

GISLAINE CUSTÓDIO PIOVEZAN

PREVALÊNCIA DO ALELO *TP53* R337H NO ESTADO DO PARANÁ

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Bonald C. Figueiredo

CURITIBA
2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Aos meus filhos Giuliano e Gian Lucca, razão de todo meu esforço e da minha existência.

Aos meus pais, meu maior exemplo de vida.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo incrível talento para simplificar, encorajar e sempre se superar; por compreender, defender e se envolver a fundo em tudo o que faz; por corrigir, sugerir e evoluir juntamente com quem convive; pela capacidade de tornar o trabalho mais agradável.

Aos meus filhos, Giuliano e Gian Lucca, pela constante manifestação de amor, carinho e alegria de viver, que me estimularam a esta conquista.

Aos meus pais, Sireli e Tereza, pelo apoio incondicional.

Às minhas irmãs Ronise e Patrícia. Deu muito trabalho e exigiu muito empenho, mas valeu a pena!

Aos meus familiares e amigos, pelo apoio e compreensão.

Ao Jean, pela amizade e atenção compartilhada no cuidado dos nossos filhos durante a realização deste trabalho.

À Eloísa, pela amizade, lealdade e por cuidar da minha casa e dos meus filhos com muita dedicação.

Aos colegas de trabalho do Laboratório LABAC, Hospital de Clínicas e Hospital Evangélico pela colaboração, paciência e apoio.

Aos amigos e colaboradores do CEGEMPAC, pelo empenho, dedicação e seriedade nos projetos de pesquisa. Obrigada também pelo companheirismo e pelos momentos de lazer e descontração.

A todos a quem conheci e convivi nesses últimos meses e que contribuíram para a conclusão deste trabalho.

E acima de tudo, a DEUS, pela grande lição de vida nestes últimos 20 meses.

“Bons amigos são aqueles que nos instruem na fé, empenham-se conosco para aprofundar nossa prática e estudo, e trabalham em harmonia conosco para o avanço da Paz Mundial.”

(Nitiren Daishonin)

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	vi
LISTA DE TABELAS	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE GRÁFICOS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1 O TCA DE CRIANÇAS É UMA ENTIDADE DIFERENTE DO TCA DE ADULTOS.....	2
2.2 FASES CRÍTICAS DO DESENVOLVIMENTO DA ADRENAL HUMANA.....	3
2.3 DISFUNÇÃO DE SUPRESSORES DE TCA.....	8
2.4 OUTROS FATORES QUE PODEM CONTRIBUIR NA FORMAÇÃO DO TCA NA PRESENÇA DO ALELO <i>TP53</i> R337H E PERDA DO <i>TP53</i> SELVAGEM.....	14
2.5 LIÇÕES DA AFLATOXINA B1 AMBIENTAL RESPONSÁVEL PELA MUTAÇÃO <i>TP53</i> R249S.....	19
2.6 PREVALÊNCIA DE UM GENE NUMA POPULAÇÃO.....	21
2.7 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS DO ESTADO DO PARANÁ.....	23
2.7.1 Demografia.....	23
2.7.2 Colonização.....	24
2.7.3 Grupos Étnicos Predominantes no Paraná.....	25
2.7.3.1 Portugueses.....	25
2.7.3.2 Espanhóis.....	26
2.7.3.3 Italianos.....	26
2.7.3.4 Alemães.....	26
2.7.3.5 Holandeses.....	27
2.7.3.6 Poloneses.....	27
2.7.3.7 Ucrânios.....	27
2.7.3.8 Árabes e judeus.....	27
2.7.3.9 Japoneses.....	27
2.7.3.10 Indígenas.....	28
2.7.3.11 Africanos.....	28
2.7.4 Municípios.....	28
2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL (PNTN).....	31
2.8.1 Dificuldades Práticas da Triagem Neonatal.....	32
2.8.1.1 Coleta e armazenamento da amostra.....	32
2.8.1.2 Idade da criança.....	33
2.8.1.3 Laboratório analítico.....	33
2.8.1.4 Busca ativa.....	34
2.8.1.5 Estado de saúde da criança.....	34
2.8.2 Dificuldades no Aconselhamento Genético Dentro do Programa Nacional de Triagem Neonatal.....	35
2.9 FREQUÊNCIA DE TUMORES ADRENOCORTICAIS CONGÊNITOS.....	35

3	OBJETIVOS	36
3.1	OBJETIVO PRINCIPAL.....	36
3.2	OBJETIVOS SECUNDÁRIOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	POPULAÇÃO DA PESQUISA.....	36
4.2	IMPLANTAÇÃO DO PROJETO.....	37
4.3	ENVIO DAS AMOSTRAS DE ANÁLISE PARA CURITIBA.....	39
4.4	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	40
4.5	CADASTRO DE INFORMAÇÕES.....	41
4.6	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	41
4.6.1	Coleta e Armazenagem do Sangue.....	41
4.6.2	Preparo da Amostra para o Teste de DNA.....	42
4.6.3	Lavagem dos Discos de Papel.....	42
4.6.4	Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	43
4.6.5	Digestão do Produto Amplificado na PCR.....	45
4.6.6	Eletroforese.....	46
4.6.7	Critérios para Repetição dos Testes.....	50
4.6.7.1	Ausência das bandas esperadas na visualização do gel de eletroforese.....	50
4.6.7.2	Bandas com fluorescência mais fraca em comparação à fluorescência predominante no gel de eletroforese.....	50
4.6.7.3	Presença de outras bandas com pesos moleculares diferentes dos previstos.....	50
4.6.7.4	Confirmação de mutação detectada em PCR-pool.....	51
4.6.8	Liberação dos Resultados.....	51
4.6.9	Análise Estatística.....	51
4.6.9.1	Estimativa do tamanho da amostra.....	51
4.6.9.2	Cálculo da diferença estatística da prevalência entre os grupos.....	52
5	RESULTADOS	53
5.1	PREVALÊNCIA DE <i>TP53</i> R337H NO PARANÁ.....	53
5.2	AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE <i>TP53</i> R337H POR MUNICÍPIOS E REGIONAIS DE SAÚDE.....	55
5.3	AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO <i>TP53</i> R337H NOS DIFERENTES GRUPOS RACIAIS E ÉTNICOS DO PARANÁ.....	58
5.3.1	Perfil de uma Família com Antecedente de Câncer.....	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÕES	71
8	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXOS	82
ANEXO 1	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O RN...	82
ANEXO 2	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ACOMPANHAMENTO DO RN.....	85
ANEXO 3	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARENTES MENORES DE 15 ANOS.....	89
ANEXO 4	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARENTES DE 15 A 18 ANOS.....	94

ANEXO 5	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARENTES MAIORES DE 18 ANOS.....	99
ANEXO 6	PARECER CONEP.....	104
ANEXO 7	PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS DO HC/UFPR.....	106

