACT formation. Several candidate genes reside in this chromosomal region, which is also involved in the t(9;22) translocation seen in chronic myeloid leukemia and Philadelphia chromosome-positive acute lymphocytic leukemia (38, 39). In this process, the fusion of two genes, *BCR* and *ABL1*, gives rise to a BCR-ABL chimeric oncogene, which is generated by translocation of sequences from the c-ABL protein tyrosine kinase gene on 9q34 into the BCR gene in chromosome 22. In the pathogenesis of ACT, amplification of 9q34 could involve aberrant transcripts of the *ABL1* oncogene. Other potential candidate genes mapped to 9q34 (40) include the *vav2* oncogene (41), the transforming growth factor- β receptor-1 gene (*TGFBR1*), which is an activin A receptor type II-like kinase (42), the tumor necrosis factor receptor-associated factor-2 gene (*TRAF1*) (43), and the oncogene 24p3 or lipocalin 2 gene (*LCN2/NGAL*) (44).

In conclusion, we found that benign and malignant ACT from southern Brazil show multiple genetic aberrations and

a consistent gain and, in some cases, amplification of chromosomal region 9q34. These changes may reflect genetic defects that are shared by our patients and predispose to ACT formation or are accumulated epigenetically by a common factor regardless of genetic background. Further studies are required to characterize these chromosomal imbalances, especially the gain in 9q34, and to determine to what extent they are linked to the malignancy or etiology of these tumors.

Acknowledgments

We thank Dr. George P. Chrousos (Developmental Endocrinology Branch, NICHD, NIH) for his suggestions and support of this study, and Dr. Lawrence S. Kirschner (Unit on Genetics and Endocrinology, Developmental Endocrinology Branch, NICHD, NIH) for his helpful comments and assistance with some of the experiments. We also thank Ms. Martha Hunt (Georgetown University, Washington DC) for her technical assistance. Finally, we thank the patients and their families for providing tissue for these studies and wholeheartedly supporting our department in the clinical investigation of adrenal tumors in South Brazil.

References

- Latronico AC, Chrousos GP. 1997 Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:1317-1324.
- Beuschlein F, Reincke M, Karl M, et al. 1994 Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res.* 54:4927-4932.
- Henry I, Grandjean S, Couillin P, et al. 1989 Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 86:3247-3251.
- Beckers A, Abs R, Willems PJ, et al. 1992 Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab.* 75:564-570.
- Henry I, Jeanpierre M, Couillin P, et al. 1989 Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet.* 81:273-277.
- Yano T, Linehan M, Anglard P, et al. 1989 Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 81:518-523.
- Malkin D, Li FP, Strong LC, et al. 1990 Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science.* 250:1233-1238.
- Lin SR, Lee YJ, Tsai JH. 1994 Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:483-491.
- Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Voutilainen R. 1997 Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:1766-1771.
- Hatada I, Inazawa J, Abe T, et al. 1996 Genomic imprinting of human p57KIP2 and its reduced expression in Wilms' tumors. *Hum Mol Genet.* 5:783-788.
- Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R. 1993 Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 77:852-858.
- Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Ilvesmaki V, Voutilainen R. 1995 H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab.* 80:492-496.
- Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. 1997 Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2559-2565.
- Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. 1997 Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol.* 150:1-13.
- Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D. 1994 High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 86:1707-1710.
- Sameshima Y, Tsunematsu Y, Watanabe S, et al. 1992 Detection of novel germ-line p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *J Natl Cancer Inst.* 84:703-707.
- Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, Chrousos GP. 1994 p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 78:790-794.
- Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. 1993 p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer.* 54:408-410.
- Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, Pinkel D. 1992 Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science.* 258:818-821.
- du Manoir S, Speicher MR, Joos S, et al. 1993 Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. *Hum Genet.* 90:590-610.
- Houldsworth J, Chaganti RSK. 1994 Comparative genomic hybridization: an overview. *Am J Pathol.* 145:1253-1260.
- Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, et al. 1996 Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res.* 56:4219-4223.
- Luckon AM, Wroclawski ER, Glina S, et al. 1986 Carcinoma da cortex adrenal. *Rev Hosp Clin Facc Med Sao Paulo.* 41:1-5.
- Michalkiewicz EL, Sandrini R, Bugg MF, et al. 1997 Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. *Med Pediatr Oncol.* 28:175-178.
- Neblett WW, Frexes-Steed M, Scott HW Jr. 1987 Experience with adrenocortical neoplasms in childhood. *Am J Surg.* 53:117-125.
- Hayles AB, Hahn HB Jr, Sprague RG, Bahn RC, Priestley JT. 1966 Hormone-secreting tumors of the adrenal cortex in children. *Pediatrics.* 37:19-25.
- Stratakis CA, Chrousos GP. 1997 Endocrine tumors. In: Pizzo PA, Poplack DG, eds. Principles and practice of pediatric oncology, 3rd ed. Philadelphia: Lippincott; 947-976.
- Weatherby RP, Carney JA. 1984 Pathologic features of childhood adrenocortical carcinomas. In: Humphrey GB, Grindey GB, Dehner LP, eds. Adrenal and endocrine tumors in children: adrenal cortical carcinoma and multiple endocrine neoplasia. Boston: Martinus Nijhoff; 239-248.
- Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. 1997 Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2027-2031.
- Stratakis CA, Jenkins RB, Pras E, et al. 1996 Cytogenetic and microsatellite alterations in tumors from patients with the syndrome of myxomas, spotty skin pigmentation, and endocrine overactivity (Carney complex). *J Clin Endocrinol Metab.* 81:3607-3614.
- Reincke M, Dohna M, Solinas-Toldo S, Allolio B, Lichter P. Multiple chromosomal aberrations in benign, and malignant adrenocortical tumors using comparative genomic hybridization [Abstract P2-108]. *Proc of the 79th Annual Meet. of The Endocrine Soc.* 1998.
- Gross K, Pereira MA, Grasso D, et al. 1992 Carcinoma adrenal: relato de 36 casos. *Arq Bras Endocr Metab.* 36:53-60.
- Zahm SH, Ward MH. 1998 Pesticides and childhood cancer. *Environ Health Perspect.* 106(Suppl 3):893-908.
- Nagao M, Sugimura T. 1993 Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. *Mutat Res.* 290:43-51.
- Pfeifer GP, Denissenko MF. 1998 Formation and repair of DNA lesions in the p53 gene: relation to cancer mutations? *Environ Mol Mutagen.* 31:197-205.
- Sorlie T, Martel-Planche G, Hainaut P, Lewalter J, Holm R, Borresen-Dale AL, Montesano R. 1998 Analysis of p53, p16 MTS, p21WAF1 and H-ras in archived bladder tumours from workers exposed to aromatic amines. *Br J Cancer.* 77:1573-1579.
- Knudson AG. 1992 Heredity and environment in the origin of cancer. *Prog Clin Biol Res.* 376:31-40.
- Bartram CR, de Klein A, Hagemeijer A, et al. 1983 Translocation of *c-abl* oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 306:277-280.
- Chisoe SL, Bodenteich A, Wang YF, et al. 1995 Sequence and analysis of the human ABL gene, the BCR gene, and regions involved in the Philadelphia chromosomal translocation. *Genomics.* 27:67-82.
- Online Mendelian inheritance in man. Center for Medical Genetics, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). 1997 URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- Henske EP, Short MP, Jozwiak S, Bovey CM, Ramlakhan S, Haines JL, Kwiatkowski DJ. 1995 Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Ann Hum Genet.* 59:25-37.
- Johnson DW, Qumsiyeh M, Benkhalifa M, Marchuk DA. 1995 Assignment of human transforming growth factor-beta type I and type III receptor genes (TGFBRI and TGFBRI3) to 9q33-q34 and 1p32-p33, respectively. *Genomics.* 28:356-357.
- Siemiński K, Peters N, Scheurich P, Wajant H. 1997 Organization of the human tumour necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) gene and mapping to chromosome 9q33-34. *Gene.* 195:35-39.
- Chan P, Simon-Chazottes D, Mattei MG, Guenet JL, Salier JP. 1994 Comparative mapping of lipocalin genes in human and mouse: the four genes for complement C8 γ chain, prostaglandin-D-synthase, oncogene-24p3, and progesterone-associated endometrial protein map to HSA9 and MMU2. *Genomics.* 23:145-150.

**APÊNDICE 2 - AMPLIFICATION OF 9q34 IN CHILDHOOD
ADRENOCORTICAL TUMORS: A SPECIFIC FEATURE
UNRELATED TO ETHNIC ORIGIN OR LIVING
CONDITIONS**

Braz J Med Biol Res, v. 33, n.10, p.1217-1224, 2000

Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions

B.C. Figueiredo¹,
R.C. Ribeiro^{2,3}, G. Zambetti⁴,
B. Haddad⁵,
M.D. Pianovsky¹,
R.M. Pereira¹, L. DeLacerda¹
and R. Sandrini¹

¹Unidade de Endocrinologia Pediátrica, Departamento de Pediatria, Hospital de Clínicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil
²Hematology/Oncology, ³International Outreach Program, and ⁴Biochemistry and Pediatrics, St. Jude Children's Research Hospital, College of Medicine, University of Tennessee, Memphis, TN, USA
⁵Institute for Molecular and Human Genetics and Department of Obstetrics and Gynecology, Georgetown University, Washington, DC, USA

Abstract

Adrenocortical tumors (ACT) in children under 15 years of age exhibit some clinical and biological features distinct from ACT in adults. Cell proliferation, hypertrophy and cell death in adrenal cortex during the last months of gestation and the immediate postnatal period seem to be critical for the origin of ACT in children. Studies with large numbers of patients with childhood ACT have indicated a median age at diagnosis of about 4 years. In our institution, the median age was 3 years and 5 months, while the median age for first signs and symptoms was 2 years and 5 months (N = 72). Using the comparative genomic hybridization technique, we have reported a high frequency of 9q34 amplification in adenomas and carcinomas. This finding has been confirmed more recently by investigators in England. The lower socioeconomic status, the distinctive ethnic groups and all the regional differences in Southern Brazil in relation to patients in England indicate that these differences are not important to determine 9q34 amplification. Candidate amplified genes mapped to this locus are currently being investigated and Southern blot results obtained so far have discarded amplification of the *abl* oncogene. Amplification of 9q34 has not been found to be related to tumor size, staging, or malignant histopathological features, nor does it seem to be responsible for the higher incidence of ACT observed in Southern Brazil, but could be related to an ACT from embryonic origin.

Key words

- Adrenocortical carcinoma
- Cancer
- Mutation
- 9q34 Amplification

Correspondence

R. Sandrini
Hospital de Clínicas, UFPR
Rua General Carneiro, 181
80060-900 Curitiba, PR
Brasil

Presented at the First
International Meeting on Adrenal
Disease: Basic and Clinical
Aspects, Ribeirão Preto, SP, Brazil,
August 31-September 2, 1999.

Research supported in part by
NCI Cancer Center Core grants
P30-CA-21765 and PO1-CA-20180,
and the American Lebanese Syrian
Associated Charities (ALSAC).

Received February 17, 2000
Accepted June 21, 2000

Introduction

Childhood cancer is a very rare disease and very little is known about the etiology of most of the tumors. Distinctive age distributions of diagnostic groups of cancers have

been reviewed (1-3) and some of them are related to organ-specific differences. Notably, early age peaks, such as for neuroblastoma, retinoblastoma and hepatoblastoma, are related to embryonic tumors. The pattern of age distribution of childhood adrenocorti-

cal tumors (ACT), highest during the first 3 years of life, and the poor predictive value of prognosis based on benign or malignant histopathological patterns adapted from tumors in adults (4) are important differences between childhood and adult ACT. The patterns of clinical presentations are also quite different between them, with marked predominance of virilization associated with Cushing's syndrome in contrast to predominance of non-functional tumors in adults (5,6). Moreover, the incidence of childhood ACT is markedly higher in Southern Brazil (7), while the incidence of adult ACT in this region is similar to that described in other countries, i.e., 0.5-1.0 per million (8). In the present study, we have discussed the possibility that amplified genes in 9q34 might be a cause of childhood ACT or only one feature that occurs after tumor formation. The simple fact that it is not observed in adult ACT (9,10) constitutes an additional reason to believe that childhood ACT is a different entity from that usually seen in adults.

Amplification of 9q34

Comparative genomic hybridization (CGH) is a molecular cytogenetic technique based on quantitative two-color fluorescence *in situ* hybridization (11). Reference or control DNA isolated from an individual with a normal karyotype and tumor DNA are differentially labeled with reporter molecules (biotin d-UTP for the tumor genome and digoxigenin d-UTP for the reference genome), hybridized to reference human metaphase spreads and subsequently detected with two different fluorochromes, i.e., avidin-FITC (green fluorescence; Figure 1A) for the biotinylated tumor DNA and mouse anti-digoxigenin followed by rabbit anti-mouse coupled to TRITC (red fluorescence; Figure 1B) for the digoxigenin-labeled reference DNA. The differences in fluorescence intensities along the chromosomes on the reference metaphase spread reflect the copy num-

ber of corresponding sequences in the tumor DNA. If chromosomes or chromosomal sub-regions are present in identical copy numbers in both the reference and the tumor genome, the observed fluorescence is a blend of an equal contribution of red and green fluorescence. If chromosomes are lost or chromosomal sub-regions are deleted in the tumor genome, the resulting color is shifted to red. A gain of a certain chromosome or chromosomal sub-region or an amplification at a certain chromosomal sub-region would be reflected by a more intense green staining on the respective chromosome in the reference metaphase preparation (arrows shown in Figure 1A in contrast to those shown in Figure 1B). CGH allows the detection of genetic imbalances in solid tumors or any desired test genome in a single experiment, and the determination of the chromosomal map position of gains and losses of chromosomes or chromosomal sub-regions on normal reference metaphase preparations. Evaluation of CGH was performed using a digital system (Applied Imaging, Pittsburgh, PA, USA), based on the green:red ratio.

Tumor cells are prone to intense DNA damage and imbalances across their chromosomes tend to accumulate with time, associated with advanced stage disease. A highly consistent abnormality, 9q34 amplification (Figure 1A), was found in childhood ACT by our group (12) and more recently by another group from England (10) in childhood but not in adulthood ACT, in more than 80% of tumors collected from ethnically distinct patients. This locus could be the site of genes related to the etiology or malignancy of ACT in children but not in adults (9). The most important findings described by these Swedish authors in adult ACT, increased copy number of 4q, 5p and 5q and loss of chromosomes 2, 11q and 17p, were not found in our study. These abnormalities in adults seem to be related to the malignancy of the tumor as suggested by the scarce number of identical abnormalities found in

adenomas.

Different CGH results between adult and childhood ACT are in agreement with the majority of studies which have proposed that the clinical and pathological findings in the adult adrenocortical tumor are largely distinct from the tumor in young patients (5,6,13-15). This reinforces the concept that adult and childhood ACT are distinct entities, no matter how morphologically similar they are. We have found 9q34 amplification in adenomas and carcinomas, small and large tumors, which suggests a precocious onset of this abnormality. However, amplification of 9q34 is not correlated with currently used histopathological parameters for defining benign and malignant features, neither could it be used as a prognostic parameter. Candidate amplified genes mapped to this locus might be the cellular oncogene *c-abl* (16,17), the tumor suppressor gene described as tuberous sclerosis gene *TSC1* (18,19), which is characterized by the widespread development of distinctive tumors termed hamartomas (20). Furthermore, it has been reported that 9q34 encompasses the locus or the loci for ovarian cancer and the familial nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome) (21), transitional cell carcinoma of the bladder (22,23) and other genes, such as steroidogenic factor 1 (24). Our Southern blot analyses have indicated that the *abl*

gene is not the amplified gene in childhood ACT with 9q34 amplification.

Incidence of ACT and environmental pollution

Childhood ACT in Southern Brazil and probably in the State of São Paulo appears to be 10 to 15 times greater (7) than the worldwide ACT incidence, 0.3/million of children at the age of 15 years and younger (25). The second highest incidence of ACT was reported in Northwest of England between 1965 and 1986, 0.64/million of children younger than 15 years (26). It has been thought that environmental carcinogens could play a role in ACT tumorigenesis. However, reports from the families of our patients are not clearly indicative that an environmental carcinogen exists and is capable of inflicting a germline or somatic mutation. One of the hypotheses, based on reports from parents, was that ACT could be caused by a substance presently used in agriculture. Thus, we have treated dogs over three generations with the top 20 most used pesticides and herbicides in the State of Paraná (Southern Brazil), applying nontoxic concentrations of these compounds, and none of them have developed any type of tumor. These negative results are not yet sufficient to rule out the involvement of these substances, which to-

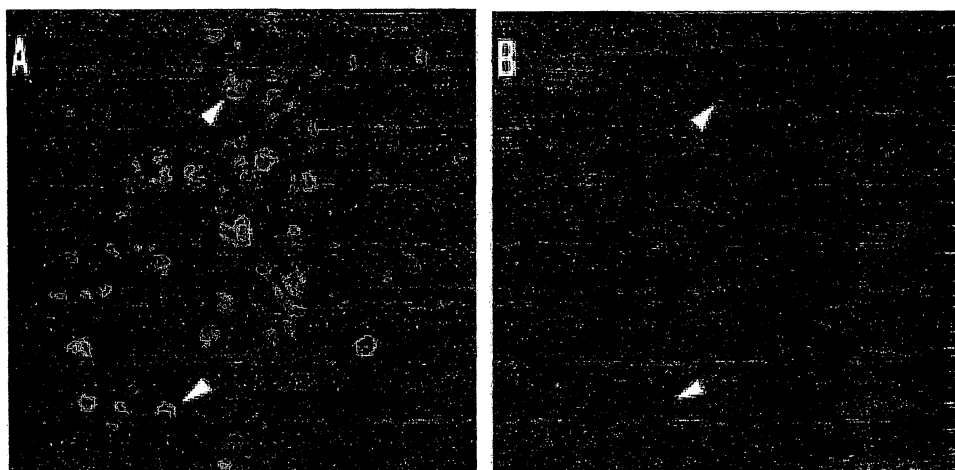


Figure 1 - Metaphase chromosome spreads from a normal male donor were hybridized with equal amounts of tumor (labeled with FITC, green fluorescence shown in Figure 1A) or control DNA (probe labeled with TRITC, the red fluorescence pattern shown in Figure 1B). Chromosome 9 indicated by arrowheads (confirmed by banding analysis seen with DAPI), showing intense signal at the far end of the long arm in A, is not seen in control (B). The fluorescence ratio that is different from controls is calculated by computer imaging analysis using as reference the banding pattern detected with DAPI counterstain-
ing.

gether with other candidate environmental pollutants must be further investigated using *in vitro* and *in vivo* approaches. However, while these hypothetical mutagens could be directly linked to other mutated genes in ACT, it seems that amplification of the 9q34 locus is not related to environmental or ethnic background, because their features are quite different between two regions with the exact same frequency of 9q34 in childhood ACT, Southern Brazil and Northwest of England. Although many of our patients are of European extraction (mainly Italians, Germans and Poles) there are many children, including almost half of the cases included in our CGH analysis, who are descendants of natives or of a mixture of different cultures, including Indians, blacks from Africa, Portuguese and Spaniards. In addition, the mean socioeconomic status of our patients is significantly below that found in Northwest of England and this difference does not seem to be important for generating amplification of 9q34.

Adrenal cortex development and tumorigenesis

A working hypothesis has been proposed, in which the origin of childhood ACT may result from an abnormality in the process of cell proliferation and/or programmed cell death during adrenal development. Studies with a significant number of ACT cases have noticed that the diagnosis is frequently made before 5 years of age (7,27,28), which is in agreement with peaks of ACT diagnosis more frequently observed between 2 and 4 years of age in our experience (72 cases). The steroidogenic nature of each tumor and the ability of parents to detect any clinical manifestation usually dictate how early signs and symptoms are noticed. Most of the children's parents have noticed first signs and/or symptoms from a few months to more than a year before diagnosis. Moreover, based on sporadic observations, the elapsed time between

imaging detection and referral to our institution indicates that the tumor can grow so slowly as to remain of the same size or so fast as to be several-fold larger within only a few months. Fast growth was observed in a boy who had been submitted to an upper abdomen CAT scan (for investigation of gastrointestinal tract complaints) and had incidentally documented the largest adrenal diameter to be approximately 28 mm, 5 months before reaching 1800 g (during investigation of respiratory tract infection and nausea). Thus, the growth rate of ACT is quite variable and does not seem to be related to the steroidogenic state of the tumor, although non-symptomatic ACT ("non-functional ACT") tend to be diagnosed later when they become very large. Attempts to trace backward onset of signs and symptoms together with size of tumors lend support to the idea that the critical period of tumorigenesis occurs in close temporal association with the period of intense developmental transformation of the adrenal cortex. Tumors that are found less frequently in older children could indicate a slower growth rate or that the initiation of the tumor could indeed have happened later in life, a time that could offer lower risk of developing ACT through a different mechanism.

Human fetal adrenal cortex is composed of three zones: fetal zone, transitional zone and definitive zone (29). During the last 3 months of gestation, the definitive zone and transitional zone begin to take on the appearance of the glomerulosa and the zona fasciculata, respectively (30). The fetal zone corresponds to 90% of the fetal cortex and its incredible growth reaches a plateau by the end of gestation and thereafter undergoes a more intense apoptotic process and vanishes during the first 3 months of postnatal life (31). Growth in the fetal zone seems to be limited to hypertrophy of cells that migrated from the definitive zone (the migrational theory), which seems to be the only proliferative layer (32). The net effect of a period

of intense cell proliferation, migration, hypertrophy and cell death during the early postnatal life is an adrenal without the fetal zone. The remaining two outer zones continue to expand to become adult-like in appearance, in parallel to the postnatal initiation and growth of the reticular zone that reaches its final size by adolescence. Thus, a hypothesis for an increased vulnerability of the fetal adrenal cortex is proposed based on clinical presentations of ACT most frequently found in early infancy (7,27,28) and on the above mentioned peculiarities of adrenal cortex development (Figure 2).

We have postulated the hypothesis of one amplified oncogene mapped to 9q34 causing deregulated entry into the cell cycle and accelerated growth of ACT. Our preliminary studies with Southern blot analyses have not found amplification of the *abl* oncogene. However, other somatic and/or germline mutations causing dysfunction of a tumor suppressor gene, such as the TSC1 located in 9q34 or p53 in chromosome 17 could be directly responsible for ACT formation. In either case, a deficient TSC1

(18,19) or p53 (33), we would expect to find inactivation of a growth-suppressive pathway restraining activation of genes necessary for progression through G1, and into the S phase. Some of the important growth factors for adrenal cortex development such as IGF-II (34) have been related to childhood ACT (35). We do not have any scientific base to indicate that female sex hormones facilitate ACT formation; however, it has been observed that ACT occurs 5 times more frequently in girls up to the age of 5 years (7).

Histological pattern of ACT

The proposed histological features used to classify malignant and benign masses of adult ACT have been exhaustively reexamined but they cannot be reliably used to discriminate ACT subtypes in children. The ACT size does not distinguish adenoma from carcinoma; however, surgical resectability and cure, in our experience, are usually found in 92% of small tumors (<200 cm³, based on a 5-year survival rate), no matter if their histopathological features (those usually es-

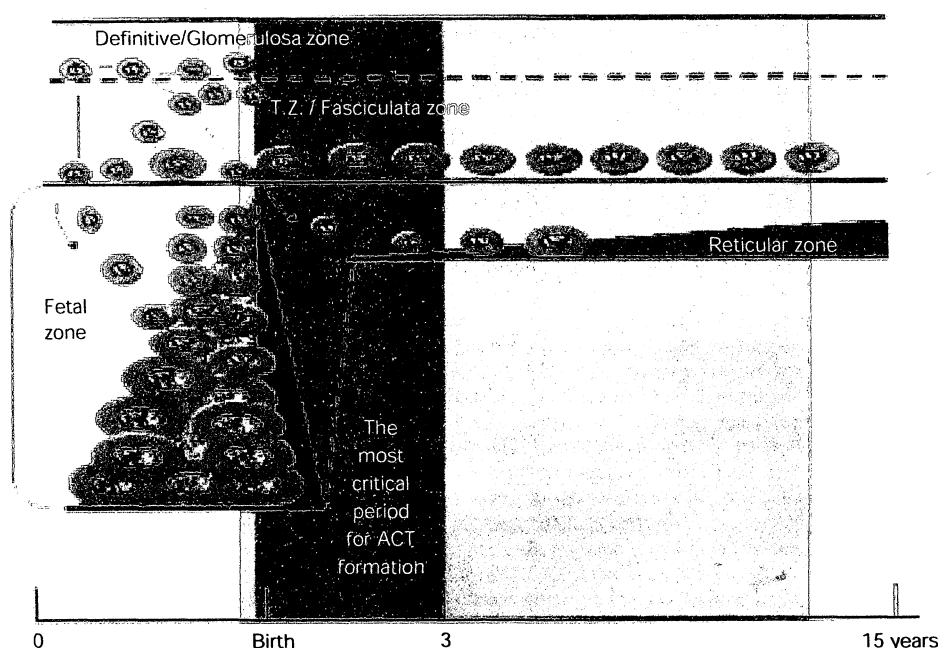


Figure 2 - The process of cell proliferation of stem cells in the definitive and transitional zones (T.Z.) in contrast to intense programmed cell death in the fetal zone (black area), and the birth of a new inner zone (reticular zone) are shown. Centripetal cell migration (arrows) to the inner zone precedes cell hypertrophy phases. The hypothetical most critical period for adrenocortical tumor (ACT) formation (dark gray rectangular area), followed by a second most frequent critical phase (light gray rectangular area) is proposed. These two critical periods are solely based on the most frequent ages at diagnosis and the time before manifesting the first signs and symptoms.

tablished for adult ACT) are suggestive or not of malignancy. Principal prognosis criteria include tumor size, mitotic rate, stage and surgical resectability. Of these, the best two prognosis indicators appear to be tumor size (15,28,36-42) and mitotic rate according to Medeiros and Weiss (43) and Van Slooten et al. (44). It is not yet known whether carcinoma develops from adenoma or is malignant from the beginning as proposed by Weatherby and Carney (45). These authors have reported that necrosis, capsular or vascular invasion and increased mitotic activity are much more frequent in malignant tumors; however, other authors believe that the absence of these features does not exclude the possibility of a malignant biological behavior (46). Moreover, Holcombe et al. (39) have reported a significant overlap of macroscopic and microscopic features between adenomas and carcinomas. Given the importance for predicting the biological behavior of these tumors, a critical reevaluation of methods for establishing the classification of adenoma and carcinoma is required. In addition, it is necessary to investigate specific markers for embryonic tumors of the adrenal cortex in childhood ACT. Amplification of 9q34 was present in two small tumors with histopathological features of adenomas and absent in one advanced stage carcinoma, which is not in line with a malignization role for this imbalance. A larger number of ACT

samples are necessary to verify whether 9q34 could define prognosis and/or correlate with histopathological features. This amplified locus may not necessarily involve one abnormal oncogene or tumor suppressor gene. Conversely, it might be one feature found only in childhood ACT. In this regard, this finding may be a feature leading to a definition of the origin of ACT in children (embryonic tumor?) and in adults.

Conclusions

Three possibilities could be related to 9q34 amplification: one associated with ACT formation through the participation of one mutant oncoprotein or a dysfunctional tumor suppressor protein; a second possibility is that 9q34 occurs after tumor formation and may or may not play a role in tumor growth or in the malignization process, or this amplification does not play any role in ACT, but because of its high frequency of occurrence might be one feature of a candidate embryonic tumor. The third assumption still requires further studies to demonstrate its embryonic origin. In any of the proposed possibilities, we believe that ethnic background, living or environmental conditions, and many other differences between Southern Brazil and Northwest of England are not important factors linked to the origin of 9q34 amplification.

References

- Birch JM & Marsden HB (1987). A classification scheme for childhood cancer. *International Journal of Cancer*, 40: 620-624.
- Parkin DM, Stiller CA, Bieber A, Draper GJ, Terracini B & Young JL (Editors) (1987). *International Incidence of Childhood Cancer*. IARC Scientific Publications, Lyon, France.
- Stiller CA (1992). Aetiology and epidemiology. In: Plowman PN & Pinkerton CR (Editors), *Paediatric Oncology*. Chapman & Hall Medical, London, 1-22.
- Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, Lloyd RV, Sandrini R, Silva JB, Epelman S, Shapiro DN & Parham DM (1994). Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors [see Comments]. *American Journal of Clinical Pathology*, 101: 625-629.
- Huvos AG, Hajdu SI, Brasfield RD & Foote Jr FW (1970). Adrenal cortical carcinoma. Clinicopathologic study of 34 cases. *Cancer*, 25: 354-361.
- King DR & Lack EE (1979). Adrenal cortical carcinoma: a clinical and pathologic study of 49 cases. *Cancer*, 44: 239-244.
- Sandrini R, Ribeiro RC & DeLacerda L (1997). Childhood adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 2027-2031.
- Mantero F & Arnaldi G (1999). Investigation protocol: adrenal enlargement. *Clinical Endocrinology*, 50: 141-146.
- Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Höög A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C & Bäckdahl M (1996). Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization corre-

- late with tumor size and malignancy. *Cancer Research*, 56: 4219-4223.
10. James LA, Kelsey AM, Birch JM & Varley JM (1999). Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *British Journal of Cancer*, 81: 300-304.
 11. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, Kovacs G, Robert-Nicoud M, Lichter P & Cremer T (1993). Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic hybridization. *Human Genetics*, 90: 590-610.
 12. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM & Haddad BR (1999). Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 1116-1121.
 13. Bertagna C & Orth DN (1981). Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978). *American Journal of Medicine*, 71: 855-875.
 14. Bodie B, Novick AC, Pontes JE, Straffon RA, Montie JE, Babiak T, Sheeler L & Schumacher P (1989). The Cleveland Clinic experience with adrenal cortical carcinoma. *Journal of Urology*, 141: 257-260.
 15. Hayles AB, Hahn Jr HB, Sprague RG, Bahn RC & Priestley JT (1966). Hormone-secreting tumors of the adrenal cortex in children. *Pediatrics*, 37: 19-25.
 16. Mohamed AN, Koppitch F, Varterasian M, Karanes C, Yao KL & Sarkar FH (1995). BCR/ABL fusion located on chromosome 9 in chronic myeloid leukemia with a masked Ph chromosome. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 13: 133-137.
 17. Rodley P, McDonald M, Price B, Frignt R & Morris C (1997). Comparative genomic hybridization reveals previously undescribed amplifications and deletions in the chronic myeloid leukemia-derived K-562 cell line. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 19: 36-42.
 18. Green AJ, Johnson PH & Yates JR (1994). The tuberous sclerosis gene on chromosome 9q34 acts as a growth suppressor. *Human Molecular Genetics*, 3: 1833-1834.
 19. Bjornsson J, Short MP, Kwiatkowski DJ & Henske EP (1996). Tuberous sclerosis-associated renal cell carcinoma. Clinical, pathological, and genetic features. *American Journal of Pathology*, 149: 1201-1208.
 20. Van Sleghenhorst M, de Hoogt R, Hermans C, Nellist M, Janssen B, Verhoef S, Lindhout D, van den Ouweland A, Halley D, Young J, Burley M, Jeremiah S, Woodward K, Nahmias J, Fox M, Ekong R, Osborne J, Wolfe J, Povey S, Snell RG, Cheadle JP, Jones AC, Tachataki M, Ravine D & Kwiatkowski DJ (1997). Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. *Science*, 277: 805-808.
 21. Devlin J, Elder PA, Gabra H, Steel CM & Knowles MA (1996). High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour-suppressor loci. *British Journal of Cancer*, 73: 420-423.
 22. Habuchi T, Devlin J, Elder PA & Knowles MA (1995). Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. *Oncogene*, 11: 1671-1674.
 23. Hornigold N, Devlin J, Davies AM, Aveyard JS, Habuchi T & Knowles MA (1999). Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. *Oncogene*, 18: 2657-2661.
 24. Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM & Seldin MF (1995). Homologs of *Drosophila* Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics*, 25: 565-567.
 25. Gurney JG, Severson RK, Davis S & Robison LL (1995). Incidence of cancer in children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. *Cancer*, 75: 2186-2195.
 26. Birch JM & Blair V (1988). Increase in childhood carcinomas in north-west England [Letter]. *Lancet*, 1: 833.
 27. Hartley AL, Birch JM, Marsden HB, Reid H, Harris M & Blair V (1987). Adrenal cortical tumours: epidemiological and familial aspects. *Archives of Disease in Childhood*, 62: 683-689.
 28. Lefevre M, Gerard-Marchant R, Gubler JP, Chaussain JL & Lemerle J (1984). Adrenal cortical carcinoma in children: 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In: Humphrey GB, Grindley GB & Dehner LP (Editors), *Adrenal and Endocrine Tumors in Children. Adrenal Cortical Carcinoma and Multiple Endocrine Neoplasia*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 265-276.
 29. Mesiano S & Jaffe RB (1997). Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocrine Reviews*, 18: 378-403.
 30. Sucheston ME & Cannon MS (1968). Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *Journal of Morphology*, 126: 477-491.
 31. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY & Jaffe RB (1999). Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84: 1110-1115.
 32. Keene MFL & Hewer EE (1927). Observations on the development of the human suprarenal gland. *Journal of Anatomy*, 61: 302-324.
 33. Varley JM, Thorncroft M, McGown G, Appleby J, Kelsey AM, Tricker KJ, Evans DG & Birch JM (1997). A detailed study of loss of heterozygosity on chromosome 17 in tumours from Li-Fraumeni patients carrying a mutation to the TP53 gene. *Oncogene*, 14: 865-871.
 34. Mesiano S & Jaffe RB (1997). Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. *Steroids*, 62: 62-72.
 35. Ilvesmäki V, Kahri AI, Miettinen PJ & Voutilainen R (1993). Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77: 852-858.
 36. Benailly M, Schweisguth O & Job JC (1975). Les tumeurs cortico-surrenales de l'enfant. Etude retrospective de 34 cas observes de 1954 a 1973. *Archives Françaises de Pédiatrie*, 32: 441-453.
 37. Cagle PT, Hough AJ, Pysker TJ, Page DL, Johnson EH, Kirkland RT, Holcombe JH & Hawkins EP (1986). Comparison of adrenal cortical tumors in children and adults. *Cancer*, 57: 2235-2237.
 38. Chudler RM & Kay R (1989). Adrenocortical carcinoma in children. *Urologic Clinics of North America*, 16: 469-479.
 39. Holcombe JH, Pysker TJ & Kirkland RT (1984). Functioning adrenocortical tumors in childhood. In: Humphrey GB, Grindley GB & Dehner LP (Editors), *Adrenal and Endocrine Tumors in Children. Adrenal Cortical Carcinoma and Multiple Endocrine Neoplasia*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 277-290.
 40. Neblett WW, Frexes-Steed M & Scott Jr HW (1987). Experience with adrenocortical neoplasms in childhood. *American Surgery*, 53: 117-125.
 41. Ribeiro RC, Sandrini Neto RS, Schell MJ, Lacerda L, Sambaio GA & Cat I (1990). Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *Journal of Clinical Oncology*, 8: 67-74.

42. Tang CK & Gray GF (1975). Adrenocortical neoplasms. Prognosis and morphology. *Urology*, 5: 691-695.
43. Medeiros LJ & Weiss LM (1992). New developments in the pathologic diagnosis of adrenal cortical neoplasms. *Journal of Clinical Pathology*, 97: 73-83.
44. Van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D & Moolenaar AJ (1985). Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*, 55: 766-773.
45. Weatherby RP & Carney JA (1984). Pathologic features of childhood adrenocortical tumors. In: Humphrey GB, Grindey GB & Dehner LP (Editors), *Adrenal and Endocrine Tumors in Children. Adrenal Cortical Carcinoma and Multiple Endocrine Neoplasia*. Martinus Nijhoff Publishers, Boston, 239-248.
46. Stewart DR, Jones PH & Jolleys A (1974). Carcinoma of the adrenal gland in children. *Journal of Pediatric Surgery*, 9: 59-67.

APÊNDICE 3 - MORTALITY RATE OF ADRENOCORTICAL TUMORS IN CHILDREN UNDER 15 YEARS OF AGE IN CURITIBA, BRAZIL.