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

17OH liase	- 17alfa-hidroxilase
3Bhsd	- 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
Ad4BP	- Adrenal-4-Binding Protein
AFB ₁ -FAPY	- Formamidopirimidina da aflatoxina B ₁
AFB ₁ -N7-Gua	- 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxiaflatoxina B ₁
BWS	- Síndrome de Beckwith-Wiedeman
BWSCR1	- Síndrome de Beckwith-Wiedeman no cromossomo 1
BWSCR2	- Síndrome de Beckwith-Wiedeman no cromossomo 2
BWSCR3	- Síndrome de Beckwith-Wiedeman no cromossomo 3
CEGEMPAC	- Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças
CGH	- Comparative Genomic Hybridization
CHC	- Carcinoma Hepato-celular
CYP	- Citocromo P450
CYP11 β 1	- Enzima aldosterona sintetase
CYP11 β 2	- Enzima 11 β -hidroxilase
CYP11A	- Enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
CYP17	- Enzima 17 alfa-Hydroxylase
DAX-1	- Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenital, critical region on the X chromosome gene-1
DBD	- Domínio de ligação ao DNA
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DHEAS	- Sulfato de dehidroepiandrosterona
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidérmico
FEPE	- Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional
FISH	- Fluorescence <i>In Situ</i> Hybridization
FSH	- Hormônio folículo-estimulante
GNAS1	- Subunidade alfa da proteína G
GPCR	- Receptor acoplado à proteína G
H19	- Proteína H19 supressora tumoral
HAC	- Hipoplasia Adrenal Congênita
HBsAg	- Antígeno de superfície da hepatite B
HBx	- Proteína X da hepatite B
Hha1	- Enzima de restrição isolada do <i>Haemophilus haemolyticus</i>
HHG	- Hipogonadismo hipogonadotrófico
HLA	- Antígeno leucocitário humano
IGF1R	- Receptor do fator de crescimento 1 Insulina-símile
IGF-II	- Fator II de crescimento Insulina símile
LOH	- Perda de heterozigose
MC2R	- Receptor Melano-corticotrófico tipo 2
NROB1	- DAX-1
p53	- Proteína p53 selvagem (fator de supressão tumoral)
p53 R337H	- Proteína p53 R337H
p53tet-R337H	- Proteína tetramérica p53 R337H
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
PCR	- Reação em cadeia da polimerase

PKU	- Fenilcetonúria
PNTN	- Programa Nacional de Triagem Neonatal
<i>PRKAR1A</i>	- Gene <i>PRHR1A</i> do complexo de Carney
Rb	- Retinoblastoma
RFLP-PCR	- Restriction Fragment Length Polymorphism-PCR
RR	- Risco Relativo
SF-1	- Fator esteroideogênico-1
SLF	- Síndrome de Li-Fraumeni
SLF-símile	- Síndrome de Li-Fraumeni símile
StAR	- Proteína de regulação aguda da esteroideogênese
TCA	- Tumor de Córtex Adrenal
TCLE	- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGFBR1	- Fator de crescimento transformador beta-1
TSC1	- Complexo da esclerose tuberosa 1
VHB	- Vírus da Hepatite B
WT-1	- Tumor de Wilms

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	ZONAS E ATIVIDADES FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL HUMANO FETAL E ADULTO.....	7
TABELA 2	SÍNDROMES GENÉTICAS QUE PREDISPÕEM AOS TCA	15
TABELA 3	PRINCIPAIS MUNICÍPIOS DO PARANÁ.....	29
TABELA 4	PROTOCOLO PARA LAVAGEM DOS DISCOS DE PAPEL.....	42
TABELA 5	PREPARO DOS REAGENTES PARA PCR	43
TABELA 6	PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO.....	44
TABELA 7	COMPOSIÇÃO DOS CONTROLES NA PCR.....	45
TABELA 8	PREPARO DOS REAGENTES PARA O ENSAIO DE RESTRIÇÃO.....	46
TABELA 9	MUTAÇÃO ENCONTRADA EM RNs DE MUNICÍPIOS DO PARANÁ...	55
TABELA 10	DISTRIBUIÇÃO DA PREVALÊNCIA DE TP53 R337H POR REGIONAL DE SAÚDE.....	57

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DESENVOLVIMENTO ADRENAL.....	4
FIGURA 2	CÓRTEX ADRENAL ADULTO.....	5
FIGURA 3	AÇÃO DA PROTEÍNA p53 NORMAL (A) E AS FASES PARA PERDA DE FUNÇÃO DA PROTEÍNA p53 R337H (B).....	10
FIGURA 4	MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA AFB1.....	20
FIGURA 5	PERCENTUAL DE COR DE PELE NO PARANÁ.....	25
FIGURA 6	DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO NO PARANÁ.....	30
FIGURA 7	NASCIDOS VIVOS PELO LOCAL DE RESIDÊNCIA DA MÃE.....	30
FIGURA 8	RESULTADO DE PCR EM SANGUE PERIFÉRICO E TUMOR.....	47
FIGURA 9	RESULTADO DE PCR – POOL.....	48
FIGURA 10	RESULTADO DE PCR-INDIVIDUAL.....	49
FIGURA 11	REGIONAIS ONDE A PESQUISA JÁ ESTÁ IMPLANTADA.....	53
FIGURA 12	PROJEÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA (n).....	54
FIGURA 13	MUTAÇÃO ENCONTRADA EM RNs DE MUNICÍPIOS DO PARANÁ...	56
FIGURA 14	DISTRIBUIÇÃO DA PREVALÊNCIA DE TP53 R337H POR REGIONAL DE SAÚDE.....	58
FIGURA 15	HEREDOGRAMA ILUSTRATIVO DE UMA FAMÍLIA PORTADORA DE TP53 R337H.....	61

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO <i>TP53</i> R337H NO LADO DA FAMÍLIA QUE SEGREGA A MUTAÇÃO POR COR DE PELE NO PARANÁ.....	59
GRÁFICO 2	PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO <i>TP53</i> R337H NO LADO DA FAMÍLIA QUE SEGREGA A MUTAÇÃO POR GRUPO ÉTNICO NO PARANÁ.....	59

RESUMO

A incidência de Tumor de Córtex Adrenal (TCA) pediátrico no Estado do Paraná é de 12 a 18 vezes maior do que em qualquer outro lugar do mundo e a principal causa é a mutação no gene *TP53* R337H, localizada no cromossomo 17p13.1. Um grande número de famílias podem ser portadoras desta mutação no Paraná. A estimativa preliminar da prevalência desta mutação na população do Paraná era de 1/1500, baseada em um estudo recente (30 famílias/41 crianças com TCA). O conhecimento da prevalência exata desse gene na população é o primeiro passo para esclarecer sua distribuição geográfica e racial, assim como facilitar outros estudos para esclarecer o que pode ou não contribuir para a formação do TCA e outros tipos de câncer. Os objetivos deste estudo são estimar a prevalência desta mutação entre os recém-nascidos (RNs), verificar a distribuição nas diferentes regiões e grupos étnicos do Paraná e investigar a evidência de mutação *de novo*. Instituições de 235 cidades foram convidadas e aceitaram participar deste estudo, atingindo-se um total de 30098 RNs investigados. A coleta de sangue foi realizada de maneira escalonada entre dezembro/2005 a novembro/2006, até atingir aproximadamente 65% dos nascidos-vivos/mês. O percentual de mães que aceitaram fazer o teste nos seus RNs e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) foi próximo de 100%. Todos os RNs foram identificados por código de barras e aqueles que apresentaram a mutação no primeiro teste de triagem (testando-se o DNA de três RNs simultaneamente) foram submetidos a uma segunda punção lateral do calcâneo para teste confirmatório (com amostras individuais). As amostras foram analisadas por PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase - Polimorfismo de Fragmentos de DNA obtidos por Enzimas de Restrição), usando-se a enzima *Hha* I que corta o produto amplificado do *TP53* selvagem (reconhecendo a seqüência CGCG). O alelo com a mutação (contendo a seqüência CACG) é identificado pela presença de uma banda não digerida de 447pb. Após a confirmação da mutação, os pais dos RNs foram questionados em relação à cor da pele e etnia. A mutação foi identificada em 64 RNs (64/30098), gerando uma prevalência média de 2,12/1000. A prevalência foi estimada com maior precisão em 7 regionais de saúde do Estado (1,52 a 3,9/1000), com diferença estatisticamente significativa em algumas delas em relação à prevalência média do Estado. O percentual de distribuição dos grupos raciais na família do RN segregando o alelo *TP53* R337H variou de 62,5% (brancos) a 12,5% (morenos), 12,5% (negros) e 12,5% (índios). Entre o grupo de pele branca, a descendência mais freqüente foi de italianos (35,7%), portugueses (14,4%), brasileiros (14,4%), alemães (7,1%), poloneses (7,1%), espanhóis (7,1%), libaneses (7,1%) e franceses (7,1%). Nenhuma descendência japonesa, chinesa ou outra raça oriental foi encontrada. Os resultados obtidos nesse estudo permitiram encontrar uma prevalência da mutação *TP53* R337H três vezes maior do que a previamente estimada, o que sugere que a penetrância do TCA é menor que a previamente calculada. Contudo, várias famílias apresentaram histórico de outros tipos de câncer, especialmente câncer de mama, o que deve ser investigado posteriormente. Devido ao número limitado de famílias investigadas, ainda é inviável estimar a prevalência em grupos raciais / étnicos ou a predominância da mutação em várias regiões do Estado. Este é o primeiro estudo que utiliza um teste de DNA para avaliar a relação entre gene e câncer em RNs.

Palavras-chave: Tumor de Córtex Adrenal, mutação R337H no *TP53*, PCR-RFLP, freqüência, grupos étnicos.

ABSTRACT

The incidence of childhood adrenocortical tumor (ACT) in State of Paraná is 12-18 times higher than in northern Brazil or other countries and the main reason is the *TP53* R337H mutation located at chromosome 17p13.1. A large number of families were expected to carrier this mutation in Paraná. The preliminary estimation of prevalence for this mutation in the population of Paraná was 1/1500 based on a recent study (30 families/41 children with ACT). Knowledge of the accurate prevalence of this gene in the population is the first step towards clarification of the geographical and racial distribution and adress the question whether it may or not contribute to formation of ACT and other types of cancer. The goals of this study were to estimate the prevalence of this mutation among newborns, verify whether the distribution is homogeneous among different regions and racial groups of Paraná and investigate evidence of *de novo* mutation. Institutions from 235 cities were invited and have accepted to participate in this study, reaching 30098 tested newborns. The blood samples were collected between December/2005 and November/2006, until reaching 65% of the newborns/month in Paraná state. The percentage of mothers who accepted to do the test was close to 100% and they had to sign the informed consent form (ICF). All newborns were coded and those presenting the mutation in the first screening test (containing a DNA pool of three newborns) were submitted to a second heel-prick blood test (for individual samples). Samples were screened by PCR-RFLP (Polimerase Chain Reaction – Restriction Length Polymorphism) analysis, using the restriction enzyme *Hha I* to cut the wild type amplified product (cutting site CGCG) into two fragments of 193 and 254 bp. The mutated allele (cutting site CACG) is identified by the presence of the undigested band size (447pb). After confirmation of the mutation, the newborn parents were inquired about skin color and etnia of the parental side segregating the mutation. Sixty-four newborns (64/30098) were found with the mutation giving rise to a mean prevalence of 2.12/1000. The prevalence range among the geographical regions of the state, denominated “Health Regionals”, was more accurately estimated for 7 of them (1.52 to 3.9/1000) resulting in a statistically significant difference in relation to mean prevalence for the state. The percentage of the racial group in the family of mother or of father segregating the *TP53* R337H allele varied from 62.5% (white), to 12.5% (brown), 12.5% (black) and 12.5% (indians). Among the white skin group, the most frequently reported descendants were Italian (35.7%), Portuguese (14.4%), Brazilian (14.4%), German (7.1%), Polish (7.1%), Spanish (7.1%), Libanese (7.1%) and French (7.1%). No descendant of Japanese, Chinese or other oriental were found. The mean prevalence of the *TP53* R337H mutation in State of Paraná is three times higher than previously estimated, which suggests that the penetrance for ACT is lower than previously reported. However, family history for other types of cancer were also found, specially breast cancer, which suggest risk for other types of cancer that must be further investigated. Given the limited number of families investigated so far, it is still unable to estimate prevalence of racial group/etnia or the predominance of the mutation in the several regions of the state. This was the first study using a DNA test to study a cancer related gene in newborns.

Key-words: Adrenocortical tumor, *TP53* R337H mutation, PCR-RFLP, prevalence, Racial group.

1 INTRODUÇÃO

O tumor de córtex adrenal (TCA) em crianças tem como principal causa uma alteração genética no gene *TP53* (mutação R337H), mais comumente herdada de um dos pais, enquanto no adulto a mutação neste gene é geralmente somática.

A suspeita de que o TCA de crianças tem origem pré-natal e/ou imediatamente pós-natal merece uma reflexão sobre onde e quando ocorre proliferação, migração, hipertrofia e morte programada de células no córtex adrenal. As evidências apresentadas nesta revisão indicam que mecanismos somáticos predominam na formação do TCA do adulto, criando uma entidade diferente do TCA pediátrico em vários sentidos. Carcinoma adrenocortical em adultos ocorre numa incidência de 1,7 por milhão de adultos por ano (BORNSTEIN *et al.*, 1999) e nas crianças a incidência é de 0,3/ milhão abaixo de 15 anos (PARKIN *et al.*, 1998), ou de apenas 0,2% na França (DESANDES *et al.*, 2004), sendo que no Paraná a incidência do TCA em crianças é 12 a 18 vezes maior (PIANOVSKI *et al.*, 2006). Nesta região, a incidência aumentada de TCA em crianças é decorrente do grande número de pessoas com a mutação R337H no gene *TP53* (RIBEIRO *et al.*, 2001).

Além da mutação R337H no gene *TP53*, alteração sempre presente em todos os TCAs (Tumores de Córtex Adrenal) do Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001), outras alterações genéticas foram encontradas no TCA de crianças e de adultos, indicando que provavelmente o mecanismo de formação do tumor é multifatorial. Pode-se inferir que a combinação de um ou mais fatores presentes no período considerado mais vulnerável do desenvolvimento corticoadrenal (ocorrência de proliferação celular seguida de apoptose) é considerada crítica quando ocorrem falhas de proteção de supressores tumorais e/ou participação ativa de outros fatores atuando com maior intensidade.