Pediatr Blood Cancer, 2005 Sep 30; [Epub ahead of print]

Mortality Rate of Adrenocortical Tumors in Children Under 15 Years of Age in Curitiba, Brazil

Mara A.D. Pianovski, MD,¹ Eliane M.C.P. Maluf, MD, PhD,² Denise S. de Carvalho, MD, PhD,² Raul C. Ribeiro, MD,³ Carlos Rodriguez-Galindo, MD,³ Paolo Boffetta, MD, PhD,⁴ Patrícia Zancanella, MSc,⁵ and Bonald C. Figueiredo, MD, PhD^{5*}

Background. Several reports refer to an increased frequency of adrenal cortex tumors (ACT) among children in Southern Brazil, yet all data have been derived from hospital-based registries. An inherited germline mutation in the p53 gene (*TP53* R337H) is detected in virtually all children with ACT in this region and accounts for the excess cases observed. **Procedure.** We reviewed all death certificates that mentioned ACT or adrenal neuroblastoma (NB) and which were reported to the Paraná State Department of Health between 1998 and 2003, for individuals younger than 15 years who resided in the Curitiba metropolitan region. **Results.** Eight deaths from ACT and ten from NB were identified. The age-standardized mortality rate per million children <15 years of age in the

Curitiba metropolitan region during the years 1998–2003 was 1.6 (95% confidence interval (CI) 1.4, 1.8) for ACT and 2.3 (95% CI 2.0, 2.5) for NB. The ratio of the adrenal NB and ACT age-adjusted mortality rate of 2.3 per million for NB and 1.6 per million for ACT 1.41. The incidence of ACT estimated from the mortality data, assuming an ACT survival rate of 0.542, was 3.5 (95% CI 2.9, 4.2). **Conclusions.** Our investigation of population-based mortality confirms the evidence from hospital-based registries of a clustering of ACT in Southern Brazil. In addition, our data suggest that the incidence of ACT in this region is about 12–18 times the incidence reported in the United States and Europe. *Pediatr Blood Cancer* 2005;00:1–5. © 2005 Wiley-Liss, Inc.

Key words: adrenocortical cancer; children; mortality

INTRODUCTION

Pediatric adrenocortical tumors (ACT) are very rare [1]. The Manchester Children's Tumor Registry recorded 12 pediatric ACT cases over a 33-year period (1954–1986), with an estimated incidence rate of 0.38 cases per million children less than 15 years of age [2]. In the United States, the estimated incidence rate is 0.3 per million individuals less than 20 years old [3], while in France ACT incidence is 0.2 per million children [4].

There has been overwhelming evidence of a clustering of pediatric ACT in Southern Brazil. As early as 1969, Marigo et al. [5] noted an increased frequency of ACT in a series of 520 cases of childhood malignant tumors registered at the Santa Casa de Misericórdia of São Paulo over a 15-year period; 12 cases (2.9%) were ACT. Data from the Clínicas Hospital of the Federal University of Paraná in Curitiba, Southern Brazil revealed 73 cases of pediatric ACT over a period of 31 years (1966–1996) [6]. In a more recent analysis, ACT accounted for 7% of 585 cases of cancer in children younger than 15 years who were admitted to the same hospital during the past 10 years, whereas neuroblastoma and Wilms tumor were less common (5.8 and 4.1%, respectively; unpublished observations). This excess of ACT cases does not appear to reflect a bias caused by referral pattern; a disproportionately high number of cases of pediatric ACT was also

reported by other dates in the region [7–10], as compared with the number reported by two large population-based registries in Europe [11] and the US [1,3] (Table I).

Laboratory investigation of the families of children with ACT in Paraná and São Paulo revealed that the majority of children with ACT had inherited a germline *TP53* R337H mutation (Table I) [12,13]. In contrast, none of 22 children with other endocrine pathologies seen

¹Department of Pediatric, Hematology and Pediatric Oncology Division, Clínicas Hospital of the Federal University of Paraná, Brazil

²Department of Medical Clinic, Primary Health Care Discipline, Clínicas Hospital of the Federal University of Paraná, Brazil

³Department of Hematology-Oncology, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee

⁴International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, France

⁵Department of Pediatrics, Center of Molecular Genetics and Cancer Research (CEGEMPAC), Clínicas Hospital of the Federal University of Paraná, Brazil

Center of Molecular Genetics and Cancer Research was the institution at which the work was performed.

*Correspondence to: Bonald C. Figueiredo, Center for Molecular Genetics and Cancer Research, Federal University of Paraná, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-110, Brazil. E-mail: bonaldf@yahoo.com.br

Received 24 February 2005; Accepted 17 August 2005

TABLE I. Number of Cases of ACT Registered in Selected Hospitals in the Brazilian States of São Paulo, Paraná, and Bahia and in the US and Europe

Institution	State	Period	Number of patients	Age (years)	TP53 R337H tested/positive (%)
HCACC [7]	São Paulo	1978–2003	56	<21	NA
SCSP [7]	São Paulo	1985–2004	17	<14	NA
CIDB [8]	São Paulo	1980–2004	78	<18	20/20 (100)
IC [7]	São Paulo	1977–2002	46	<13	NA
HCFMSP [7]	São Paulo	1982–2003	27	<16	21/27 (78)
HCC [9]	Paraná	1966–2003	124	<13	61/65 (93.8)
HCFMRP [10]	São Paulo	1985–2003	21	<12	12/16 (75)
ONCO/HSR [31]	Bahia	1981–2004	6	<12	0/5 (0)
SEER [3]	USA	1975–1995	36	<20	NA
Eurocare [11]	Europe	1983–1994	65	<15	NA

HCACC, Hospital do Cancer AC Camargo; SCSP, Santa Casa de São Paulo; IC, Instituto da Criança da Universidade de São Paulo; CIDB, Centro Infantil Domingos Boldrini, Universidade de Campinas; HCFMSP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; HCC, Hospital de Clínicas de Curitiba, Universidade Federal do Paraná; HCFMRP, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto; ONCO/HSR, Sociedade de Oncologia da Bahia Ltda/Hospital São Rafael; SEER, Surveillance epidemiology and end results; NA, not available.

at the Clinics Hospital, nor any of the 232 individuals on the non-carrier side of the patients' families, harbored this mutation [12,14].

Because the Curitiba metropolitan area is within the geographic region of pediatric ACT clustering and has a reliable population-based mortality registry, we analyzed ACT mortality data to estimate the incidence of pediatric ACT in this region. As an indicator of the consistency of the registry data, we also analyzed the mortality rate of adrenal neuroblastoma (NB) from the same registry data. Adrenal NB, which is typically much more common than ACT [15], has an age distribution and overall mortality rate similar to those of ACT [11].

METHODS

This study was approved by the Ethics Committee of Clínicas Hospital, Federal University of Paraná; patient/family consent was not required. We reviewed all death certificates issued between 1998 and 2003 for individuals younger than 15 years in the Curitiba metropolitan region that mentioned ACT or adrenal NB. Death certificates were filled out by the physician who confirmed the death and were then forwarded to the registrar's office, which in turn forwarded them to the Epidemiology Department of the State Department of Health. These records were obtained through the Mortality Information System of the State of Paraná, which was established in 1997 as a mandatory repository of all death records, and were compiled by the Paraná State Department of Health. Causes of death are coded on the death certificates according to the International Classification of Diseases (ICD), 10th version. All death certificates that included a primary diagnosis coded as ICD C74 were analyzed. This category includes the subgroups C74.0 (adrenal cortex), C74.1

(adrenal medulla), and C74.9 (adrenal gland, non-specified). C74.9 encompasses NB, pheochromocytoma, and ACT, while C74.1 may refer to pheochromocytoma or NB.

To reduce potential bias associated with the referral of children with complex diseases to large metropolitan areas such as Curitiba, we included in our analysis only the death certificates of children who resided in the Curitiba metropolitan area. The data obtained from the Mortality Information System were verified by contacting the physician of each patient to discuss the diagnosis. The location of NB in the adrenal gland rather than the retroperitoneal ganglia was confirmed by the patients' attending physicians. In each case of ACT, the histopathology report was obtained from the hospital and reviewed.

Year 2000 census data obtained from the Brazilian Unified Health System (SUS) web site (<http://www.datasus.gov.br/>) were used to calculate the crude mortality rate. This rate was calculated and adjusted by the method reported by Waterhouse [16] to derive an age-standardized rate comparable to standard world population-based data [17]. The incidence of ACT (I) was estimated as $I = M / (1 - S)$, where I is the incidence rate, M is the mortality rate and S is the 5-year survival rate. The previously reported 5-year survival was 0.542, with standard error 0.031 [18]. The standard error of the incidence rate was $se(I) = v\{(se(M)^2 + [I \times se(S)]^2) / (1 - S)$.

RESULTS

Eight cases of ACT and ten of adrenal NB were recorded on the death certificates from 1998 to 2003 and confirmed by the treating physicians and histological records. The estimated average mortality rate per million children <15 years of age in the Curitiba metropolitan region during the years 1998–2003 was 1.6 (95%

Mortality of Children With Adrenocortical Tumors in Southern Brazil 3

TABLE II. Mortality Rates of Childhood ACT and Adrenal Neuroblastoma in the Curitiba Metropolitan Area, 1998–2003

Age group (y)	Population of Curitiba metropolitan area in 2000	Number of deaths (1998–2003)	Age-standardized mortality rate (ASR)	Crude mortality rate	95% CI for crude mortality rate
Adrenocortical tumor					
0–4	257,617	0	NA	0	NA
5–9	255,794	5	NA	3.2	2.6–4.0
10–14	255,615	3	NA	2.0	0.7–4.9
Total	769,026	8	1.6 ^a	1.7	1.4–2.1
Neuroblastoma					
0–4		5	NA	3.2	2.6–4.0
5–9		4	NA	2.6	2.0–3.3
10–14		1	NA	0.7	0.4–1.1
Total		8	2.3 ^b	2.2	1.9–2.5

NA, not applicable.

^a95% confidence interval, 1.4, 1.8.

^b95% confidence interval, 2.0, 2.5.

confidence interval (CI) 1.4, 1.8) for ACT and 2.3 (95% CI 2.0, 2.5) for NB (Table II). The ratio of the death rates from adrenal NB and ACT was 1.41. From the mortality data, we estimated the incidence of ACT to be 3.5 (1.6/[1–0.542]) per year per million children less than 15 years of age, with CI 2.9, 4.2 per million.

DISCUSSION

We analyzed population-based pediatric ACT mortality data from the Curitiba metropolitan area in order to estimate the incidence of ACT in children in this region. Even if pediatric ACT were universally fatal and the mortality rates were identical to the incidence rates of the disease in this region, the ACT mortality rate of 1.6 per million children less than 15 years of age would be approximately ten times the ACT incidence rates observed in population-based registries of other countries [1–4]. However, there is no evidence that the medical management of pediatric ACT has biased the mortality rates. In fact, pediatric ACT is well managed at the pediatric oncology units in Curitiba, in part because of the extensive experience acquired over several decades by local pediatricians in the early identification of ACT [6]. Retrospective analysis of cases at a pediatric referral center in Curitiba has shown the overall 5-year survival rate to be at least 50% over a 40-year period [19]. More recently, the survival of children with ACT has improved due to early recognition and referral. Currently, about 80% of children with ACT referred to Clínicas Hospital in Curitiba have limited-stage disease, which is associated with a survival rate greater than 90% when treated with surgery alone [20]. Assuming that a conservative ACT survival rate of 55% [18] reflects the age-adjusted ACT mortality rate of 1.6 per million individuals less than 15 years of age, our best estimate of the incidence rate is 3.5 per million children younger than 15 years of age. A calculation based on the 95% CI of the survival estimate reported by the

International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry [18] shows that the true incidence is likely to lie within the interval 2.9–4.2 per million. This incidence rate is about 12–18 times those observed in France (0.2/million) [4] and the United States (0.1–0.4/million) [3]. Taken together, this interpretation of the mortality and survival data makes a compelling argument that the increased pediatric ACT mortality rate in the Curitiba metropolitan area reflects the high incidence of this tumor. This conclusion is consistent with the excess incidence of pediatric ACT indicated by data from several hospital-based registries in the region (Table I).

There is strong evidence to implicate the *TP53* R337H germline mutation in the high incidence of pediatric ACT in this geographic region. First, germline *TP53* mutations in general (Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes) increase the predisposition to pediatric ACT [21]. Notably, in carriers of these *TP53* mutations, pediatric ACT accounts for 3% of all tumors occurring at any age and for 10% of childhood tumors; pediatric ACT is therefore considered one of the clinical criteria for Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes [22]. In fact, ACT associated with germline *TP53* mutations develops almost exclusively in young children. In contrast, sporadic ACT has a broad age distribution with a peak incidence above age 40 years [23]. The association between young age, germline *TP53* mutation, and ACT is so strong that any child with ACT, irrespective of the family history of cancer, should be considered a carrier of a germline *TP53* mutation until proved otherwise [24]. Second, direct sequencing of the complete *TP53* alleles of many of the patients in Curitiba showed no other *TP53* mutation. Third, the *TP53* R337H has been reported in association with pediatric ACT outside of Brazil (a case in France) (<http://www-p53.iarc.fr/Germline.html>). Fourth, this missense mutation is not a common *P53* polymorphism (<http://www-p53.iarc.fr/Polymorphism.html>). Finally, in every instance in which a kindred included more than one

child with ACT, the affected children were consistently in the parental line that harbored the mutation [14]. In two instances, a parent who was a *TP53* R337H carrier had two children with ACT with different partners [25].

Moreover, the results of several laboratory investigations strongly suggest that the *TP53* R337H plays a role in adrenal tumorigenesis. These include the loss of heterozygosity with retention of the mutant allele in tumor cells [12], the accumulation of TP53 protein in the nucleus [12], and the folding and other properties of the missense TP53 R337H protein in vitro [26,27]. The presence of a germline *TP53* R337H mutation appears to be necessary for the development of ACT, although other, still-unknown genetic factor(s) contribute to its penetrance. We have recently reported that the penetrance of ACT is about 10% in a large cohort of carriers of the *TP53* R337H from families known to have children with ACT [14]. Because cancer is often a multistep process, other genetic changes found with variable frequency in children with the *TP53* R337H and ACT, including amplification of the 9q34 chromosomal region (detected in eight of nine tumor samples of children with ACT from Curitiba) [28], an increased copy number of the steroidogenic factor 1 (SF-1) gene in eight of the cases with 9q34 amplification [29], germline missense mutation in the inhibin alpha-subunit gene [30] and other yet-to-be-determined factors may contribute to adrenal cell transformation.

The origin of the *TP53* R337H mutation in this region of Brazil remains unexplained; no de novo mutation has been noted, and different ethnic groups in this region carry the mutation [14]. Although the data are incomplete due to the lack of population-based registries in most of the Brazilian states, the high frequency of childhood ACT appears to be geographically centered in the states of São Paulo and Paraná, decreasing progressively with distance from these states. For example, in the population-based cancer registry of the city of Goiânia (capital of Goiás), which is relatively near São Paulo, the incidence of pediatric ACT has been estimated to be 2.38/million children under age 15; in contrast, in the city of Belém, which is located in the far North of Brazil, the incidence is 0.8/million children under 15 [1]. Anecdotal evidence suggests that states that neighbor São Paulo and Paraná, such as Rio de Janeiro, Minas Gerais, and Santa Catarina, have a slightly increased incidence of ACT. These findings have yet to be confirmed, but some children with ACT in these neighboring states have been found to have the *TP53* R337H mutation. States more distant from this region do not report an excess of ACT, and none of the cases from northern Brazil studied to date ($n = 10$) have had the *TP53* R337H mutation. One pediatric oncology center in Salvador (Bahia state) that sees about 200 new cases per year has registered only six cases of pediatric ACT in the past 23 years [31]. The geographic restriction of the ACT-associated *TP53* R337H is consistent with the possibility

of a single founder effect. However, our finding of diverse *TP53* R337H alleles among children with ACT argues against a single founder [12].

We also analyzed the mortality rate caused by adrenal NB in this population. Adrenal NB has an age distribution and overall mortality rate comparable to those of ACT [32–34]. The available data suggest that adrenal NB is at least ten times as common as ACT in children less than 15 years of age [35–38]; therefore, mortality rates caused by NB would be expected to be several times those caused by ACT. However, in our study, the ratio of deaths caused by adrenal NB to those caused by ACT was only 1.25 (10/8), reflecting an age-adjusted mortality rate of 2.3 per million for NB and 1.6 per million for ACT (ratio, 1.41).

Rates of incidence and mortality are overlapping indicators. For rare diseases such as childhood adrenal cancer, it is plausible to estimate incidence rates from mortality data [39]. We acknowledge that the mortality rate involves various factors, including the total number of cases diagnosed before and during the period, the accuracy and completeness of death records, and the quality of the available treatment. Further, physicians currently follow the guidelines of the ICD 10, C 74.9 code, which does not specify the cortical versus medullary origin of adrenal neoplasia, and morphological classification, such as the M9490 (ganglioneuroblastoma) and M9500 (NB) codes, is not included in current death certificates. In the present study, we sought to find all certificates that specifically indicated involvement of the adrenal gland, we verified the quality of the data with the attending physician, and we examined the pathology report. We also acknowledge the remote possibility of false negatives, that is, patients who died of ACT-related conditions but whose death certificates did not mention ACT; such events would lead to underestimation of the mortality rate.

In conclusion, this investigation of population-based mortality confirms what hospital-based registry data have suggested: a clustering of ACT in Southern Brazil. Moreover, the data suggest that the incidence of pediatric ACT in this region is about 12–18 times that in the USA [3] and France [4], respectively.

ACKNOWLEDGMENT

We are grateful to Alice Tisserant for providing the SIM data, to Dr. Ivy Parise for contributing unpublished data on the percentage of neuroblastomas arising in the adrenal gland, and Sharon Naron for editing the article.

REFERENCES

1. Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, et al. editors. International incidence of childhood cancer, vol. II, XX^{Q1}: IARC Scientific Publications, no. 144, 1999. 450p.
2. Birch JM, Blair V. Increase in childhood carcinomas in north-west England. *Lancet* 1988;XX^{Q2}:833.