É importante saber qual a real freqüência do alelo *TP53* R337H na população, onde e em que grupos étnicos ele é mais freqüente no estado do Paraná. Estas questões e outras que estão sendo avaliadas em outros projetos em desenvolvimento no CEGEMPAC e Instituto Pelé Pequeno Príncipe poderão definir ou esclarecer como acontece o TCA em crianças no Paraná e se esta mutação é também responsável pelo aparecimento de outros tipos de câncer.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O TCA DE CRIANÇAS É UMA ENTIDADE DIFERENTE DO TCA DE ADULTOS

Várias características indicam que o TCA de crianças, principalmente abaixo de 4 anos de idade, é uma neoplasia de origem e patogenia diferente do TCA de adultos. Algumas dessas diferenças merecem ser revisadas. LIOU & KAY (2000) apresentaram uma coletânea de 22 publicações sobre carcinoma adrenocortical em crianças, totalizando 412 casos, dos quais 171 (41%) são de São Paulo e sul do Brasil; a idade média ao diagnóstico variou de 1,5 a 7,0 anos, com a maioria entre 2 e 4 anos. Na série de 254 casos publicada por MICHALKIEWICZ *et al.* (2004), quase 60% estavam abaixo dos 4 anos de idade. Neste último estudo, o percentual de formas clínicas funcionantes de TCA foi de 90%, apresentando virilização isolada ou em combinação com aumento da secreção de cortisol ou outros hormônios. Síndrome de Cushing isolada em crianças é rara (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 (LATRONICO & CHROUSOS, 1997; WAJCHENBERG *et al.*, 2000; VIERHAPPER, 2002). A sobrevida global para as crianças fica em torno de 54% (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), e em adultos o prognóstico é aparentemente pior (MENDONÇA *et al.*, 1995), porém para os adultos o resultado é bastante variado e depende muito do estágio e protocolos de tratamento utilizados. Outros estudos têm demonstrado 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 (MENDONÇA *et al.*, 1995). RIBEIRO *et al.* (1990), revisando 40 prontuários de crianças com TCA, observaram que tumores com peso superior a 100 g ou com volume superior a 200 mL 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 malignidade ou benignidade, pois grandes tumores têm sido observados sem metástases, enquanto que pequenos tumores já podem apresentá-las (GANDOUR e GRIZZLE, 1986). A histologia não apresentou

correlação com o prognóstico em tumores pediátricos (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.

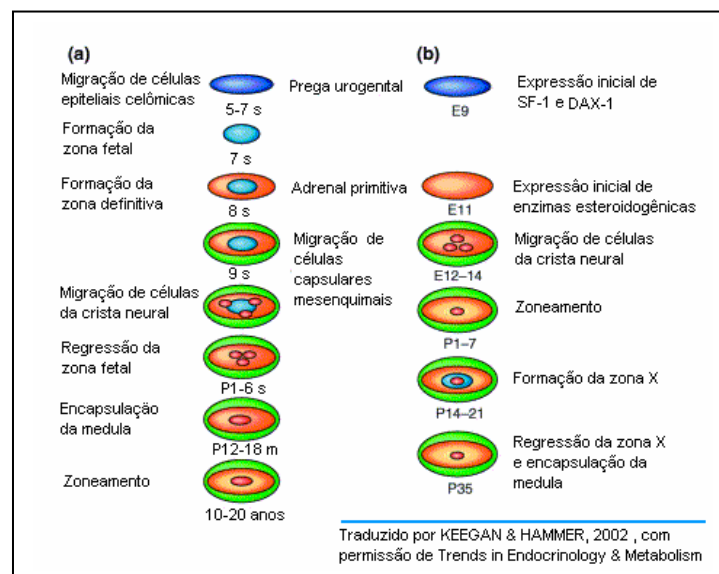
2.2 FASES CRÍTICAS DO DESENVOLVIMENTO DA ADRENAL HUMANA

O desenvolvimento do córtex adrenal humano foi brilhantemente revisado por MESIANO & JAFFE (1997) e KEEGAN & HAMMER (2002). O trabalho pioneiro nesta área, de SUCHESTON & CANNON (1968), já citava as seguintes fases: 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, zona fetal - mais interna - e zona definitiva – mais periférica (8-10 semanas de gestação); 4) declínio e desaparecimento da zona fetal (primeiros três meses pós-parto); 5) estabelecimento e estabilização do padrão zonal adulto com desenvolvimento da zona reticular (10-20 anos de idade). Em torno da 9ª semana de gestação, o blastema adrenal é circundado por células mesenquimais provenientes da cápsula de Bowman, que dão origem à cápsula adrenal. Ao mesmo tempo, uma rede de capilares sinusoidais se desenvolve entre os cordões da zona fetal, fazendo com que o córtex adrenal seja um dos órgãos mais vascularizados do feto.

Em torno de 10 a 12 semanas de gestação, a zona definitiva exhibe numerosas figuras mitóticas, enquanto que na zona fetal elas são raras [JOHANNISSON (1968) citado por MESIANO & JAFFE (1997)]. 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 & HEWER (1927) descreveram que ocorre migração centrípeta de células contendo lipídios, da zona definitiva para a zona fetal. Acredita-se assim que a zona definitiva é o compartimento de células tronco, do qual derivam as zonas corticais internas (Figura 1) (KEEGAN & HAMMER, 2002). Um segundo modelo propõe 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 2), e da enzima da zona externa, a aldosterona-sintetase (CYP11 β 1), representam um precursor comum, que pode contribuir para formar ambas as zonas corticais, interna e externa (MITANI *et al.*, 2003). Em torno da 30^a semana de gestação, a zona definitiva e a de transição começam a tomar a aparência de glomerulosa e fasciculada, respectivamente (SUCHESTON & CANON, 1968).

FIGURA 1 - DESENVOLVIMENTO ADRENAL.

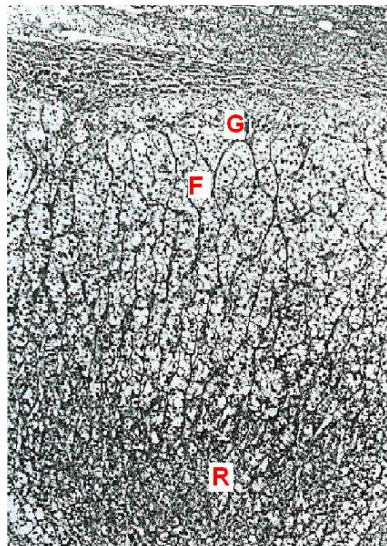


NOTA - (a) O desenvolvimento adrenocortical humano mostrando progressão da prega urogenital ao final do zoneamento. Duas populações separadas de células migram do epitélio celômico para formar as zonas fetal e definitiva, as quais se condensam para formar a adrenal primitiva. A adrenal primitiva é então encapsulada por células mesenquimais, e as células da crista neural migram centripetamente para formar a medula adrenal. A zona fetal sofre apoptose após o nascimento, seguido de encapsulação da medula e zoneamento final do córtex adulto. O estágio do desenvolvimento é mostrado para cada estrutura apresentada na figura. (b) Apresentação do desenvolvimento adrenocortical do camundongo progredindo da prega urogenital até a regressão da zona X. Semelhante ao que acontece em humanos, a adrenal primitiva se forma a partir da condensação de células epiteliais celômicas seguida de migração de células mesenquimais capsulares e migração de células da crista neural. Os marcadores do desenvolvimento adrenal inicial incluem os receptores nucleares SF-1 e DAX-1, seguidos de enzimas esteroidogênicas. Em contraste com o que acontece em humanos, o zoneamento do córtex adrenal se completa próximo ao nascimento, e a zona X (zona fetal) não se forma até 14 a 21 dias após o nascimento (P14-21) e regride em P35 nos machos. Abreviaturas: DAX-1, *dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region no cromossomo X-1*; E, dia do período embrionário; m, mês; P, dia pós-natal; SF-1, fator esteroidogênico 1; S, semana.

FONTE: KEEGAN & HAMMER, 2002. Reproduzido com permissão de Trends in Endocrinology & Metabolism.

Depois de intensas transformações com proliferação celular na zona definitiva, migração, hipertrofia e morte celular programada na zona fetal, começa o longo período de crescimento da zona reticular, ocupando a mesma camada e função (produção androgênica), antes da zona fetal (Figura 1). A medula da adrenal fetal é constituída por ilhotas de células cromoafins que somente vão formar uma estrutura, ainda que rudimentar, na 1ª semana pós-natal e adquirir características semelhantes à medula adrenal adulta em torno de 12 a 18 meses após o nascimento (Figura 2) (FOSTER & WILSON , 1992).

FIGURA 2: CÓRTEX ADRENAL ADULTO



FONTE: FOSTER & WILSON, 1992. Nota - Secção de córtex adrenal humana: zona glomerulosa (G) logo abaixo do tecido capsular; zona Fasciculada (F) entre a zona Glomerulosa e as células densas e compactas da zona Reticular (R).

Devido às diferenças de conteúdo enzimático entre a zona glomerulosa e as duas camadas internas (fasciculada e reticular), o córtex adrenal humano funciona como duas unidades separadas, com diferente regulação e produtos secretados. A zona fetal humana expressa a enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol (CYP11A), mas não expressa a enzima 3 β -hidroxiesteróide desidrogenase (3 β HSD), indicando que a adrenal fetal produz primariamente dehidroepiandrosterona (DHEA) e seus derivados sulfatados. A zona glomerulosa, derivada da zona definitiva, adquire capacidade esteroidogênica no terceiro trimestre e produz aldosterona, sob o controle do sistema renina-angiotensina. A zona fasciculada secreta glicocorticóides sob estímulo do ACTH (Hormônio Adreno Cortico Trófico), em torno da 15ª semana de gestação, 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 na zona reticular (que surge no lugar da zona fetal), coincidindo com a adrenerca. A Tabela 1 apresenta as principais diferenças para cada camada.

TABELA 1 – ZONAS E ATIVIDADES FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL HUMANO FETAL E ADULTO.

	Zona externa	Zona transitória	ADRENAL FETAL	ADRENAL ADULTA
	Zona glomerulosa	Zona fasciculada	Zona fetal	Zona Reticular
LOCALIZAÇÃO	Periférica.	Central.	Interna.	Interna.
ESTÍMULO	Angiotensina II e (ACTH).	ACTH.	ACTH.	ACTH.
RECEPTOR DE MEMBRANA PRIMÁRIO	Receptor angiotensina II.	MC2R.	MC2R.	MC2R.
ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	CYP11 β 2.	CYP17; CYP11 β 1.	CYP17(17OH e 17,20 liase)	CYP17(17OH e 17,20 liase)
HORMÔNIO PRODUZIDO	Aldosterona.	Cortisol.	Apenas DHEA e DHEA-S (falta a enzima 3 β HSD . Androstenediona e outros não são produzidos).	Esteróides sexuais DHEA, androstenediona e outros.
FUNÇÃO	Regulação do volume intra-vascular.	Homeostase da glicose; mobilização de energia dos depósitos.	Crescimento fetal, precursores para estrógenos da placenta.	Adrenarca; bem estar.
DEFICIÊNCIA	Hiponatremia, hipercalemia, hipotensão.	Hipoglicemia, falta de resposta ao stress.	Desenvolvimento fetal anormal.	Desconhecida.

FONTE-Modificado de KEEGAN & HAMMER, 2002.

Para responder a pergunta sobre de que camada(s) do córtex adrenal surge o TCA, a dedução mais simples (e especulativa) relaciona o perfil hormonal do tumor, hiperaldosteronismo, hipercortisolismo, ou hiperandrogenismo com a camada mais externa, intermediária ou interna, respectivamente. Enquanto cerca de 90% dos TCAs que surgem nos primeiros 4 anos de idade se manifestam com virilização (MICHALKIEWCZ *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2004), os adolescentes e principalmente adultos com carcinoma de córtex adrenal apresentam virilização com menor frequência e passam a ocorrer mais casos com síndrome de Cushing, mostrando talvez a transição de origem do tumor. Partindo deste princípio, pode-se considerar que o TCA das crianças mais novas tem maior probabilidade de surgir da zona fetal ou reticular, ou de uma célula mais primitiva com potencial de síntese para todos os hormônios.

BEUSCHLEIN *et al.*, (1994) demonstraram que hiperplasia adrenocortical é um processo policlonal, enquanto que carcinomas são monoclonais, sugerindo que alterações específicas no genoma são necessárias para a tumorigênese adrenocortical. GICQUEL *et al.*, (1994) demonstraram que carcinomas adrenocorticais são monoclonais, porém adenomas 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 estágios de um processo comum de múltiplos passos. Como exemplo desse segundo mecanismo, tem-se a hiperplasia macronodular na qual foi descrito padrão clonal heterogêneo, em diferentes localizações das glândulas (GICQUEL *et al.*, 2000).

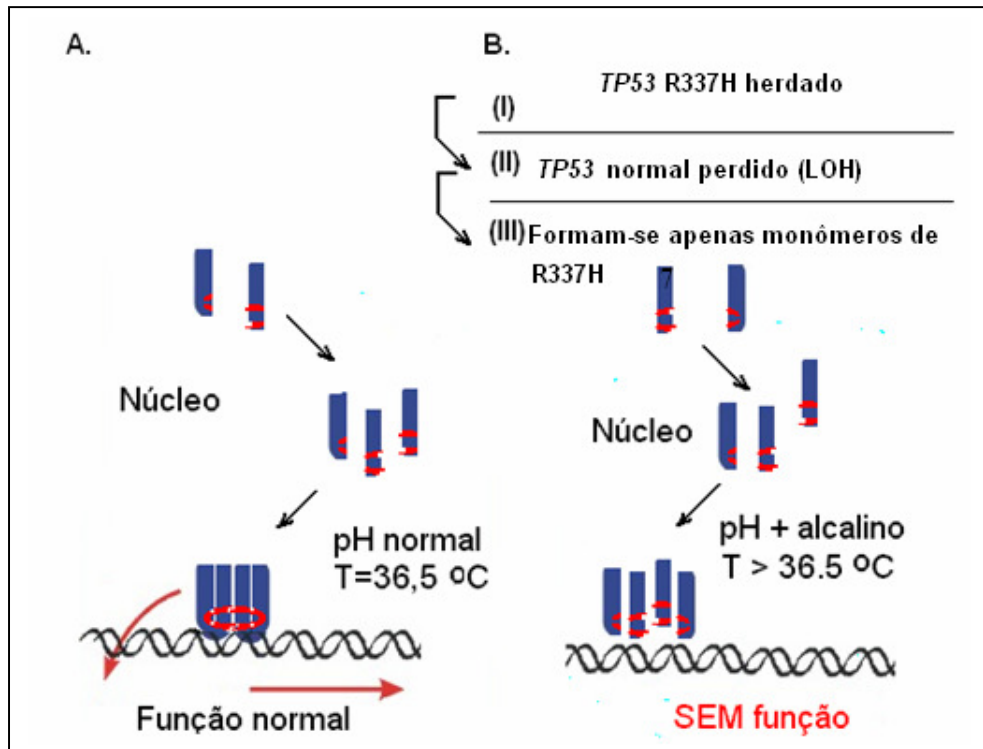
2.3 DISFUNÇÃO DE SUPRESSORES DE TCA

MALKIN *et al.* (1990) descreveram as primeiras famílias com síndrome de Li-Fraumeni (SLF) apresentando mutação no gene P53 em linhagem germinativa (Tabela 2). A maioria dos casos de TCA em crianças, posteriormente relatados, foi de famílias