Mortality of Children With Adrenocortical Tumors in Southern Brazil 5

3. Bernstein L, Gurney JG. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, et al. editors. Cancer and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975–1995. Bethesda, MD: XXXX^{Q3}, 1999. pp 139–147.
4. Desandes E, Clavel J, Berger C, et al. Cancer incidence among children in France, 1990–1999. *Pediatr Blood Cancer* 2004;43:749–757.
5. Marigo C, Muller H, Davies JNP. Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. *J Natl Cancer Inst* 1969;43:1231–1240.
6. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2027–2031.
7. Latronico AC, Mendonca BB. Adrenocortical tumors—new perspectives. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48:642–646.
8. Hirose PF, Capellanno AM, Oliveira A, et al. Adrenocortical tumors in children: The Brazilian experience in a single institution. *J Clin Oncol* 2005;23:A8506.
9. Pereira RM, Michalkiewicz E, Sandrini F, et al. Childhood adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004;48:651–658.
10. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, et al. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res* 2005;37:231–235.
11. Gatta G, Capocaccia R, Stiller C, et al. Childhood cancer survival trends in Europe: A EURO CARE Working Group Study. *J Clin Oncol* 2005;23:3742–3751.
12. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:9330–9335.
13. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;86:4970–4973.
14. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumors associated with the germline TP53 R337H Mutation. *J Med Genet* (in press^{Q4}).
15. Brodeur CM, Maris JM. Neuroblastoma. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. Lippincott: Williams & Wilkins. 2002. pp 895–937.
16. Waterhouse J, Muir CS, Shanmugaratnam K, et al. editors. Cancer incidence in five continents, vol. IV (IARC Scientific Publications, no. 42), Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1982.
17. Parkin DM, Kramárová E. Materials and methods. In: Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, Masuyer E, Michaelis J, Neglia J, Qureshi S, Stiller CA, editors. International incidence of childhood cancer, vol. II, XX^{Q5}: IARC Scientific Publications, no. 144, 1998. pp 3–14.
18. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors. An analysis of 254 cases from the international pediatric adrenocortical tumor registry. *J Clin Oncol* 2004;22:838–845.
19. Ribeiro RC, Sandrini Neto RS, Schell MJ, et al. Adrenocortical carcinoma in children: A study of 40 cases. *J Clin Oncol* 1990;8:67–74.
20. Michalkiewicz EL, Sandrini R, Bugg MF, et al. Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. *Med Pediatr Oncol* 1997;28:175–178.
21. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, et al. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 2001;20:4621–4628.
22. Kleihues P, Schauble B, zur HA, et al. Tumors associated with p53 germline mutations: A synopsis of 91 families. *Am J Pathol* 1997;150:1–13.
23. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990;322:1195–1201.
24. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 1999;65:995–1006.
25. Figueiredo BC, Ribeiro RC, Ellen M, et al. Multiple childhood adrenocortical tumors in six families from southern Brazil without Li-Fraumeni syndrome. *Hormone Research* 2000;53:2–15.
26. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Natl Struct Biol* 2002;9:12–16.
27. Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, et al. Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. *J Mol Biol* 2003;327:699–709.
28. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:1116–1121.
29. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90:615–619.
30. Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, et al. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. *J Med Genet* 2004;41:354–359.
31. Barreto JHS, Dórea MDF, Mendonça N. Carcinoma do córtex adrenal na infância. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2001;45:S383.
32. Smith MA, Ries LAG. Childhood Cancer: Incidence, survival, and mortality. In: Pizzo PA, Poplack DG, editors. Principles and practice of pediatric oncology. Lippincott: Williams & Wilkins 2002; pp 1–12.
33. Spix C, Aareleid T, Stiller C, et al. Survival of children with neuroblastoma: Time trends and regional differences in Europe, 1978–1992. *Eur J Cancer* 2001;37:722–729.
34. Bernstein ML, Leclerc JM, Bunin G, et al. A population based study of neuroblastoma incidence, survival, and mortality in North America (published erratum appears in *J Clin Oncol* 10: 1202, 1992). *J Clin Oncol* 1992;10:323–329.
35. Dehner LP, Franciosi RA. Adrenocortical neoplasia in the pediatric age group. A clinicopathologic study of seven cases. In: Humphrey GB, Grindey GB, Dehner LP, editors. Adrenal and endocrine tumors in children. Adrenal cortical carcinoma and multiple endocrine neoplasia. Boston: Martinus Nijhoff Publishers, 1984. pp 291–302.
36. Stewart DR, Jones PHM, Jolleys A. Carcinoma of the adrenal gland in children. *J Pediatr Surg* 1974;9:59–67.
37. Gao RN, Levy IG, Woods WG, et al. Incidence and mortality of neuroblastoma in Canada compared with other childhood cancers. *Cancer Causes and Control* 1997;8:745–754.
38. Huddart SN, Muir KR, Parkes S, et al. Neuroblastoma: A 32 year population-based study—implications for screening. *Med Ped Oncol* 1993;21:96–102.
39. Terracini B, Coebergh JW, Gatta G, et al. Childhood cancer survival in Europe: An overview. *Eur J Cancer* 2001;37:810–816.

Q1: Please provide the location of the publisher.

Q2: Please provide the volume number.

Q3: Please provide the name of the publisher.

Q4: Please update the reference.

Q5: Please provide the location of the publisher.

**APÊNDICE 4 - AMPLIFICATION OF THE STEROIDOGENIC FACTOR-1
GENE IN CHILDHOOD ADRENOCORTICAL TUMORS**

J Clin Endocrinol Metab, v.90, n.2, p.615-619, 2005

Amplification of the Steroidogenic Factor 1 Gene in Childhood Adrenocortical Tumors

Bonald C. Figueiredo, Luciane R. Cavalli, Mara Albonei D. Pianovski, Enzo Lalli, Romolo Sandrini, Raul C. Ribeiro, Gerard Zambetti, Luiz DeLacerda, Giovanna Assis Rodrigues, and Bassem R. Haddad

Department of Pediatrics, Center for Molecular Genetics and Cancer Research in Children (CEGEMPAC) (B.C.F., M.A.D.P., G.A.R.), Department of Pediatrics, Division of Pediatric Hematology and Oncology (M.A.D.P.), and Department of Pediatrics, Division of Pediatric Endocrinology (R.S., L.D.), Federal University of Paraná, Curitiba PR 80.030-110, Brazil; Department of Oncology and Institute for Molecular and Human Genetics / Lombardi Comprehensive Cancer Center (L.R.C., B.R.H.), Georgetown University, Washington, DC 20007; Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire Centre National de Ciencia y Tecnologia–Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (E.L.), Université Louis Pasteur, 67404 Illkirch, France; Departments of Hematology-Oncology (R.C.R.) and Biochemistry (G.Z.) and the International Outreach Program (R.C.R.), St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, Tennessee 38105; and Department of Pediatrics (R.C.R.), University of Tennessee, College of Medicine, Memphis, Tennessee 38163

Southern Brazil has one of the highest incidences of childhood adrenocortical tumors (ACTs), occurring 10–15 times more frequently than worldwide estimates. The reasons for this increase remain elusive. In an attempt to further characterize the genetic changes in childhood ACTs, we recently detected a consistent gain of 9q (or a portion of it) in eight of nine cases of pediatric ACTs and amplification of 9q34 in the majority of these cases using comparative genomic hybridization. Other studies involving both childhood and adult ACTs have cor-

roborated these findings. To follow up on these results, we examined whether the steroidogenic factor 1 (*SF-1*) gene, which is located in this chromosomal region and plays an important role in the development and function of the adrenal cortex is amplified in these ACT cases. We detected increased copy number of the *SF-1* gene in all eight cases with 9q gain, suggesting an association between an increased copy number of the *SF-1* gene and adrenocortical tumorigenesis. (*J Clin Endocrinol Metab* 90: 615–619, 2005)

THE INCIDENCE OF childhood adrenocortical tumors (ACTs) is 10–15 times greater in Southern Brazil, particularly in the state of Paraná, compared with the rest of the world (3.4–4.2 cases/million in southern Brazilian states, compared with 0.3 cases/million worldwide) (1). The molecular basis of this disease remains poorly understood, despite several studies investigating the role of particular genes in adrenal tumorigenesis (2). Using comparative genomic hybridization (CGH), we recently evaluated a group of nine cases of pediatric ACTs from southern Brazil and identified a recurrent pattern of chromosomal aberrations. Gain of 9q or a portion of it emerged as the most consistent finding: eight of nine cases showed this gain, and a high level copy number increase (amplification) of 9q34 was detected in five of the eight cases (3). Interestingly, a similar study conducted in the United Kingdom showed gain/amplification of 9q34 in 10 of 11 childhood ACTs (4). Other studies of adult ACTs have also shown frequent gains involving that same chromosomal region (5). Chromosomal segments showing gain/amplification by CGH are generally sites of amplified genes, and gene amplification is one of the ways in which oncogene

activation is achieved. Clearly identification of such genes and characterization of their mechanism of action and its timing is critical to better understand the process of tumorigenesis for a given tumor.

Steroidogenic factor 1 (*SF-1*) is an orphan member of the nuclear receptor family of transcription factors and plays an important role in endocrine function, including the regulation of steroid hydroxylases and the transcription of an array of genes involved in reproduction, male sexual differentiation, and the development and function of the adrenal cortex (6–9). *SF-1* maps to 9q33.3, a chromosomal region that we and others (3, 4) identified as showing a gain/amplification in a high percentage of cases with childhood ACTs. Studies in *SF-1* knockout mice have shown that the adrenal cortex became hypoplastic sometime after embryonic development (10, 11), and *SF-1* was also shown to be essential for the residual adrenal gland growth after unilateral adrenalectomy (12). In humans, the adrenal cortex becomes hypoplastic after birth. Volume of the fetal zone of the human adrenal cortex rapidly involutes after birth decreasing from 70 to 3% of the total adrenal volume (13). The finding of 9q gain in both our previous work and in the study of James *et al.* (4) in childhood ACTs as well as in other studies of adult ACTs, prompted us to conduct the present investigation to identify potential candidate genes involved in childhood adrenocortical tumorigenesis. Because of the intense steroidogenic activity in most childhood cases of ACTs, we investigated *SF-1* on 9q33.3 as one of the amplified candidate genes. We used fluorescence *in situ* hybridization (FISH) analysis to identify

First Published Online November 16, 2004

Abbreviations: ACT, Adrenocortical tumor; BAC, bacterial artificial chromosome; CGH, comparative genomic hybridization; FISH, fluorescence *in situ* hybridization; LOH, loss of heterozygosity; *SF-1*, steroidogenic factor 1; SSC, saline sodium citrate.

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

F-1 amplification in the group of nine childhood ACTs previously analyzed using CGH.

Childhood ACTs, in contrast to ACTs from adults and many other types of cancer, usually occur in individuals with germline TP53 mutations (14). We previously reported a germline point mutation of TP53 encoding an R337H amino acid substitution combined with somatic loss of the second TP53 allele occurring in 35 of 36 childhood ACTs studied from southern Brazil (15). In addition, we evaluated 432 normal individuals from southern Brazil for the presence of the R337H TP53 mutation and none found to be a carrier (data not shown). TP53 maps to chromosome 17p13.1, and its protein consists of four distinct domains: an N-terminal transactivation domain, a central DNA-binding domain, a tetramerization domain (in which arginine 337 is located) and a C-terminal regulatory domain. Arginine 337 forms a salt bridge with aspartic acid 352 across the helix-helix interface to form the tetramer. For this reason, we also evaluated our samples for the presence of that common germline TP53 point mutation and the loss of the wild-type TP53 allele.

This is a follow-up study to our previous work and other studies showing that 9q is a hotspot for amplification in ACT. Because SF-1, which is localized to this region, plays an important role in the development and function of the adrenal cortex, here we investigate its amplification in ACTs.

Patients and Methods

Patient selection

Nine patients with childhood ACTs previously evaluated by CGH (2) were selected for this study. All patients, six girls (aged 9–82 months) and three boys (aged 13–35 months), were referred to the Pediatric Endocrinology Unit of Hospital de Clínicas from Federal University of Paraná, Curitiba, PR, Brazil. A written informed consent, as approved by the Ethics Committee of the Hospital of Clínicas from the Federal University of Paraná, Curitiba, Brazil, was signed by one of the parents of each patient. Patient characteristics are described in Table 1. The tumors were classified as adenomas or carcinomas according to conventional pathological criteria, as previously described (1). Eight tumors were primary and one was a secondary local recurrent tumor (diagnosed almost 2 yr after the resection of the primary tumor). All patients presented with signs and symptoms due to elevated serum levels of androgens and/or glucocorticoids and were described as having functional tumors. Severity of the clinical manifestations was generally proportional to hormone levels and the time between the day of diagnosis and the first documentation of any sign of the disease. Five patients presented with only virilization, whereas the other four presented with

virilization plus Cushing's syndrome. Six of the tumors were classified as carcinoma, whereas three were adenomas (Table 1).

Recurrence was noted only in patient 2 (nine relapses in a period of 5 yr, followed by patient death). Patient 3 was admitted with stage III disease and was operated on but developed a large vena cava thrombus that extended to the right atrium. Eight cycles of chemotherapy (ifosfamide, carboplatin, etoposide, and mitotane) resulted in almost complete atrophy of the thrombus, but the patient died in the intensive care unit as a result of complications of tracheostomy. Complete remission (defined as the complete macroscopic and microscopic tumor resection, absence of distant metastasis, and normalization of all clinical features and laboratory values) was documented for all patients who were alive at the time of the report (seven of nine patients) representing more than 5 yr of survival without local or distant relapse.

FISH

To evaluate the copy number of the SF-1 gene, we designed a FISH probe consisting of a bacterial artificial chromosome (BAC) clone containing sequences of the SF-1 gene: RP11–91G7 (BACPAC Resources, Oakland, CA). BAC clone DNA was prepared and labeled with biotin-11-deoxyuridine 5-triphosphate (Roche, Indianapolis, IN) using nick translation as previously described (16). Biotin-labeled DNA was detected with fluorescein-avidin DCS (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA). Map location of the BAC clone and the hybridization efficiency of the FISH probe as well as the number of FISH signals detected in normal diploid interphase nuclei were assessed in normal lymphocytes according to a standard FISH mapping protocol (17). Correct chromosomal location of the probe to chromosome 9q33.3 and the presence of two signals per diploid nucleus in more than 98% of the 200 interphase nuclei scored were confirmed.

For each tumor, a 4- μ m tissue section was hematoxylin and eosin stained and histologically examined to confirm the presence of tumor tissue, and a consecutive 4- μ m paraffin section was evaluated by FISH using the SF-1 FISH probe as described earlier (16). In brief, the tissue slide was deparaffinized with Xylene, rehydrated with decreasing ethanol concentrations, pepsin digested for 90 min, and then denatured in 70% formamide/saline sodium citrate (SSC) two times for 4 min at 80 C. After overnight hybridization with the probe at 37 C, the slide was washed three times in formamide/SSC \times 2 (1:1) at 42 C, and three times in SSC \times 1 at 42 C. The biotin-labeled probe was detected with avidin conjugated to fluorescein isothiocyanate (Vector Laboratories), and the cells were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole, and embedded in antifade solution [200 mM 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane, 90% vol/vol glycerol, 20 mM Tris-HCl (pH 8)] to reduce photo-bleaching. Scoring of cells and digital image acquisition were performed using a \times 63 objective mounted on a DMRBE microscope (Leica, Wetzlar, Germany) equipped with optical filters for 4',6-diamidino-2-phenylindole and Cy3 (Chroma Technologies, Brattleboro, VT) and a cooled charge-coupled device camera (Photometrics, Tucson, AZ). The IPLab software package (Scanalytics Inc., Fairfax, VA) was used for the initial gray-scale image acquisition and consecutive color processing. Considering artifacts and loss of genomic contents in partially cut nuclei, the following

TABLE 1. Clinical information and summary of the results

Patient no.	Gender	Age (months)	Clinical presentation	ACT pathology	Stage	9q34 status (CGH)	SF-1 FISH results	Germline P53 R337H mutation/LOH
1	F	9.5	Virilization + Cushing	Carcinoma	I	Amp.	Increased copy no. ^a	Mut/LOH
2	F	9	Virilization	Carcinoma	I	Amp.	Increased copy no. ^a	Mut/LOH
3	F	82	Virilization + Cushing	Carcinoma	III	Gain	Increased copy no.	Mut/LOH
4	M	23	Virilization + Cushing	Carcinoma	I	Gain	Increased copy no.	No mut/no LOH
5	M	13	Virilization + Cushing	Carcinoma	II	No gain	Normal	Mut/LOH
6	F	17	Virilization	Carcinoma	I	Amp.	Increased copy no. ^a	Mut/LOH
7	F	27	Virilization	Adenoma		Amp.	Increased copy no. ^a	Mut/LOH
8	M	35	Virilization	Adenoma		Amp.	Increased copy no. ^a	Mut/LOH
9	F	68	Virilization	Adenoma		Gain	Increased copy no. ^a	^b

F, Female; M, male; Mut, mutation present; Amp., amplification.

^aIndicates that four or more copies of the gene were detected in over 30% of the cells (SF-1 amplification identified by FISH).

^bOnly tumor DNA was available and showed the R337H mutation. No LOH data. (See Results section).

scoring system was used: FISH signals in 50 cells for each specimen were counted. Detection of three or more signals in at least 30% of the nuclei with detectable signals was considered as increased copy number per gain. Furthermore, the gene was considered to be amplified in those cases in which 30% or more of the cells showed four or more copies by FISH analysis. In the absence of copy number gain, the presence of two FISH signals per cell in at least 50% of the nuclei was considered as normal diploid.

Estimation of R337H TP53 mutation

Four of the nine patients had the entire *TP53* gene sequenced using DNA prepared from their lymphocytes and were found to have the R337H amino acid substitution (15). The presence of the same mutation was evaluated in the remaining five patients using a previously described PCR/*HhaI*-based assay (15). Loss of heterozygosity (LOH), described as loss of the wild-type *TP53* allele and presence of the R337H *TP53* mutation in the tumor genome, was studied in eight cases as described (15).

Results

SF-1 FISH analysis

FISH analysis using the *SF-1*-specific probe showed increased copy number in eight of the nine specimens, whereas one specimen failed to exhibit copy number gain (majority of cells showing two copies of the gene). Of the eight patients with increased copy number of the *SF-1* gene, six showed four or more copies of the gene in at least 30% of the cells and therefore were considered to have *SF-1* amplification by FISH. There was an excellent correlation between the CGH findings from our earlier study (3) and the FISH analysis: all eight patients with an increased copy number of the *SF-1* gene by FISH had a gain of 9q (or a portion of it) by CGH, whereas the patient with two copies of *SF-1* by FISH did not show 9q gain by CGH. In addition, five of the six patients with four or more copies of the *SF-1* gene (*i.e.* *SF-1* amplification as detected by FISH) were previously found to have an amplification of the 9q34 chromosomal segment by CGH. Amplification of the gene was detected both in the adenomas (two of three cases) and the carcinomas (three of six cases); it was also detected in cases presenting with virilization only (four of five cases) or both virilization and Cushing's syndrome (one of four cases). Of note, we did not observe copy number gain in the normal areas of the tissue sections. Table

1 summarizes the FISH and CGH data. Examples of *SF-1* FISH studies are shown in Fig. 1 (Fig. 1A shows a case with increased copy number of the *SF-1* gene, and Fig. 1B shows case 5 with mostly two copies of the gene).

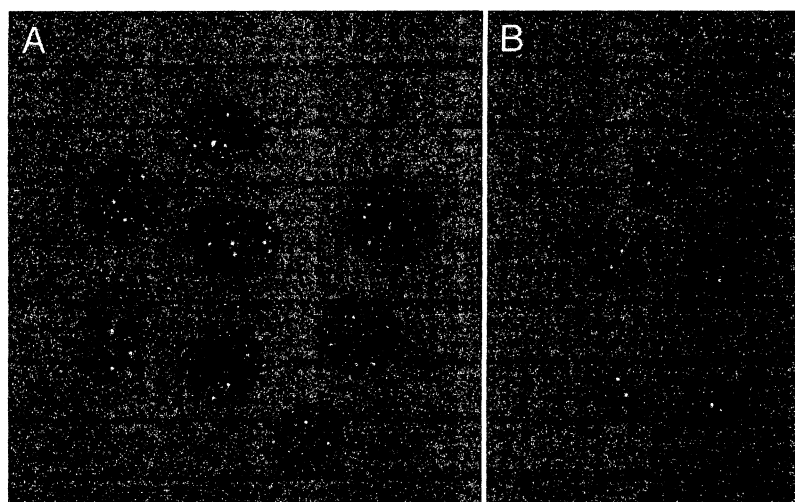
TP53 mutation and LOH analyses

The germline R337H mutation was detected in seven of the nine patients, and the corresponding tumors showed LOH at the *TP53* locus, similar to our findings in an earlier study (15). In one patient (patient 9), only tumor DNA was available, which also revealed the presence of the R337H mutation. No DNA was available from normal tissues from this patient, and we were therefore unable to determine whether the mutation was present in the germline, nor could we confirm LOH at the *TP53* locus in the tumor. Patient 4, a 23-month-old boy with virilization and Cushing's syndrome, did not harbor the germline R337H *TP53* mutation as was found in the other patients. However, we cannot rule out the possibility of a different genetic variant in the *TP53* gene.

Discussion

Studies of ACTs in both adults and children have shown that these tumors are associated with a large variety of chromosomal alterations, high-level amplifications, and losses and gains of DNA material from different chromosomal regions (18–21). However, despite this genetic heterogeneity, these studies have also shown that certain regions of the genome show consistent alterations. 9q34 is among the regions that have been shown to be gained/amplified in both childhood and adult ACTs, thus justifying further investigation (3–5). The orphan nuclear receptor *SF-1*, which plays a key role in endocrine function, maps to 9q33.3. This region is in very close proximity to the common 9q34 amplicon in ACTs. The multiple studies that have described this amplicon, including ours (3–5), have all used conventional chromosomal CGH. However, because of the lower resolution of conventional chromosomal CGH, this method is incapable of accurately delineating the exact boundaries of amplicons; hence, it is very possible that the previously described 9q34

Representative image of *SF-1* FISH evaluation sample (patient 6) showing mostly amplified, Tumor sample with two copies of the gene



amplicon may include the 9q33.3 region and thus the *SF-1* gene (22).

In the present study, we investigated the possible gain/amplification of the *SF-1* gene in childhood ACTs. We used FISH to detect copy number changes of the gene in a cohort of nine tumors that we had previously evaluated using CGH. These cases included six carcinomas and three adenomas. CGH showed chromosomal aberrations in all nine cases. But despite the high number of alterations, we observed a recurrent pattern; the most striking finding was a consistent copy number gain of chromosomal region 9q34 in eight of the nine tumors (3). A similar finding of 9q34 gain was independently observed in other studies of both childhood (4) and adult ACTs (5). For instance, James *et al.* (4) reported a gain of 9q34 in 10 of 11 childhood tumors (nine adenomas and two carcinomas), and Dohna *et al.* (5) observed a gain involving the 9q34 region in 12 of 25 samples (eight adenomas, 14 carcinomas, one metastatic lymph node, and two cell lines). Our FISH analysis was in full agreement with our prior CGH findings. Specifically, all eight patients who showed copy number gain of 9q or a portion of it including 9q34 showed increased copy number of the *SF-1* gene by FISH. The only subject that showed no gain of that region by CGH (patient 5) showed no gain of the *SF-1* gene by FISH (Table 1). Our study does not address the question regarding which portion of the *SF-1* gene is duplicated. However, we are in the process of collecting fresh-frozen ACT tissues to investigate this point in a future study.

Unraveling the complexity behind 9q34 amplification may provide a role that the expression of an amplified gene could play in the pathogenesis of ACTs. We originally hypothesized that the 9q34 amplification detected in our study (3) could indicate the site of an oncogene(s) involved in ACT formation, and thus we proposed that amplification of 9q34 could involve aberrant transcripts of the *ABL1* oncogene; this possibility was ruled out using Southern blot analysis (data not shown). However the *SF-1* gene may not be the only amplified gene in the 9q34 amplicon. Other genes mapped to 9q34 that may play a role in ACT tumorigenesis include the *VAV2* oncogene (23); the *TGF β* receptor-1 gene, which is an activin A receptor type II-like kinase (24); the TNF receptor-associated factor-2 gene (25); the oncogene 24p3 or lipocalin 2 gene (26); and the retinoid X receptor- α .

One consequence of the *SF-1* gene amplification, particularly if it is associated with high expression of the *SF-1* protein, could be an increased steroid hydroxylase activity and steroid production. A recent review of 254 children enrolled in the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry (27) showed that signs of virilization were found in 84.2% of patients, consistent with those of other reports from other continents (27–31). Virilization was observed either alone or accompanied by clinical manifestations of the overproduction of other adrenocortical hormones, including glucocorticoids, androgens, aldosterone, or estrogens. In our study, all patients presented with virilization, and four of the nine had an associated increase in cortisol levels and Cushing's syndrome.

The pivotal role of the *SF-1* gene in controlling the development of the adrenal cortex is well known from studies of the phenotype of *SF-1* null mice (10) and human subjects

harboring heterozygote *SF-1* mutations (32). A direct role of *SF-1* in controlling adrenal cell growth is suggested by recent data showing that *liver receptor homolog-1*, an orphan nuclear hormone receptor closely related to *SF-1*, is involved in cell cycle control in the intestine through regulation of G₁ cyclin genes (33). In the adrenal cortex, the R337H p53 mutant protein may exert a tissue-specific effect inducing genomic instability in the adrenal cortex. In this context, cells harboring amplification of the *SF-1* gene may acquire selective growth advantage, thus escaping from normal mechanisms of growth control. This, together with the accumulation of other genetic lesions, may lead to tumor formation. In the present study, the germline R337H TP53 mutation and the somatic loss of the wild-type TP53 allele were found in seven of the nine patients studied. The most striking association between germline TP53 mutations and cancer is found in cases of childhood ACTs (14). We believe that the germline R337H TP53 mutation combined with LOH (15) under certain conditions of pH and temperature (34) may occur during the development of the adrenal cortex and thus generate ACTs. Of the eight tumors with *SF-1*-increased copy number by FISH, six had the germline R337H TP53 mutation and somatic loss at the TP53 locus (wild-type allele) in the tumor, and one (patient 9) had the R337H TP53 mutation in the tumor (this subject was not tested for germline mutation). The only subject with normal copy number of the *SF-1* gene also showed the TP53 germline mutation and LOH. Chromosomal instability caused by TP53 dysfunction is well documented; in addition, the loss of the wild-type TP53 was shown to predispose to gene amplification and altered cell cycle arrest (35). We believe that the germline R337H TP53 mutation and the somatic loss of the wild-type allele can contribute to genomic alterations and increased *SF-1* copy numbers. Further studies are needed to clarify whether the TP53 mutation and 9q34 amplification, including *SF-1* amplification, are part of a cascade of events leading to ACT oncogenesis, similar to what was reported in other tumors, such as in the multistep progression of colorectal cancer (36).

This is the first study showing an association between an increased copy number of the *SF-1* gene and ACTs. The significance of this observation needs to be further investigated using a larger cohort of both pediatric and adult subjects. Because this gene is detected at the earliest stages of development of the urogenital ridge in which both the gonads and the adrenal cortex are derived and because this expression is maintained throughout development up until adult life (8), further studies examining the mechanisms and consequences of the amplification of this gene in ACTs are critical to a better understanding of the onset and progression of this disease.

Acknowledgments

We thank Drs. Monica Nunes Lima Cat and Janice D. Rone for their scientific input and valuable discussions while preparing the manuscript.

Received May 24, 2004. Accepted November 8, 2004.

Address all correspondence and requests for reprints to: Bassem R. Haddad, M.D., Institute for Molecular and Human Genetics, Georgetown University Medical Center, 3800 Reservoir Road NW, Main 4000, Washington, DC 20007. E-mail: haddadb1@georgetown.edu.

This work was supported by Cancer Center Support Grants CA-21765 and CA-71907 from the National Institutes of Health (Department of Health and Human Services); a Center of Excellence grant from the State of Tennessee; the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico de Brazil; Fundacao Araucaria, Curitiba, Parana, Brazil (01/2001); Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil Grant 419/03; and the American Lebanese Syrian Associated Charities.

References

- Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L 1997 Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:2027–2031
- Latronico AC, Chrousos GP 1997 Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 82:1317–1324
- Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR 1999 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1116–1121
- James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM 1999 Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 81:300–304
- Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P 2000 Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer* 28:145–152
- Rice DA, Mouw AR, Bogerd A, Parker KL 1991 A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. *Mol Endocrinol* 5:1552–1561
- Ikeda Y, Lala DS, Luo X, Kim E, Moisan MP, Parker KL 1993 Characterization of the mouse FTZ-F1 gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. *Mol Endocrinol* 7:852–860
- Wong M, Ikeda Y, Luo X, Caron KM, Weber TJ, Swain A, Schimmer BP, Parker KL 1997 Steroidogenic factor 1 plays multiple roles in endocrine development and function. *Recent Prog Horm Res* 52:167–182
- Parker KL, Schimmer BP 1997 Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 18:361–377
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77:481–490
- Bland ML, Jamieson CA, Akana SF, Bornstein SR, Eisenhofer G, Dallman MF, Ingraham HA 2000 Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:114488–114493
- Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD 2002 Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143:3122–3135
- Bocian-Sobkowska J, Wozniak W, Malendowicz LK 1998 Postnatal involution of the human adrenal fetal zone: stereologic description and apoptosis. *Endocr Res* 24:969–973
- Varley JM 2003 Germline TP53 mutations and Li-Fraumeni syndrome. *Hum Mutat* 21:313–320
- Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Laferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:9330–9335
- Cullen KJ, Newkirk KA, Schumaker LM, Aldosari N, Rone JD, Haddad BR 2003 Glutathione S-transferase pi amplification is associated with cisplatin resistance in head and neck squamous cell carcinoma cell lines and primary tumors. *Cancer Res* 63:8097–8102
- Haddad B, Pabon-Pena CR, Young H, Sun WH 1998 Assignment1 of STAT1 to human chromosome 2q32 by FISH and radiation hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 83:58–59
- Henry I, Grandjouan S, Couillin P, Barichard F, Huerre-Jeanpierre C, Glaser T, Philip T, Lenoir G, Chaussain JL, Junien C 1989 Tumor-specific loss of 11p15.5 alleles in del11p13 Wilms tumor and in familial adrenocortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:3247–3251
- Henry I, Jeanpierre M, Couillin P, Barichard F, Serre JL, Journal H, Lamouroux A, Turleau C, de Grouchy J, Junien C 1989 Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition to adrenocortical carcinoma. *Hum Genet* 81:273–277
- Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, Robertson CN, LaRocca R, Zbar B 1989 Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 81:518–523
- Beckers A, Abs R, Willems PJ, van der Auwera B, Kovacs K, Reznik M, Stevenaert A 1992 Aldosterone-secreting adrenal adenoma as part of multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1): loss of heterozygosity for polymorphic chromosome 11 deoxyribonucleic acid markers, including the MEN1 locus. *J Clin Endocrinol Metab* 75:564–570
- Albertson DG, Pinkel D 2003 Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. *Hum Mol Genet* 12(Spec 2):R145–R152
- Henske EP, Short MP, Jozwiak S, Bovey CM, Ramlakhan S, Haines JL, Kwiatkowski DJ 1995 Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. *Ann Hum Genet* 59:25–37
- Johnson DW, Qumsiyeh M, Benkhalifa M, Marchuk DA 1995 Assignment of human transforming growth factor- β type I and type III receptor genes (TGFBRI and TGFBRI3) to 9q33–q34 and 1p32–p33, respectively. *Genomics* 28:356–357
- Siemienski K, Peters N, Scheurich P, Wajant H 1997 Organization of the human tumour necrosis factor receptor-associated factor 1 (TRAF1) gene and mapping to chromosome 9q33–34. *Gene* 195:35–39
- Chan P, Simon-Chazottes D, Mattei MG, Guenet JL, Salier JP 1994 Comparative mapping of lipocalin genes in human and mouse: the four genes for complement C8 γ chain, prostaglandin-D-synthase, oncogene-24p3, and progesterone-associated endometrial protein map to HSA9 and MMU2. *Genomics* 23:145–150
- Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC 2004 Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol* 22:838–845
- Bergada I, Venara M, Maglio S, Ciaccio M, Diez B, Bergada C, Chemes H 1996 Functional adrenal cortical tumors in pediatric patients: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a long term follow-up series. *Cancer* 77:771–777
- Driver CP, Birch J, Gough DC, Bruce J 1998 Adrenal cortical tumors in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 15:527–532
- Teinturier C, Pauchard MS, Brugieres L, Landais P, Chaussain JL, Bougneres PF 1999 Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. *Med Pediatr Oncol* 32:106–111
- Wolthers OD, Cameron FJ, Scheimberg I, Honour JW, Hindmarsh PC, Savage MO, Stanhope RG, Brook CG 1999 Androgen secreting adrenocortical tumours. *Arch Dis Child* 80:46–50
- Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL 1999 A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22:125–126
- Botrugno OA, Fayard E, Annicotte J-S, Haby C, Brennan T, Wendling O, Tanaka T, Kodama T, Thomas W, Auwerx J, Schoonjans K 2004 Synergy between LRF-1 and β -catenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. *Mol Cell* 15:499–509
- DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, Zambetti G, Kriwacki RW 2002 A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 9:12–16
- Livingstone LR, White A, Sprouse J, Livanos E, Jacks T, Tlsty TD 1992 Altered cell cycle arrest and gene amplification potential accompany loss of wild-type p53. *Cell* 70:923–935
- Volgestein B, Kinzler KW 1993 The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 9:138–141

JCEM is published monthly by The Endocrine Society (<http://www.endo-society.org>), the foremost professional society serving the endocrine community.

**APÊNDICE 5 - SF-1 OVEREXPRESSION IN CHILDHOOD
ADRENOCORTICAL TUMORS**

Submetido para publicação ao **J Clin Endocrinol Metab**

SF-1 Overexpression in Childhood Adrenocortical Tumors

^{1,3}Mara A. D. Pianovski, ²Luciane R. Cavalli, ³Bonald C. Figueiredo, ³Savana C. L. Santos, ⁴Mabrouka Doghman, ⁵Raul C. Ribeiro, ⁶Edson Michalkiewicz, ³Giovanna A. Rodrigues, ⁷Gerard Zambetti, ²Bassem R. Haddad, ⁴Enzo Lalli*

¹Division of Pediatric Hematology and Oncology, Department of Pediatrics, Federal University of Paraná, Curitiba PR, Brazil

²Department of Oncology and Institute for Molecular and Human Genetics/Lombardi Comprehensive Cancer Center, Georgetown University Medical Center, 3800 Reservoir Rd, NW, M4000, Washington D.C. 20007, USA

³Department of Pediatrics, Center for Molecular Genetics and Cancer Research in Children CEGEMPAC, Department of Pediatrics, Federal University of Paraná, Curitiba PR, Brazil

⁴Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire CNRS UMR 6097 Sophia Antipolis, 06560 Valbonne France

⁵Department of Hematology-Oncology, and the International Outreach Program, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis TN 38105, USA

⁶Division of Pediatric Oncology Surgery, Erasto Gaertner Hospital, Curitiba PR, Brazil.

⁷Department of Biochemistry, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis TN 38163, USA

*To whom correspondence should be addressed

Corresponding Author: Enzo LALLI

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire CNRS
UMR 6097
660 route des Lucioles
Sophia Antipolis,
06560 Valbonne France
Tel. +33 4 93 95 77 55
Fax +33 4 93 95 77 08

Key words: FISH, Steroidogenic Factor 1 (SF-1), adrenal cortex, childhood tumors

Running title: SF-1 in pediatric ACT

WORD COUNT: 1627

TABLES: 1

REFERENCES: 20

FIGURES: 1

Context: *SF-1* (steroidogenic factor 1; *NR5A1*) encodes a transcription factor which plays a pivotal role in the regulation of adrenogenital development. We have recently shown that the *SF-1* gene is amplified in childhood adrenocortical tumors (ACT).

Objective: This study was aimed to assess whether an *SF-1* gene copy number increase translates into increased protein levels and to study the correlation between *SF-1* expression and clinical parameters in ACT patients.

Design: *SF-1* protein levels were measured in ACT specimens of 10 children, 6 girls and 4 boys, aged from 11 months to 11 years old, and in 11 normal adrenals from age-matched subjects. *SF-1* gene copy numbers were measured in all ACT samples by fluorescence *in situ* hybridization (FISH).

Results: Increased *SF-1* gene copy number was detected in eight of the ten ACT cases. Conversely, the *SF-1* protein was overexpressed in all cases, compared to normal adrenal cortex. No significant correlation was found between *SF-1* protein levels and its gene copy number. Furthermore, no significant correlation existed with histological grade or with the clinical manifestation or evolution of the disease.

Conclusion: *SF-1* overexpression is a widespread finding in childhood ACT and is likely to play a role in its pathogenesis.

Tumors of the adrenal cortex are rare in children, with the highest incidence localized in southern Brazil. Here adrenocortical tumors occur at a rate of 3.4 - 4.2 cases per million children under the age of 15, which is 12-18 times higher than worldwide estimates (1, 2).