com a mesma síndrome. É possível ainda que os casos de TCA que não preencheram os critérios para SLF clássica (geralmente os TCA de crianças sem outros membros da mesma família com osteossarcoma, câncer de mama, de cérebro ou leucemia) possam se tratar de mutações no *p53* de baixa penetrância que podem fazer parte de Li-Fraumeni símile (SLF-símile) (revisados por VARLEY *et al.*, 1999). Um exemplo deste tipo de mutação, R337H no gene *TP53*, tem sido demonstrado no sul do Brasil e São Paulo (RIBEIRO *et al.*, 2001, LATRONICO *et al.*, 2001), sendo responsável pelo aumento na incidência de TCA em crianças de até 15 anos de idade no Paraná (PIANOVSKI *et al.*, 2006). A mudança do códon CGC para CAC (substituindo arginina por histidina), impede a formação de tetrâmeros estáveis de p53 R337H em pH mais alcalino e temperaturas mais elevadas, o que poderia ocorrer num distúrbio metabólico e infeccioso (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). Numa série de 30 famílias de crianças com TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B), apresentando cerca de 40% dos parentes com a mutação R337H no *TP53* (do lado do cônjuge que segrega este alelo), sete tiveram outros tipos de câncer (sem exame da mutação) que foram considerados como casos de câncer semelhantes aos encontrados na população geral. A baixa penetrância estimada para o TCA do Paraná, em torno de 10%, (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B) é provavelmente um evento específico para o córtex adrenal que acontece por falha na apoptose e/ou outra etapa do desenvolvimento do córtex adrenal, sendo menos comum na adrenal de adultos.

Até o presente, as evidências indicam que o TCA do Paraná e São Paulo é resultado de uma série de eventos que se iniciam a partir da mutação R337H no *TP53* na linhagem germinativa (RIBEIRO *et al.*, 2001). A herança deste alelo do pai ou da mãe (ou o aparecimento como mutação “*de novo*”) é o passo mais importante até o surgimento de outras etapas na formação do TCA e de suas manifestações clínicas (Figura 3). É provável que outros fatores (revisados no item subsequente) devam atuar contribuindo para formação do TCA. Desta forma, defende-se a hipótese de que nos Estados do Paraná e São Paulo o processo de formação do TCA em crianças seja multifatorial e ligado a uma falha do desenvolvimento do córtex adrenal.

FIGURA 3 – AÇÃO DA PROTEÍNA p53 NORMAL (A) E AS FASES PARA PERDA DE FUNÇÃO DA PROTEÍNA p53 R337H (B).



FONTE : FIGUEIREDO *et al.*, 2004 (modificada).

NOTA - O RN herda de um dos pais o *TP53 R337H* (evento I), em seguida a célula do córtex adrenal perde o alelo normal (evento II) e a forma tetramérica da proteína R337H (em pH mais alcalino e/ou processo febril) não se mantém estável (evento III) e fica incapacitada de induzir apoptose e/ou inibição da proliferação, facilitando o aparecimento da primeira célula de TCA. Esta, dependendo da sua capacidade de crescimento, da capacidade de ataque do sistema imunológico e da participação de outros fatores, pode levar semanas, anos ou nunca se tornar uma massa, com ou sem produção hormonal, ou capaz de causar efeitos de massa alertando para o seu diagnóstico. A necessidade dos 3 primeiros eventos e mais a participação de outros fatores para se formar o tumor explica a baixa penetrância para o TCA (10% ou menos).

Uma célula cancerosa deve apresentar mutação em ambos os alelos de genes supressores de tumores. Estudos epidemiológicos com pacientes com retinoblastoma (KNUDSON, 1971) vieram dar suporte a essa idéia. Alguns desses pacientes foram de famílias com história de retinoblastoma, sugerindo uma predisposição hereditária para o desenvolvimento das neoplasias. Postulou-se então que haveria um locus genético, que mais tarde foi chamado de gene de susceptibilidade ao retinoblastoma (gene *Rb*) (GODBOUT *et al.*, 1983). Pacientes do primeiro grupo herdariam uma cópia defeituosa

desse gene e a ocorrência de uma mutação na cópia normal do alelo, na célula somática, levaria ao aparecimento dos tumores. 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 ou, em outras palavras, à perda da heterozigose (CAVENEY *et al.*, 1983). Assim, na forma hereditária do retinoblastoma, o alelo com a mutação está presente em todas as células do paciente e, um segundo evento (perda do alelo normal) leva ao desenvolvimento da célula cancerosa. Na forma esporádica, dois eventos devem 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 perda de heterozigose (LOH) nos pacientes descritos por VARLEY *et al.* (1999) mostrou que tumores de pacientes com mutações nos códons 158 ou 213 tiveram poucas alterações adicionais, as quais estavam 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 e G→A. RIBEIRO *et al.* (2001) e FIGUEIREDO *et al.* (2006B) encontraram LOH na maioria dos TCAs de crianças com a mutação R337 no *TP53* N herdada de um dos pais. Observou-se LOH em 8 de 11 tumores analisados por LATRONICO *et al.* (2001). Portanto, esses tumores sofrem LOH retendo o alelo mutante *TP53* R337H. O resultado da pesquisa de LOH nos TCAs pode variar de acordo com a quantidade de DNA utilizada na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR - Polymerase Chain Reaction), podendo introduzir DNA de células não tumorais, inclusive de fibroblastos presentes em grandes proporções no TCA e, como consequência, poderão surgir falsos resultados negativos para LOH, indicando menor proporção de LOH.

Os monômeros de p53 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. Esta ponte de sal é estável entre pH 5 e 9 porque os grupos funcionais envolvidos permanecem carregados nessa faixa (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). Estes autores descobriram que o domínio R337H adota uma conformação muito próxima do tipo normal em pH 7 mas tem uma estabilidade térmica muito menor. Posteriormente, verificaram que o tetrâmero de R337H é altamente sensível a pequenas mudanças de pH. Levantou-se a hipótese de que tais alterações possam afetar a carga da histidina, comprometendo sua capacidade de formar a ponte de sal com Asp 352 (ácido aspártico 352). Observou-se também que o anel imidazol da histidina é desprotonado em pH fisiológico alto, resultando em colapso da ponte de sal em pH mais alcalino (o pKa da histidina é 7,7). Assim, o mutante R337H funciona normalmente quando His337 está protonada, mas pode não adotar conformação adequada em pH mais alcalino, também dependendo da temperatura. Portanto, a proteína mutada p53tet-R337H (proteína tetramérica p53 R337H) é menos estável que o tipo normal p53-tet-wt (proteína p53-alelo selvagem), sendo sensível a mudanças de pH e temperatura (LEE *et al.*, 2003).

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

Após a identificação da mutação R337H pelo grupo de Curitiba, LATRONICO *et al.* (2001) pesquisaram a presença dessa mutação em 55 pacientes (37 adultos e 18 crianças) com TCAs esporádicos benignos e malignos, sem características familiares de SLF. Também foram avaliados 21 parentes dos pacientes e 60 indivíduos não aparentados e sem tumor. A mutação foi identificada em 19 pacientes [14 crianças

(77,7%) e 5 adultos (13,5%)], demonstrando ser mais comum na população pediátrica com TCA, porém podendo acontecer também em adultos.