Ribeiro *et al.* (3) identified a *TP53* R337H germline mutation that is consistently present in children from southern Brazil bearing adrenocortical tumors. This mutation is associated with loss of heterozygosity (LOH) at the *TP53* locus, with elimination of the wild-type *TP53* gene in the tumors. The *TP53* R337H mutation is the main genetic alteration involved in the initial formation of ACT in these children (3). Among sporadic adult ACT, genetic alterations such as LOH of 11p, 13q and 7p, ACTH receptor gene mutations and 17q amplifications were identified (4). In childhood ACT, using comparative genomic hybridization (CGH), we have shown that the most consistent genetic abnormality is an amplification of 9q34, which was detected in 8/9 cases of pediatric ACT from southern Brazil (5). A similar study conducted in Britain showed similar 9q34 amplification in 10/11 patients (6). These findings led us to propose that the 9q34 amplification is an event intrinsically related to the biology of this type of cancer and is not related to environmental factors (7). Several genes related to tumor development are located in the 9q34 region, such as the *ABL1* oncogene, which was not found to be amplified in ACT (our unpublished data). It is noteworthy that the steroidogenic factor 1 (*SF-1*) gene maps to 9q33.3 (8), a region in close proximity to the common 9q34 amplicon in ACT. We have recently shown an increase in copy number of the *SF-1* gene by fluorescence in situ hybridization (FISH) in the same group of ACT samples we had evaluated by CGH (9).

SF-1 (also known as Ad4BP) encodes a member of the nuclear hormone receptor superfamily (NR5A1 according to the standard nomenclature), which plays a key role in the regulation of adrenal gland development and in the expression of steroidogenic enzymes (see 10 for a review).

The purpose of the present study was to ascertain whether an increased *SF-1* copy number in pediatric ACT translates into an increase in SF-1 protein levels in the tumors. The study analyzed 10 childhood tumors from 6 girls and 4 boys, aged between 11 months and 11 years. All carried the *TP53* R337H mutation, inherited from one of the parents, and had loss of heterozygosity (LOH) at the *TP53* locus in the tumors.

In children, ACT are associated with symptoms related to the production of androgens (virilizing form, >85% of cases), glucocorticoids (Cushing's syndrome) and less frequently to the production of mineralocorticoids (Conn's syndrome) or estrogens (feminizing syndrome) (1, 2). On the other hand, SF-1 is considered as a regulator of steroidogenic gene expression (10). For this reason, the correlation of SF-1 protein levels and hormonal production by the tumors was also analyzed.

Patients and Methods

Subjects

The study included 10 children with ACT (6 boys and 4 girls), of age ranging from 11 months to 11 years. Histologically, three tumors were classified as adenomas and seven as carcinomas. Eleven normal adrenal glands resected from age-matched children undergoing surgery for Wilms' tumor were used as controls. All patients and control subjects were included in the study after one of the parents or legal representatives signed an informed consent form approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of the Federal University of Paraná.

Seven patients presented with virilization and three with virilization and Cushing's syndrome. Of the ten patients analyzed in this study, four died of disease progression, while six remain alive (Table 1). All patients included in this study carried the germ-line *TP53* R337H mutation previously described (3) and had *TP53* LOH in the tumor (3; 11).

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

To evaluate copy number changes of the *SF-1* gene in ACT, we employed fluorescence *in situ* hybridization (FISH) using a probe for the *SF-1* gene, as we have previously reported (9). In brief, the FISH probe consisted of a bacterial artificial chromosome (BAC) clone containing sequences of the *SF-1* gene: RP11-91G7 (BACPAC Resources, Oakland, CA). BAC clone DNA preparation, labeling and FISH conditions were all described in detail earlier (9). Considering artifact and loss of genomic contents in partially cut nuclei, FISH signals in 50 cells for each specimen were counted. The presence of 2 FISH signals per cell in at least 50% of the nuclei

was considered as normal diploid. 3 fluorescence signals in at least 30% of the nuclei with detectable signals was considered as increased copy number/gain. Amplification was scored in those cases where 30% or more of the cells showed 4 or more copies of the *SF-1* gene.

Immunoblot

10 ACT and 11 normal adrenal cortex samples were homogenized in Laemmli buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue) containing 5% β -mercaptoethanol. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred to a PVDF membrane. Immunoblot was performed using a chemiluminescence system for protein detection (Amersham Biosciences, UK). Primary antibodies used were anti Ad4BP/SF-1 rabbit antiserum (a kind gift of K. Morohashi) and mouse monoclonal anti lamin (clone 14; Upstate, Lake Placid, NY). For each sample, band intensities were quantified by the ImageJ software and SF-1 signals normalized by the respective lamin A/C signals. The Mann-Whitney U test was used to assess differences between groups. A p level <0.05 was considered as significant.

Results

SF-1 gene copy numbers in ACT

Of the ten pediatric adrenocortical tumors analyzed by FISH, 8 had increased copy number of the *SF-1* gene, while two were diploid for *SF-1*. Normal adrenocortical tissues always showed a diploid number of *SF-1* copies (data not shown). Of the 8 specimens with increased copy number of the *SF-1* gene, 6 display gene amplification, showing 4 or more copies of the gene in 30% or more of the analyzed cells (Table 1).

SF-1 protein is overexpressed in childhood ACT

SF-1 protein expression was analyzed by immunoblot in the same tumors studied by FISH (Figure 1). SF-1 is significantly overexpressed in all adrenocortical tumors analyzed, compared to normal adrenal cortex (mean \pm SEM 6.24 \pm 1.27 A.U. vs. 1.35 \pm 0.64 A.U., p<0.001). The levels of SF-1 protein expression were not correlated

with *SF-1* gene copy status, nor with the clinical, pathological and biochemical parameters studied (Table 1).

Discussion

Childhood adrenocortical tumors are believed to derive from the fetal adrenal gland, probably through a process of defective apoptosis (12). *SF-1* plays a pivotal role in adrenal development. Mice null for both *Sf-1* alleles have no adrenal glands nor gonads (13), while *Sf-1* haploinsufficiency in mice determines a reduced adrenal gland size (14) and a blunted compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy (15). In humans, different heterozygote *SF-1* mutations may cause various degrees of adrenal and/or gonadal insufficiency (see 16 for a review).

In the present study we evaluated SF-1 protein expression in 10 cases of childhood ACT, where *SF-1* gene copy number was also measured by FISH. An increase in *SF-1* gene copies was detected in 8 cases out of ten, with 6 cases presenting gene amplification (4 or more gene copies detected in over 30% of the tumor cells). This data confirm and extend our previous findings (9). On the other hand, SF-1 protein was found to be overexpressed in all tumors, compared to normal adrenal cortex. No significant correlation existed between SF-1 protein levels and *SF-1* gene copy status in ACT, nor with any of the clinical parameters examined. Likewise, no difference in the extent of *SF-1* gene copy or increased protein levels existed between adenomas and carcinomas (Table 1). This data suggest that the increased SF-1 protein expression observed in our ACT cases is not exclusively regulated by gene dosage and that additionally to gene amplification, epigenetic mechanisms are likely to be involved in this process.

In consideration of the fundamental role of SF-1 in normal adrenal development, it is tempting to speculate that its overexpression may represent an important mechanism of tumor genesis and progression in pediatric ACT. Under this perspective, it is remarkable that SF-1 represents the target of MAPK and, possibly, phospholipid signalling pathways (17, 18). Further studies in cell lines and transgenic mice are in progress to assess the role played by *SF-1* in childhood adrenocortical tumorigenesis.

Acknowledgements

We thank K. Morohashi for the gift of the anti Ad4BP/SF-1 antibody. This study was supported by grants from CNRS (Programme ATIP), Fondation pour la Recherche Médicale, CAPES-COFECUB (419/03), National Institutes of Health (CA71907; CA21765) and the American Lebanese Syrian Associated Charities.

REFERENCES

1. **Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda ECM, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, DeLacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro, RC** 2004 Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors. An analysis of 254 cases from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol* 22: 838-845
2. **Pianovski MAD, Maluf EMCP, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, Zancanella P, Figueiredo BC** 2005 Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr. Blood Cancer* Sep 30 [Epub ahead of print]
3. **Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R** 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 9330-9335
4. **Koch CA, Pacak K, Chrousos GP** 2002 The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endoc Metab* 87: 5367-5384
5. **Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovski MAD, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR** 1999 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endoc Metab* 84: 1116-1121
6. **James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM** 1999 Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 81: 300-304
7. **Figueiredo BC, Ribeiro RC, Zambetti G, Haddad BR, Pianovski MAD, Pereira RM, DeLacerda L, Sandrini R** 2000 Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. *Braz J Med Biol Res* 33: 1217-1224
8. **Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM, Seldin MF** 1995 Homologs of *Drosophila* Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* 25: 565-567
9. **Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MAD, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR** 2005 Amplification of the steroidogenic factor 1 (SF-1) gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 615-619
10. **Val P, Lefrançois-Martinez AM, Veyssi re G, Martinez A** 2003 SF-1: a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept* 1: 8
11. **Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SIB, Boffetta P, Ribeiro RC** 2005 Penetrance of adrenocortical tumors associated with the germline *TP53* R337H mutation. *J Med Genet* July 20 [Epub ahead of print]

12. **Wilkin F, Gagné N, Paquette J, Oligny LL, Deal C** 2000 Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. *J Clin Endocrinol Metab* 85: 2048-2056
13. **Luo X, Ikeda Y, Parker KL** 1994 A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 77: 481-490
14. **Bland ML, Jamieson CAM, Akana SF, Bornstein SR, Eisenhofer G, Dallman MF, Ingraham HA** 2000 Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14488-14493
15. **Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD** 2002 Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology* 143: 3122-3135
16. **Jameson JL** 2004 Of mice and men: the tale of steroidogenic factor-1. *J Clin Endocrinol Metab* 89: 5927-5929
17. **Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, Ingraham HA** 1999 Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell* 3:521-526
18. **Krylova IN, Sablin EP, Moore J, Xu RX, Waitt GM, MacKay JA, Juzumiene D, Bynum JM, Madauss K, Montana V, Lebedeva L, Suzawa M, Williams JD, Williams SP, Guy RK, Thornton JW, Fletterick RJ, Willson TM, Ingraham HA** 2005 Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. *Cell* 120: 343-355
19. **Marshall WA, Tanner JM** 1969 Variations in pattern of pubertal changes in girls. *Arch Dis Child* 44: 291-303
20. **Marshall WA, Tanner JM** 1970 Variations in the pattern of pubertal changes in boys. *Arch Dis Child* 45:13-23

Table 1. Clinical and molecular data of ACT patients.

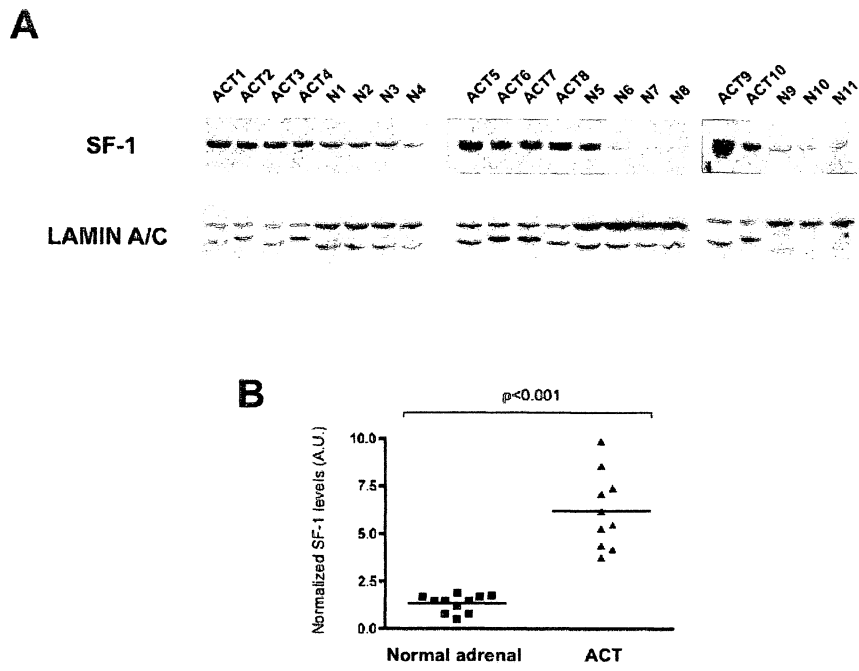
ID	Age (months)	Gender	Clinical manifestation	Histology	Clinical stage	Tumor volume (cm ³)	Outcome	Cortisol (µg/dL)	DHEA-S (times above normal)	Virilization signs P(1-5)/Acne	SF-1 Copy number
1	139	F	V	Ad	I	90	A	19,6	9	5/yes	Amplified ¹
2	43	F	V	Ad	I	21	A	10,8	17	4/yes	Normal
3	11	F	C	Ad	I	24	A	10,9	14	3/no	Increased ²
4	52	F	V	Ca	II	1800	D	25,4	>3	3/yes	Amplified ¹
5	110	M	V+C	Ca	II	968	D	51,5	10	5/no	Amplified ¹
6	21	M	C	Ca	I	61	A	10,1	2	3/yes	Amplified ¹
7	25	M	V+C	Ca	I	108	A	23,5	ND	3/yes	Amplified ¹
8	39	F	V	Ca	III	1450	D	13,5	ND	3/yes	Amplified ¹
9	72	M	V	Ca	III	196	D	23,9	ND	1/no	Increased ²
10	130	F	V+C	Ca	II	924	A	21,5	2	3/yes	Normal

Clinical manifestations were virilization (V) and/or Cushing's syndrome (C). Outcome: alive (A) or deceased (D). Among the virilization signs examined were the degree of pubic hair growth according to Tanner stages (P1 to P5) (19, 20) and the presence of facial acne. ¹Indicates that 4 or more copies of the *SF-1* gene were detected in over 30% of the cells by FISH. ²Indicates that 3 copies of the *SF-1* gene were de

Figure legends

1. A Immunoblot showing SF-1 (top) and lamin (bottom) expression in 10 ACT (ACT1 to 10) and 11 normal adrenal (N1-N11) samples. **B** Quantification of the SF-1 signal, corrected by the value of the lamin signal, in normal adrenal vs. ACT samples. Data is expressed in arbitrary units (A.U.). One arbitrary unit is defined as [(value of SF-1 signal/value of lamin A/C signal)x10]. The mean value of each population is indicated with a horizontal bar. The Mann-Whitney U test was used to assess the presence of a statistically significant difference between the two groups ($p < 0.001$).

Figure 1



**APÊNDICE 6 - CORRELATION BETWEEN THE DAX-1 ARRAY
TRANSCRIPT AND PROTEIN EXPRESSION IN
CHILDHOOD ADRENOCORTICAL TUMORS**

Em preparação

Correlation between the DAX-1 array transcript and protein expression in childhood adrenocortical tumors

¹Figueiredo BC, ²Pianovski MD, ³West A, ⁴Lalli E, ⁵Sandrini R, Caleffe L
⁶Ribeiro RC, ⁷Gonçalves A, ⁷Mastellaro MJ, ⁵Michalkiewicz E, ³Zambetti G.

¹Center for Molecular Genetics and Cancer Research in Children (CEGEMPAC),
²Department of Pediatrics, Division of Pediatric Hematology and Oncology,
Federal University of Parana, Curitiba PR, Brazil

³Department of Biochemistry, St. Jude Children's Research Hospital, Memphis,
TN, USA

⁴Instituto de Genética e Biologia Molecular e Celular, Illkirch, France.

⁵Department of Pediatrics, Division of Pediatric Endocrinology, Federal
University of Parana, Curitiba PR, Brazil

⁶Department of Hematology-Oncology, St. Jude Children's Research Hospital,
Memphis, TN, USA.

⁷Infantil Center Domingos Boldrini, Campinas - São Paulo - Brazil

Key words: adrenocortical, Cushing syndrome, virilization, children, DAX-1

Corresponding Author : Gerard Zambetti

Department of Biochemistry
St. Jude Children's Research Hospital
342 Fort Lauderdale St.,
Memphis, TN,
EUA

ABSTRACT:

This study seeks to evaluate the role played by DAX-1 in childhood adrenocortical tumors (ACT), verify whether there is a correlation between the levels of DAX-1 transcripts and protein expression with the histopathology (adenoma or carcinoma), and with clinical or hormonal characteristics as well. It is believed that the main responsible for the high ACT incidence in southern Brazil is the p53 R337H mutation in germinative lineage (substitution of guanine by adenine), and it has been previously identified that only one of the patients subject of this study did not have this mutation. Altogether, 14 children (3 adenomas and 11 carcinomas), 10 girls and 4 boys ranging from 9 months to 12 years and 6 months were diagnosed. Furthermore, normal adrenocortical samples discarded from surgeries in children with Wilms tumor were examined. The protein concentrations were analyzed by Western blot and the DAX-1 transcripts were identified with GeneChip® U133A 2.0 (Affymetrix GCOS® software). A high concentration of transcripts and an increase in DAX-1 expression were found in most of the ACT cases researched. The increase in transcripts was greater than the one of protein expression in almost all samples, being superior in adenomas, followed by carcinomas and normal adrenal cortex. No correlation was found between the DHEA-S, testosterone or cortisol levels, virilization degree, and the DAX-1 transcripts or protein expressions. Such data suggests that the high DAX-1 level may be part of a regulating mechanism acting against the synthesis of steroids activated by SF-1, or inhibiting tumor suppression factors such as inhibin α -subunit.

INTRODUCTION:

Adrenocortical tumors (ACT) are rare in children (PARKIN et al, 1998). Estimates based on mortality analysis from the metropolitan area of Curitiba,

Paraná State, Brazil (Pianovski et al, submitted), lead us to believe that the incidence of ACT cases in children under 15 is at least twice as high as previously reported by Sandrini and associates (1997), whose estimates are based upon hospital records. They have found an incidence of 3,4 million children until 15 years old. It is believed that the main factor causing the high number of cases in southern Brazil is the p53 R337H mutation (substitution of guanine by adenine), which to date is believed to be inherited from one of the parents, and found in approximately 95 of the ACT cases (RIBEIRO et al, 2001). In other countries, reports of childhood ACT, mainly in the first years of life, are generally of families with Li Fraumeni syndrome (LI & FRAUMENI, 1969, MALKIN et al, 1990, SRIVASTAVA et al, 1990 VARLEY et al, 1997, BIRCH et al, 2001). It was discovered that the amplification of the 9q34 region (FIGUEIREDO et al, 1999) in children of this area is, at least partly, due to the amplification of the steroidogenic 1 factor (SF-1) (FIGUEIREDO et al, 2004), found at 9q33 (TAKETO et al, 1995). Nevertheless, such abnormality was also found in ACT of European children (JAMES et al, 1999), in some adult ACTs (DOHNA et al, 2000), but not in other studies with adult patients (JAMES et al, 1999; KJELLMAN et al., 1996), suggesting this to be an age group characteristic. The fact that the amplification was found by comparative genomic hybridization in 9q34, may be a result of technical resolution limitations, and represents the SF-1 amplification found by FISH in 9q33. The development of SF-1 in ACT may be related to the production of androgens and/or glucocorticoids which lead to virilization and/or Cushing syndrome in over 90 of the childhood cases (RIBEIRO & FIGUEIREDO, 2004).