Considerando a elevada frequência da mutação germinativa R337H na população do sul do Brasil, foi cogitada a possibilidade de existir um ancestral comum (efeito fundador). RIBEIRO *et al.* (2001) analisaram quatro diferentes marcadores polimórficos ao longo do braço curto do cromossomo 17. Demonstraram que alguns alelos mutantes se originaram independentemente, assim eliminando a presença de um efeito fundador (RIBEIRO *et al.*, 2001). Entretanto, PINTO *et al.* (2004) acreditam ter encontrado evidência de co-segregação entre dois alelos distintos no gene *TP53* e mutação R337H, ambos com 122 pares de bases, em 56,8% (VNTRp53) e 54,5% (p53CA) dos 44 alelos dos pacientes com TCA e são a favor do efeito fundador. Análise de heredogramas de famílias no Paraná sugere que o alelo *TP53* R337H surgiu há pelo menos 110 anos (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B), e não existe prova até o presente para o surgimento de mutação *de novo*.

O papel da subunidade alfa da inibina neste processo de formação do TCA de crianças foi proposto por LONGUI e colaboradores a partir de mutações e polimorfismos encontrados em crianças com TCA (LONGUI *et al.*, 2004). Os autores realizaram esta pesquisa partindo da observação feita por outros autores que encontraram atividade supressora de tumor pela subunidade alfa da inibina em gônadas e córtex adrenal de camundongos (MATZUK *et al.*, 1992, 1994). Cem por cento dos animais sem a subunidade alfa da inibina apresentaram tumores de gônadas, e se fossem castrados com um mês de idade sobreviveriam até aparecer tumor de córtex adrenal (MATZUK *et al.*, 1994). As inibinas A (heterodímeros de subunidade alfa + beta A), B (heterodímeros de subunidade alfa + beta B) e ativinas (homodímeros de subunidades beta "A+A", "B+B" e "A+B") são produzidas em vários tecidos, principalmente nas gônadas, onde desempenham um papel metabólico importante no controle da secreção do hormônio folículo-estimulante (FSH) hipofisário.

2.4 OUTROS FATORES QUE PODEM CONTRIBUIR NA FORMAÇÃO DO TCA NA PRESENÇA DO ALELO *TP53* R337H E PERDA DO *TP53* SELVAGEM

Diferentes síndromes genéticas predis põem ao desenvolvimento de TCA. Entre elas, as síndromes de Beckwith-Wiedemann, Li-Fraumeni, McCune-Albright, Carney e neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (Tabela 2). Estudos relacionados a essas síndromes têm permitido progressos na compreensão da tumorigênese adrenocortical. O tumor de Wilms e o TCA são as neoplasias mais freqüentemente encontradas em pacientes com a síndrome de Beckwith-Wiedeman (BWS) (STEENMAN *et al.*, 2000). As alterações genéticas mais freqüentemente encontradas no BWS localizam-se no braço curto do cromossomo 11 (11p15), descritas como BWSCR1 [onde se encontra o gene do fator 2 de crescimento insulina símile (IGF-II)], BWSCR2 e BWSCR3 (STEENMAN *et al.*, 2000). As evidências encontradas sugerem que a expressão elevada de IGF-II pode ser um dos responsáveis pelo aparecimento de alguns casos de TCA (ILVESMAKI *et al.*, 1993; BOULLE *et al.*, 1998). A expressão do IGF-II em adultos vem quase exclusivamente do alelo paterno, fenômeno conhecido como *imprinting*, tendo sido reportada a perda do alelo materno e às vezes ganho de mais de um alelo paterno (GICQUEL *et al.*, 1994). Outra evidência para maior atividade do IGF-II foi a descoberta de alguns casos de TCA com aumento da expressão de um dos seus receptores [receptor para o fator 1 de crescimento similar à insulina (IGF1R)] (WEBER *et al.*, 1997). Entretanto, o processo de formação do tumor a partir da hiperfunção do IGF-II depende de outros fatores.

Animais transgênicos com aumento da expressão de IGF-II apresentam hiperplasia, porém sem malignidade, o que sugere que o mecanismo é diferente em camundongos ou é preciso ter a mesma anatomia e participação de outros elementos (WEBER *et al.*, 1999). Uma das diferenças entre o córtex adrenal do ser humano e de camundongos e ratos (Figura 1) está no desenvolvimento e no zoneamento do córtex adrenal (particularmente com relação à zona reticular e zona fetal "X").

TABELA 2 - SÍNDROMES GENÉTICAS QUE PREDISPÕEM AOS TCA

SÍNDROME	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 para H19, p57kip2 e IGF-II).
Li-Fraumeni	Susceptibilidade familiar a vários cânceres (osteossarcoma, mama, cérebro, córtex adrenal, leucemia, entre outros).	Mutação germinativa do <i>TP53</i> .
McCune-Albright	Displasia fibrosa polioestótica, manchas café com leite, puberdade precoce, Endócrinos.	Mosaicismo para mutação ativadora do gene <i>GNAS1</i> .
Complexo de Carney	Doença adrenocortical primária nodular pigmentada, schwannomas, mixomas, Lentigo.	Mutação no loci 2p16, *
Neoplasia Endócrina Múltipla tipo 1	Hiperparatireoidismo, tumor duodenal pancreático. Tumores hipofisários.	Mutação germinativa do gene . Meningite.

FONTE: Traduzido de GICQUEL *et al.* (2000). * O gene localizado no cromossomo 17, *PRKAR1A* (STRATAKIS, 2001) e outros, também participam.

As células do córtex adrenal respondem aos estímulos dos Receptores Ativadores da Proteína G (GPCR) e receptores de melanocortina-2 (MC2R). Este último tipo aumenta a produção de c-AMP dependente de proteína quinase (PKA) e conseqüentemente a fosforilação de proteínas. O aumento da atividade de GPCR tem sido relatado em outros tumores endócrinos (KIRSCHNER *et al.*, 2002). O resultado da estimulação aumentada pelo hormônio estimulante do córtex adrenal (ACTH) é a hiperplasia adrenal, mas esta via ACTH-MC2R-PKA não tem relação com o aparecimento do TCA e até existem grupos (REINCKE *et al.*, 1997) que admitem existir alguns carcinomas e não adenomas com perda de atividade do receptor MC2R. A expressão aumentada de membros da família de receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR) tem sido encontrada em adenomas e carcinomas do córtex adrenal (SASANO *et al.*, 1994; KAMIO *et al.*, 1999), porém não existem provas de que estas alterações sejam suficientes para causar o TCA (KIRSCHNER *et al.*, 2002).

O gene supressor de tumor de Wilms (WT-1) codifica uma proteína que está envolvida no desenvolvimento do tumor de Wilms e outros tumores derivados do blastema metanéfrico (HABER *et al.*, 1990; CALL *et al.*, 1990). Mutações do WT-1 são associadas com anomalias congênitas do desenvolvimento urogenital (LITTLE & WELLS, 1997). Não se esperava que o WT-1 fosse importante para o desenvolvimento da adrenal, pois ele não é expresso na adrenal primitiva, mas somente nos precursores mais precoces, ou seja, células progenitoras adreno-gonadais (SCHEDL & HASTIE, 1998, em PARKER & SCHIMMER, 2001). No entanto, evidências contundentes para o seu papel vieram de análises de camundongos sem WT-1. Conforme se previa, a partir da observação de pacientes, esses camundongos não apresentaram rins nem gônadas; mas, surpreendentemente, também não apresentaram adrenais (MOORE *et al.*, 1999). Estudos com hibridização *in situ* demonstraram que a expressão de fator esteroideogênico 1 (SF-1) é acentuadamente diminuída em camundongos sem WT-1, sugerindo um modelo hierárquico, no qual 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 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 (HAMMER *et al.*, 2004).