DAX-1 (NROB1) is an unusual member of nuclear hormonal receptor superfamily, and is codified by a gene located in Xp21 (ZANARIA et al, 1994). Alterations in the expression of this gene may cause phenotypic sexual reversion in XY individuals (BARDONI et al, 1994) and adrenal hypoplasia congenita

(HAC) associated to hypogonadotropic hypogonadism. (HHG) (MUSCATELLI et al, 1994).

DAX-1 expression pattern is restricted to tissues directly related to the production of steroid hormones and/or reproductive function: adrenocortex, Leydig and Sertoli cells, teca and granulosa cells, anterior pituitary gonadotropic cells and hypothalamic ventromedial nucleus. This pattern supersedes that of SF-1 expression (IKEDA et al, 1996; TAMAI et al, 1996), suggesting different functions (IKEDA et al, 2001).

DAX-1 works as a negative regulator of SF-1-induced transactivation (LALLI et al, 2003; ITO M. et al, 1997). DAX-1 may repress the SF-1 transactivation by either binding to the gene promoter regulated by SF-1 (e.g. StAR) (ZAZOPOULOS et al, 1997), or by binding to the SF-1 molecule through one of the LXXLL motifs present in the N-terminal region of DAX-1 (SUZUKI et al, 2003).

The presence of SF-1 functional binding loci Dax-1 promoting region (YU et al, 1998) and the reduced Dax-1 expression in transgenic mice without SF-1 (KAWABE et al, 1999; HOYLE et al, 2002) suggest a mechanism of negative feedback to control the SF-1 activity in steroidogenic and reproductive tissues (NACHTIGAL et al, 1998).

Thus, the objective of this work was to ascertain the DAX-1 expression in ACT, seeking to establish whether there is a relation between the clinical form presentation (virilizing or mixed) and other ACT characteristics.

Patient Selection and Methods

This study included 14 children, 10 boys and 4 girls, corresponding to 3 adenomas and 11 carcinomas, aging from 9 months to 12 years and 6 months when diagnosed. Patients were included in this study upon written authorization from one of the parents or legal representative, by means of a informed consent approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas of Paraná Federal

University. Parents whose normal adrenal glands were resected during nephrectomy due to Wilms tumor also signed the term. Regarding the clinical form, 7 were virilizing (all adenomas and 4 carcinomas), and 7 carcinomas presented the mixed form (virilizing + Cushing). The 3 patients with adenomas survived, as well as 6 of the 11 patients with carcinoma (table 1). Tissue samples obtained during surgery were selected, except for areas of necrosis (observed only in carcinomas), but it was not possible to estimate the degree of metabolic viability in stages preceding necrosis.

Identification of R337H Tp53 mutation

Thirteen of the 14 patients presented the R337H Tp53 mutation in leukocytes, and loss of heterozygosity in ACT (data published by Ribeiro et al, 2001 and Figueiredo et al, submitted.)

Extraction and preparation of total RNA and analysis of micro-arrays utilizing oligonucleotides

Total RNA was extracted from 50 to 100mg of each ACT or normal adrenocortical tissue of children, with the Qiagen RNeasy RNA Midi-Prep® (Valencia, CA) kit. Fine slices were obtained from the samples of ACTs and normal adrenocortex at 4 °C. Following, these cuts were placed in RLT buffer containing β -mercaptoethanol at 1:100 and then homogenized in a 3 cm³ syringe with 18 gauge needle. Total RNA was isolated using the protocol for animal tissue supplied by the kit's manufacturer, and then the pellet was dissolved in 300 μ l of RNAase-free water. Total RNA was concentrated by means of ethanol precipitation.

The human genome GeneChip® U133A 2.0 was utilized to analyze the gene expression. Complementary RNA and the gene-chip analysis were performed by the Hartwell Center of Bio-informatic at the St. Jude Children's Research

Hospital, Memphis, TN, USA, in terms of the GeneChip® technical manual proposed for gene expression analysis and supplied by Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA).

Western-blot

Tumor and normal adrenal cortex samples were kept at -85°C until processing, and later analyzed in two assays. The 14 ACT and 3 normal samples of children affected by Wilms tumor who were submitted to nephrectomy and incidental adrenalectomy were prepared for Western blot at the Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire in Illkirch, France, and at the Center of Molecular Genetics and Childhood Cancer Research (CEGEMPAC).

The technique utilized was Western-blot, with electrophoresis in polyacrilamide gel (PAGE) and sodium dodecil sulfate (SDS), followed by electrotransference to nitrocellulose membranes (NC), as per TOWBIN et al, 1979. The antibodies utilized were antibody 2F4, anti-DAX-1, mice monoclonal, directed against the peptide corresponding to residuals 135 to 166 of human DAX-1, and the monoclonal anti-LDH (Sigma) antibody, for controlling concentration of proteins/samples, gently ceded by Drs. Enzo Lalli and Paolo Sassone-Corsi, from the Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France. After electrophoretic migration, the NC membrane was x-rayed and the corresponding image scanned and transferred to Biorad computer program, which quantifies the protein expression by optic densitometry, for each sample, in relation to DAX-1 and LDH.

Statistical Analysis.

Laboratory and clinical data (type of clinical presentation, hystologic type, staging and evolution) were compared to the average number of transcripts and to the protein expression of DAX-1, being that the Mann-Whitney test was used for independent samples and Student's "t" test for continuous samples. Pearson's

correlation coefficient was employed to evaluate eventual correlations between the groups.

RESULTS

DAX-1 transcripts obtained by micro-array

GeneChip® U133A 2.0 identified up to 14.500 genes, including 18.400 transcripts and variants, employing 22.000 probe groups. The preliminary results were gathered with Affymetrix GCOS®. For functional genomic analysis the Spotfire® Decision Site software (Somerville, MA) was utilized in order to evaluate and record the gene's primary expression..

The relative concentrations of DAX-1 transcripts were obtained from 14 ACTs (11 carcinomas and 3 adenomas) and 3 normal adrenal cortex from patients who underwent surgery to extract Wilms' tumor, with probe groups with 11 oligonucleotides. The signal intensity, representing the proportion of hybridization, and consequently the gene expression for each sample, was presented in figure 1 in arbitrary units. The adenomas had significantly greater transcript averages than the carcinomas. ($p < 0.05$) (figure 1).

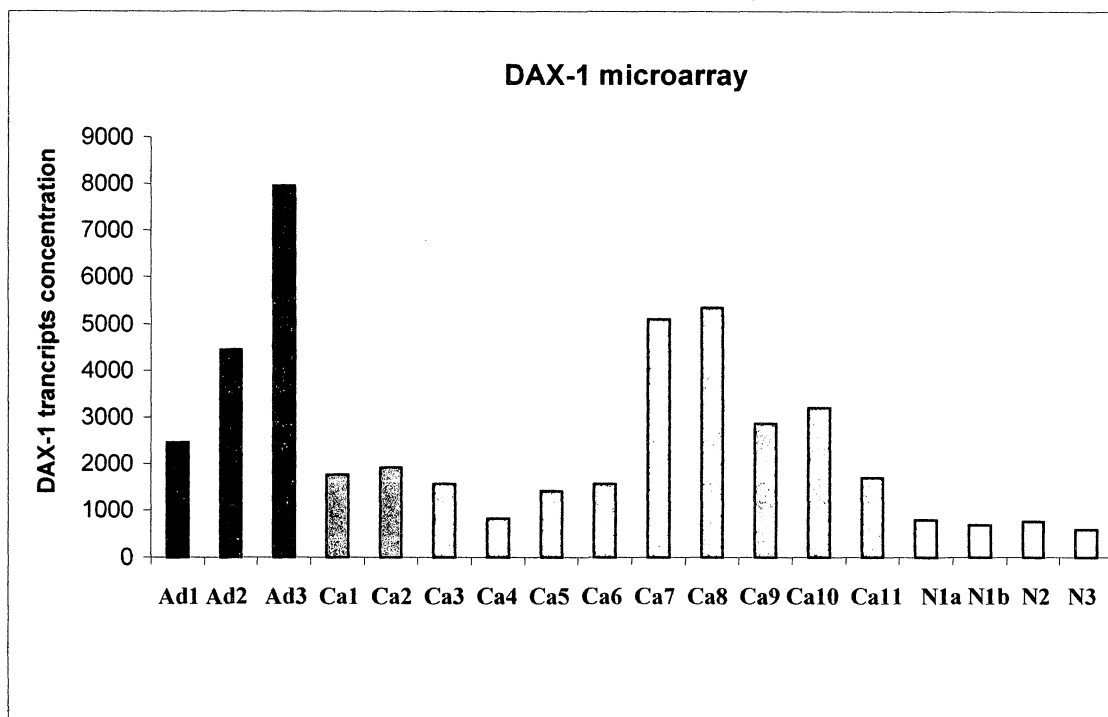


Figure 1. Relative concentration of DAX-1 transcripts in adenomas (Ad, dark bars), carcinomas (Ca, gray bars) and normal adrenal cortex (N, white bars).

Western blot

The DAX-1 e LDH protein blots were obtained from the 14 ACT (11 carcinomas and 3 adenomas) and 3 normal adrenocortex from patients who underwent surgeries to extract Wilms tumors. The intensities of the DAX-1 blots for each sample, as shown in figure 2, were estimated as optical densities, which were divided by the corresponding LDH protein optical density. The results of each DAX-1/LDH relation to every sample are presented in figure 2. Adenomas have been found to have a superior DAX-1 average expression to carcinomas ($p < 0.05$) (figure 1).

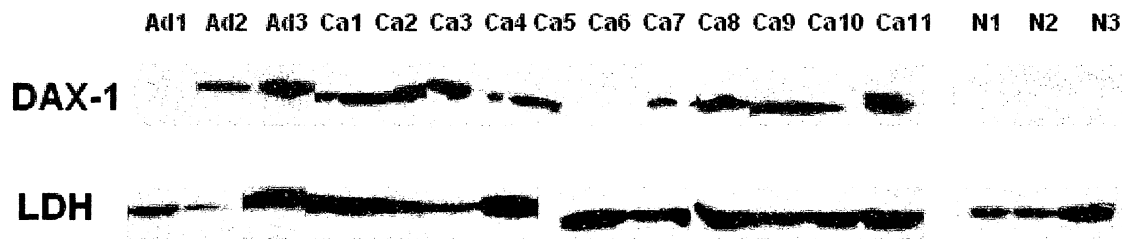


Figura 2. DAX-1 protein blots, visualized at 50 kDA, and LDH at 35 kDA. The 3 adenoma (Ad), 11 carcinomas (Ca) 3 normal adrenal cortex (N) samples of children are shown in the upper part. The LDH blots reflect the quantity of protein used in each sample.

Table 1. Clinical, hystologic and laboratory charateristics compared to the transcript and DAX-1 protein levels

	AGE (months)	SEX	CLINICAL FORM	HISTOLOGY	EC/	Tumor size (cm ³)	Current Status	Cortisol (µg/dL)	DHEA-S (Times > normal)	Degree of Virilization P(1-5) / Acne	DAX-1 transcripts (arbitrary units)	DAX/ LDH (optical density)	Protein DAX-1
1	32	F	V	Ad1		20	A	10,2	1	2-yes	2458	0,35	146
2	43	F	V	Ad2		21	A	10,8	17	4-yes	4448	1,18	492
3	139	F	V	Ad3		90	A	19,6	9	5-yes	7948	0,96	400
Avg*± SD						43 ±32					4952 ±2779	0,83 ±0,43	346 ±179
4	9	F	V+C	Ca1	II	527	A	43,3	29	3-yes	1765	0,24	100
5	20	F	V	Ca2	II	338	A	24,8	>3	3-no	1918	0,34	142
6	130	F	V+C	Ca3	II	924	A	21,5	2	3/yes	1567	0,59	246
7	59	F	V	Ca4	II	384	D	12,4	5	2-yes	816	0,43	179
8	25	M	V+C	Ca5	I	108	A	23,5	-	3-yes	1569	0,16	67
9	9	F	V+C	Ca6	II	450	A	32,2	44	3-yes	5102	0,67	280
10	18	F	V	Ca7	I	120	A	11	>3	2-yes	5350	0,67	279
11	110	M	V+C	Ca8	II	968	D	51,5	10	5-no	2871	0,53	221
12	21	M	V	Ca9	I	61	A	10,1	2	3-yes	3213	0,25	104
13	152	F	Haldo + C	Ca10	IV	369	D	31,3	1	4-no	1702	0,58	242
14	50	M	V+C	Ca11	II		A	50,9	-	3-yes	1412	0,35	146
Avg	63,8					424					2480	0,43	182
±SD **	53,56					±315					±1510	±0,18	±75
Global											3010	0,52	217
Avg.±SD***											±2012	±0,29	±129
N1											793	0,26	
N1b											683	0,27	
N2											759	0,18	
N3											591		
Avg±SD****											707±890,24±0,05		100

Patients presented virilization (Vir), Cushing syndrome (C) or hiperladosteronism (Haldo). A=Alive, D=deceased. Average obtained in adenomas (Ad) (*), carcinomas (Ca) (**), adenomas + carcinomas (***) and normal adrenal cortex (****). The degree of pubic pilification (P1 to P5) was based on Tanner's puberal development scale [MARSHALL & TANNER, 1969 and 1970]. The proportion of tissue volume of tumors is around 1.5 to 100 times greater than the cortex size of both normal glands, which range around 3,2 to 4,8 cm³ (RUBIN et al, 1996) The average serum concentrations of testosterone for adenomas and carcinomas were 92 ± 111 ng/dL and 828 ±1267 ng/dL, respectively, and for DHEA-S we had 5237 ± 4646 and 6093 ± 9638 (average ± SD). Nevertheless, the individual values (not shown) do not correlate with the respective transcript and DAX-1 protein values in each tissue sample.

There was significant correlation ($r=0,69$) among all transcript concentrations and the respective protein proportions (figure 1). When compared in terms of histologic groups (adenoma or carcinoma), it has been observed that the correlation decreases, but to a significant value ($r=0,59$ for adenoma and $r=0,54$ for carcinoma) (figure 1).

DISCUSSION

Using two different methodologies, the present study shows the agreement between elevated concentrations of messenger RNA and the increase of DAX-1 protein expression in most of the ACT cases researched. The increased levels found through micro-array were greater than the increase in protein expression in almost all samples, being higher in adenomas, followed by carcinomas, in relation to the normal adrenal cortex. A better state of preservation of adenomas, generally smaller masses, without macro and microscopic necrosis focus (VAN SLOOTEN et al, 1985, LUMACHI et al, 2001) may contribute for this difference. Childhood adenomas are generally associated to a virilizing clinical manifestation, with variable androgen hyper production. The degree of virilization arising from the concentration and duration of exposure to androgens, has been documented through standards for pubic hair, penis or clitoris size, presence of acne, voice tone and frequency, and muscular hypertrophy. This study has not found a correlation between serum DHEA-S or testosterone concentrations before the surgery, pilification, acne, and the expression of transcripts or DAX-1 protein. The high level of DAX-1 may be part of a regulating mechanism against the synthesis of steroids activated by SF-1, whose gene is amplified (FIGUEIREDO et al, 2004), and the protein expression increased, in childhood ACTs. [PIANOVSKI et al, submitted]. DAX-1 plays an important role in the formation and differentiation processes of adrenal cortex during the embryonal period, but it also inhibits the SF-1 transcription (BEUSCHLEIN et al, 2002, Val et al, 2003) and the enzymes that synthesize androgens and cortisone produced by the adrenal gland. [IKEDA et al, 1994; PARKER & SCHIMMER, 1997; LALLI et al, 1998]. Even though testosterone is capable of inhibiting DAX-1 expression in mice [MOROHASHI et al, 2000], the androgens and/or cortisol seem not to inhibit the DAX-1 expression in childhood ACTs researched by this study. The steroid

concentration found in the blood of ACT patients stemmed from masses approximately 1,5 to 50 heavier than the normal mass of two adrenal cortex. (ORTH et al, 1992; MESIANO et al, 1997). It has been noticed that an approximate estimate of the 3 main cortex (DHEA-S, testosterone and cortisol) per cm³ of tissue, in most of the ACT cases, revealed lower figures, similar to or above the ones found at the normal cortex. We should also consider that this attempt to estimate steroid production per cm³ of adrenal cortex tissue is fallible, in that it does not consider necrosis areas generally found in carcinomas. On the other hand, DAX-1 transcripts (measured in samples without macroscopic necrosis) were increased in almost all ACT cases, suggesting that in at least some of them the inhibition mediated by DAX-1 supersedes the activation of steroid synthesis mediated by other factors. SF-1 is the orphan nuclear receptor that stimulates the transcription of steroidogenic enzymes, among which StAR, cytochrome P450 steroids hydroxylases and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (PETER & DUBUIS, 2000). Besides SF-1, ACTH (BABU,2002), p53 (CHERIAN-SHAW, 2004) and LRH-1 (FAYARD, 2004) stimulate the steroid synthesis in adrenal cortex or ACT. Among adults, most ACT cases are non-functioning, or appear with Cushing syndrome (LATRONICO, 1997). Among children, especially younger ones, tumors produce predominantly androgens, followed by glucocorticoids and/or mineralocorticoids (RIBEIRO & FIGUEIREDO, 2004). In this study, Cushing's syndrome was observed only in carcinomas, thus corroborating previous studies which related this condition to a worse prognostic [GONZALES et al 1990, MICHALKIEWICZ et al, 2004]. GIORDANO et al. [2003] found higher proportions of DAX-1 transcripts in adenomas and a few carcinomas (personal communication) of adult patients with ACT, bearing no relation with clinical presentation or hormonal production (the majority with Cushing syndrome and/or hyperaldosteronism). By the methods of Northern and Western blot, REINCKE et al (1998) analyzed ACT cases in 27 adult patients and have shown that the DAX-1 expression is lower or absent in adrenal tumors producing aldosterone, but higher in non-functioning adrenal adenomas, suggesting an inverse correlation between the DAX-1 expression and the production of steroid hormone. Nevertheless, SHIBATA, H. et al, 2001, described a

low DAX-1 expression in cortisone-producing adenomas, and a high one in 2 cases of adenomas producing deoxycorticosterone with very low *CYP17* expression, which are clinically evident as a syndrome of mineralocorticoid overproduction.

Inhibin α -subunit is one of the DAX-1 negatively controlled genes. Achermann et al, (2001) showed that the synergy between SF-1 and AMPc in the promoter of inhibin α -subunit is inhibited by DAX-1. This link seems to be important to explain the eventual participation of DAX-1 and inhibin in the carcinogenesis process at gonads and adrenal cortex levels. There are strong evidences that α -inhibin plays a role as tumor suppressor in these tissues, as indicated by cases of ACT in mice without inhibin α -subunits, previously submitted to gonadectomy. (MATZUK et al, 1992; MATZUK et al, 1994). Still corroborating the hypothesis of participation of α -inhibin in childhood ACT, Longui et al (2004), have found 8 out of 9 children in southern Brazil with loss of heterozygosity to α -subunit, suggesting that besides the p53 R337H mutant allele, found in 13/14 of the tumors researched in this study, there may also be a concurring decrease or loss of α -inhibin function. It is interesting to observe the agreement of predominance between the DAX-1 transcript levels in virilizing adenomas in this study, and the greater messenger RNA for inhibin α -subunits in ACT cases of adults producing androgens, than in those with elevated aldosterone and serum cortisone concentrations (Arola et al., 2000). This greater relation between the expression of inhibins and sexual hormones may also be illustrated by a greater concentration of inhibins in gonads than in adrenals, even though they are higher in adrenal venous blood than in systemic circulation, pointing out that inhibins produced in adrenals may play an important role in adrenal cortex (Nishi et al., 1995). Recently, Abd-Elaziz et al, (2003), analyzed DAX-1 values as a prognostic factor in ovarian carcinomas and found a positive correlation between immunoreaction for DAX-1 and lower survival rates among patients. These findings from Achermann et al, (2001) and Abd-Elaziz et al, (2003) suggest that DAX-1 could facilitate the origin of ovarian tumors, and probably ACTs, by blocking tumor-suppressing activity of inhibin α -subunit. Besides the inhibition at transcription level, DAX-1 plays a role in post-transcriptional

regulation, which is suggested by its nucleous-citoplasmic displacement, its binding activity to RNA and its association with polyribosomes as part of an RNPm in steroidogenic cells. (LALLI, E. et al, 2000). CONDE et al, 2004, analyzed the DAX-1 expression in breast cancer and found statistically significant differences when comparing benign breast disease and infiltrative lobular carcinoma ($p=0,037$, $p<0,05$). DAX-1 is considered to be a repressing co-factor for SF-1 transcription (CRAWFORD, 1998). Yet, Burris et al, 1995, suggest that SF-1 may regulate or modulate the DAX-1 expression by binding to DNA elements found in the DAX-1 promoting region, so SF-1 is positioned above DAX-1 in the regulating cascat of various steroidogenic and/or other components of the hypothalamic-pituitary-adrenal-gonadal axis.

In this study, the correlation between the transcripts expression and the concentration of DAX-1 protein, both above normal levels in almost all ACTs, indicates that DAX-1 plays a major role in the physiopathogeny or as a simple phenotypic characteristic of childhood ACT. DAX-1 might have a role in the partial inhibition of steroid synthesis and/or facilitating the formation of tumors by blocking inhibin α -subunit

References:

1. Abd-Elaziz M, Akahira J, Moriya T, Suzuki T, Yaegashi N, Sasano H. Nuclear receptor DAX-1 in human common epithelial ovarian carcinoma: an independent prognostic factor of clinical outcome. **Cancer Sci** 2003 Nov;94(11):980-5.
2. Achermann JC, Meeks JJ, Jameson JL. Phenotypic spectrum of mutations in DAX-1 and SF-1. **Molecular and Cellular Endocrinology** 2001, 185:17-25.
3. Arola J, Liu J, Heikkila P, Ilvesmaki V, Salmenkivi K, Voutilainen R, Kahri AI. Expression of inhibin alpha in adrenocortical tumours reflects the hormonal status of the neoplasm. **J Endocrinol** 2000 May;165(2):223-9.
4. Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. **Endocrinology** 2002 Feb;143(2):665-73.
5. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Florida G, Worley KC, Tonini G, Ferrante E, Chiumello G, McCabe ER, Fraccaro M, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat Genet** 1994 Aug;7(4):497-501.

6. Beuschlein F, Keegan CE, Bavers DL, Mutch C, Hutz JE, Shah S, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Jeffs B, Jameson JL, Hammer GD. SF-1, DAX-1, and acd: molecular determinants of adrenocortical growth and steroidogenesis. **Endocr Res** 2002 Nov;28(4):597-607.
7. Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. **Oncogene** 2001 Aug 2;20(34):4621-8.
8. Burris TP, Guo W, Le T, McCabe ERB. Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX-1 promoter. **Biochem Biophys Res Commun** 1995, 214(2):576-581
9. Cherian-Shaw M, Das R, Vandevort CA, Chaffin CL. Regulation of steroidogenesis by p53 in macaque granulosa cells and H295R human adrenocortical cells. **Endocrinology** 2004 Dec;145(12):5734-44. Epub 2004 Aug 26.
10. Conde I, Alfaro JM, Fraile B, Ruiz A, Paniagua R, Arenas MI. DAX-1 expression in human breast cancer: comparison with estrogen receptors ER-alpha, ER-beta and androgen receptor status. **Breast Cancer Res** 2004;6(3):R140-8. Epub 2004 Feb 13.
11. Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. **Mol Cell Biol** 1998, 18: 2949-5629.
12. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. **Genes Chromosomes Cancer** 2000, 28:2, 145-152
13. Fayard E, Auwerx J, Schoonjans K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends in Cell Biology** 2004, 14(5)250-260.
14. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovski MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab** 1999 Mar;84(3):1116-21.
15. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR. Amplification of the Steroidogenic Factor 1 (SF-1) Gene in Childhood Adrenocortical Tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2004 Nov 16; [Epub ahead of print]
16. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol** 2003 Feb;162(2):521-31]
17. Gonzalez G, Arteaga E, Rodriguez JA, Lopez JM, Michaud P, Codner E. Cushing's syndrome: the diagnostic and treatment problems in 27 cases. **Rev Med Chil** 1990 Sep;118(9):979-87.
18. Hoyle C, Narvaez V, Alldus G, Lovell-Badge R, Swain A. Dax1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. **Mol Endocrinol** 2002 Apr;16(4):747-56
19. Ikeda Y, Shen W, Ingraham HA, Parker KL. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Molecular Endocrinology** 1994, 8:654-662

20. Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E, Lalli E, Tamai KT, Sassone-Corsi P, Lovell-Badge R, Camerino G, Parker KL. Steroidogenic factor 1 and Dax-1 colocalize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. **Mol Endocrinol** 1996 Oct;10(10):1261-72
21. Ikeda Y, Takeda Y, Shikayama T, Mukai T, Hisano S, Morohashi KI. Comparative localization of Dax-1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. **Dev Dyn** 2001 Apr;220(4):363-76
22. Ito M, Yu R, Jameson JL DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. **Mol Cell Biol** 1997 Mar;17(3):1476-83
23. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer** 1999 Sep;81(2):300-4.
24. Kawabe K, Shikayama T, Tsuboi H, Oka S, Oba K, Yanase T, Nawata H, Morohashi K. Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. **Mol Endocrinol** 1999, 13(8):1267-84.
25. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, Larsson C, Backdahl M. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. **Cancer Res** 1996, 56(18):4219
26. Lalli E, Melner MH, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DAX-1 blocks steroid production at multiple levels. **Endocrinology** 1998 Oct;139(10):4237-43
27. Lalli E, Ohe K, Hindelang C, Sassone-Corsi P. Orphan receptor DAX-1 is a shuttling RNA binding protein associated with polyribosomes via mRNA. **Mol Cell Biol** 2000, 20(13):4910-21.
28. Lalli E, Sassone-Corsi P. DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. **Mol Endocrinol** 2003 17(8):1445-53. Epub 2003 May 29.
29. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997 May;82(5):1317-24
30. Li FP, Fraumeni Jr JF. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? **Ann Int Med** 1969, 71:747-752.
31. Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, Mendonca BB, Castro M, Liberatore R Jr, Watanabe C, Lancellotti CL, Rocha MN, Melo MB, Monte O, Calliari LE, Guerra-Junior G, Baptista MT, Sbragia-Neto L, Latronico AC, Moreira A, Tardelli AM, Nigri A, Taymans SE, Stratakis CA. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. **J Med Genet** 2004, 41(5):354-9.
32. Lumachi F, Borsato S, Brandes AA, Boccagni P, Tregnaghi A, Angelini F, Favia G. Fine-needle aspiration cytology of adrenal masses in noncancer patients. **Cancer Cytopathology** 2001, 93:323-329
33. Malkin D, Li FP, Strong IC, Fraumeni Jr JF, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science** 1990, 30: (250) 1233-1238
34. Marshall WA, Tanner JM. Variations in pattern of pubertal changes in girls. **Arch Dis Child.** 1969 Jun;44(235):291-303.

35. Marshall WA, Tanner JM. Variations in the pattern of pubertal changes in boys. **Arch Dis Child**. 1970 Feb;45(239):13-23.
36. Matzuk MM, Finegold MJ, Su JGJ, Aaron JWH, Bradley A. α -inhibin is a tumour-suppressor gene with gonadal specificity in mice. **Nature** 1992, 360 (26):313-319.
37. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. **PNAS** 1994, 91: 8871-8821.
38. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr Rev** 1997 Jun;18(3):378-403
39. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**. 2004 Mar 1;22(5):838-45.
40. Morohashi KI, Mukai T, Mizusaki H, Kawabe K. Transcription factors implicated in the gonadal and adrenocortical development. In Okamoto M, Ishimura Y, Nawata H. *Molecular Steroidogenesis*, Universal Academy Press, Inc. – Tokyo, Japan, 191-192, 2000.
41. Muscatelli F, Strom TM, Walker AP, Zanaria E, Recan D, Meindl A, Bardoni B, Guioli S, Zehetner G, Rabl W, et al. Mutations in the DAX-1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **Nature** 1994 Dec 15;372(6507):672-6
42. Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-Vanhouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms'tumor 1 and DAX-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. **Cell** 1998, 93:445-454.
43. Nishi Y, Haji M, Takayanagi R, Yanase T, Ikuyama S, Nawata H. In vivo and in vitro evidence for the production of inhibin-like immunoreactivity in human adrenocortical adenomas and normal adrenal glands: relatively high secretion from adenomas manifesting Cushing's syndrome. **Eur J Endocrinol** 1995 Mar;132(3):292-9.
44. Orth DN, Kovacs WJ, DeBold R. The adrenal cortex. In: Willians Textbook of Endocrinology, ed by Wilson JD & Foster DW. WB Saunders Company, p 389-619, 8th ed. 1992.
45. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. **Endocr Rev** 1997 Jun;18(3):361-77
46. Parkin DM, Kramárová E, Draper GJ, Masuyer E, Michaelis J, Neglia J, Qureshi S, Stiller CA editors. **International Incidence of Childhood Cancer**, vol. II, IARC Scientific Publication, n° 144, 1998 p.3-14.
47. Peter M, Dubuis JM. Transcription factors as regulators of steroidogenic P-450 enzymes. **Eur J Clin Invest** 2000 Dec;30 Suppl 3:14-20.
48. Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P, Allolio B. DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 1998 83(7):2597-600

49. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al: An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2001; 98:9330-9335
50. Ribeiro RC, Figueiredo B. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer** 2004 May;40(8):1117-26.
51. Rubin RT, Phillips JJ, McCracken JT, Sadow TF. Adrenal gland volume in major depression: relationship to basal and stimulated pituitary-adrenal cortical axis function. **Biol Psychiatry**. 1996 Jul 15;40(2):89-97.
52. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997 Jul;82(7):2027-31.
53. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, Suzuki T, Kobayashi S, Murai M, Saito I, Saruta T. Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. **Mol Genet Metab** 2001 Sep-Oct;74(1-2):206-16.
54. Srivastava S, Zou Z, Pirolo K, Blattner W, Chang EH. Germ-line transmission of a mutated *p53* gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. **Nature** 1990, 348:747-749..
55. Suzuki T, Kasahara M, Yoshioka H, Morohashi K, Umesono K. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Mol Cell Biol** 2003 Jan;23(1):238-49.
56. Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM, Seldin MF. Homologs of Drosophila Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. **Genomics** 1995 Jan 20;25(2):565-7.
57. Tamai KT, Monaco L, Alastalo TP, Lalli E, Parvinen M, Sassone-Corsi P. Hormonal and developmental regulation of DAX-1 expression in Sertoli cells. **Mol Endocrinol** 1996 Dec;10(12):1561-9
58. Towbin H, Staehelin T, Gordon J Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1979 Sep;76(9):4350-4
59. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl Recept** 2003 Sep 18;1(1):8.
60. Van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar, AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer** 1985, 55: 766-773.
61. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, Santibanez-Koref MF, Kelsey AM, Tricker KJ, Evans DG, Birch JM. Germ-line mutations of TP53 in Li-Fraumeni families: an extended study of 39 families. **Cancer Res** 1997 Aug 1;57(15):3245-52.
62. Yu RN, Ito M, Jameson JL The murine Dax-1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. **Mol Endocrinol** 1998 Jul;12(7):1010-22.

63. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, Lalli E, Moser C, Walker AP, McCabe ER, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. **Nature** 1994 Dec 15;372(6507):635-41.
64. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. **Nature** 1997 Nov 20;390(6657):311-5.

9 – ANEXOS

9.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR(1)

9.2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (2)

9.3 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HEG-LPCC

ANEXO 1 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (1)



Curitiba, 27 de março de 2.003.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski
Nesta

Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "FATORES PROGNÓSTICOS NO CARCINOMA DE SUPRA-RENAL DA CRIANÇA", foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de março de 2.003, o referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, 251/97 e 292/99, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.
Protocolo CEP-HC Nº 612.031/2003-03

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que a cada ano seja apresentado a este CEP um relatório sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Atenciosamente,

PROF. DR. FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO

Sícc. Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas / UFPR

CRM N.º 5718 - Mat. 83623

Prof. Dr. Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/ UFPR

2ª via

ANEXO 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HC-UFPR (2)



Curitiba, 02 de fevereiro de 2005.

Ilmo (a) Sr. (a)
Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski
Nesta

Prezada Pesquisadora:

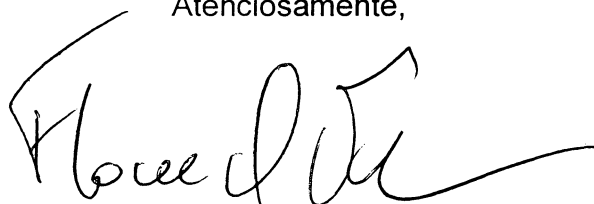
Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado “COEFICIENTE DE MORTALIDADE POR TUMOR ADRENOCORTICAL ABAIXO DE 15 ANOS NA REGIÃO METROPOLITANA DE CURITIBA”, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, em reunião realizada no dia 25 de janeiro de 2005. O referido projeto atende aos aspectos das Resoluções CNS 196/96, e demais, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos.

Protocolo CEP/HC 981.020/2005-01

Conforme a Resolução 196/96, solicitamos que sejam apresentados a este CEP, relatórios sobre o andamento da pesquisa, bem como informações relativas às modificações do protocolo, cancelamento, encerramento e destino dos conhecimentos obtidos.

Data para entrega do primeiro relatório: 02 de agosto de 2005.

Atenciosamente,



Prof. Dr. Flávio de Queiroz Telles Filho
Vice Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas/UFPR

ANEXO 3 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do HEG-LPCC



ERASTO GAERTNER

HOSPITAL ERASTO GAERTNER
INSTITUTO DE BIODENGENHARIA
INSTITUTO DE REABILITAÇÃO
CENTRO DE PROJETOS DE ENSINO E PESQUISA
R E D E F E M I N I N A

Curitiba, 31 de maio de 2005.

Dra. Mara Albonei Dudeque Pianovski
Pesquisadora Responsável

Prezada Sra.,

Gostaríamos de informar que o projeto de pesquisa intitulado como **“Participação do SF-1 e DAX-1 na Fisiopatogenia dos Tumores da Supra Renal da Criança”**, cujo número de protocolo é **P.P. nº 1183**, e tem como pesquisadora responsável V. Sa. foi avaliado pelo Comitê de Ética em Pesquisa e **aprovado “ad referendum”**.

Solicitamos que seja enviado um relatório semestral informando sobre o andamento do projeto e ao término do trabalho um relatório final, para darmos fechamento ao projeto. Cada alteração realizada no projeto deve ser comunicada imediatamente ao Comitê de Ética em Pesquisa.

Sem mais agradecemos a atenção e colocamo-nos a disposição para maiores esclarecimentos.

Atenciosamente,


Dr. Jordan Zanetti Silva
Coordenador do CEP

Membros do CEP

Dra. Ana Luiza Wiermann – Médica Especialista
Dra. Paola Andréa G. Pedrucci – Médica Especialista
Dr. Ariovaldo Donizetti de Abreu – Fisioterapeuta
Regina Célia Anastácio da Silva – Jornalista
Vânia Mari Andrzejewski – Farmacêutica Especialista
Dr. Fausto Rohnelt Durante – Médico Especialista
Jose Carlos Wiederkehr – Administrador
Vanessa D. M. Arantes - Nutricionista
Wanda Aparecida Silva – Representante

Dinarte Orlandi – Estatístico
Dra. Clance Nana Yamanouchi – Médica Especialista
Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos – Médico Especialista e Mestre
Dr. Jordan Zanetti Silva – Médico Especialista e Advogado
Enª Andréa Melo Tratch – Enfermeira Especialista
Enª Luciana Puchalski Kalinke – Enª Especialista e Mestre
Dr. João Antonio Guerreiro – Médico Especialista
Iolanda Galvão – Psicóloga