SF-1 é um membro da superfamília de receptores nucleares órfãos, também conhecido como Proteína 4 de Ligação à Adrenal (Ad4BP) e classificado como NR5A1. É codificado pelo gene *SF-1*, localizado no cromossomo 9q33 (TAKETO *et al.*, 1995). O gene *SF-1* codifica a transcrição de uma proteína nuclear de aproximadamente 53 kDa, e recebeu o nome de fator-esteroideogênico 1, devido ao seu papel chave na regulação das hidroxilases esteróides. Por analogia com seres humanos, com ausência de expressão de hidroxilases esteróides, PARKER & SCHIMMER (2001), imaginaram que as glândulas adrenais do camundongo sem SF-1 poderiam ser hiperplásicas, devido à incapacidade de produzir glicocorticóides, com conseqüente exposição a altos níveis de corticotropina (ACTH); contudo, verificaram que as gônadas e adrenais estavam ausentes nesses camundongos. Estudos subseqüentes mostraram que na ausência de SF-1, as gônadas e adrenais estavam presentes nos estágios iniciais de

desenvolvimento, seguidas de regressão. A identificação e análise de mutações do SF-1 nos seres humanos mostrou um comportamento semelhante, com insuficiência adrenal e reversão sexual de 46,XY (OZISIK *et al.*, 2003).

DAX-1 (*Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene-1*), também descrito como NROB1, é um membro da superfamília de receptores hormonais nucleares órfãos. Seu nome vem de seu duplo papel na fisiopatologia humana (BARDONI *et al.*, 1994). Duplicações no Xp21, que contém o gene DAX-1, causam reversão sexual fenotípica nos indivíduos XY; mutações do gene DAX-1 são responsáveis pela hipoplasia adrenal congênita (HAC), ligada ao cromossomo X, invariavelmente associada com hipogonadismo hipogonadotrófico (HHG). DAX-1 foi localizado no braço curto do cromossomo X, após a descoberta da rara associação de HAC ligada ao cromossomo 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, duplicação desta região do Xp foi 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, 1995).

O produto do gene DAX-1 é um membro incomum da super-família de receptores hormonais nucleares, pois não contém o domínio de ligação ao DNA (DBD) típico de dedo de zinco, encontrado na maioria dos receptores nucleares. DAX-1 trabalha como regulador negativo da ativação de transcrição induzida por SF-1, através de um poderoso domínio de repressão transcricional presente na região Carboxi-terminal (LALLI *et al.*, 1997; ITO *et al.*, 1997).

DAX-1 pode reprimir a transativação de SF-1, seja por se ligar à regiões promotoras dos genes regulados por SF-1 [por exemplo, proteína de regulação aguda da esteroidogênese (StAR) e DAX-1] (ZAZAPOULOS *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 ligações funcionais de SF-1 na região promotora do gene DAX-1 (YU *et al.*, 1998) e a expressão reduzida de DAX-1 em camundongos sem SF-1 (KAWABE *et al.*, 1999; HOYLE *et al.*, 2002) sugere um mecanismo de retro-alimentação negativa para controlar a atividade de SF-1 nos tecidos esteroideogênicos e reprodutivos.

SF-1 se liga eficientemente aos elementos de DNA encontrados na região promotora de DAX-1, sugerindo que SF-1 pode diretamente regular a expressão de DAX-1 e assim, SF-1 pode estar 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).

FIGUEIREDO *et al.* (1999) analisaram nove TCAs por hibridização genômica comparativa (CGH), sendo 5 carcinomas e 4 adenomas. Ganhos de material genético foram encontrados nos seguintes cromossomos: 1q, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 9q, 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. Poucos meses depois, JAMES *et al.* (1999), em Manchester, Inglaterra publicaram seus achados em 11 TCA pediátricos, analisados por CGH, confirmando a ocorrência de amplificação da região 9q34.

A região 9q34 alberga vários genes que poderiam estar, de alguma forma, influenciados pela amplificação ou participantes da amplificação. Entre eles salientam-se o oncogene *c-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 *et al.*, 1994), gene ou genes para o câncer de ovário e síndrome do carcinoma basocelular nevíde familiar (síndrome de Gorlin) (DEVLIN *et al.*, 1996), carcinoma de células transicionais da bexiga, o gene do receptor alfa X retinóide (JONES, 1993), o oncogene *vav-2* (HENSKE *et al.*, 1995), gene do receptor-1 do fator β transformador do crescimento (TGFBFR1)(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 esteroideogênicas (TAKETO *et al.*,

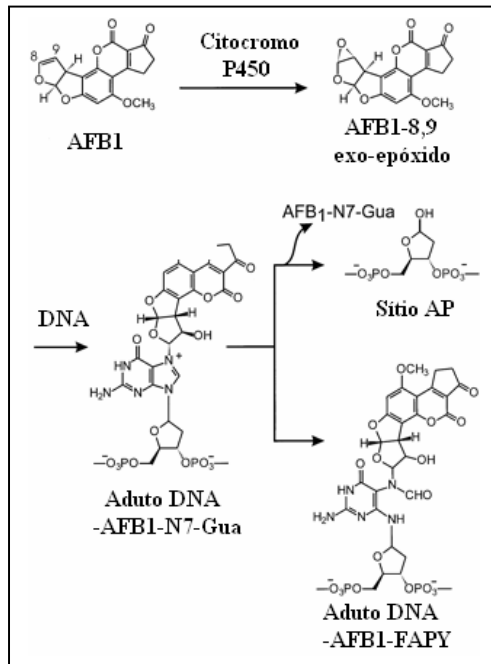
1995), que é o SF-1 (MOROHASHI *et al.*, 1993; RICE *et al.*, 1991). Mais recentemente FIGUEIREDO *et al.* (2005) e PIANOVSKI *et al.* (2006) demonstraram, empregando a técnica de hibridização fluorescente “*in situ*” (FISH), que o gene do SF-1 é um dos candidatos (ou o único) com amplificação no TCA, apresentando acima de 4 cópias por célula, o que corresponde a uma expressão elevada da proteína SF-1 (PIANOVSKI *et al.*, 2006). Com base nestas evidências formulou-se a hipótese de que o SF-1 pode contribuir na etiopatogenia do TCA, favorecendo o aumento da esteroidogênese e/ou estimulando o crescimento compensatório da adrenal em resposta a adrenalectomia (BEUSCHLEIN *et al.*, 2002).

2.5 LIÇÕES DA AFLATOXINA B₁ AMBIENTAL RESPONSÁVEL PELA MUTAÇÃO TP53 R249S

A aflatoxina B₁ (AFB₁) é produzida pelo fungo *Aspergillus flavus* e outros tipos que crescem em alimentos estocados como milho, arroz e amendoim (BUSBY & WOGAN, 1984; MILLER, 1978). Após a ativação metabólica a AFB₁ (Figura 4), esta age preferencialmente no códon 249 do gene TP53 para causar uma mutação, mudando preferencialmente a terceira base, AGG (arginina)→AGI (serina), mas podendo também acontecer AGG→ATG (metionina); mutação no códon 248, CGG (arginina) →CGI (arginina), CGG (arginina) →CTG (leucina). Entre as várias causas do carcinoma hepático celular (CHC), o TP53 R249S participa em função do grau de exposição à AFB₁, sendo de 44% na China (Qidong e Tongan), Índia, Sul da África, Gâmbia, Moçambique e Senegal, com predominância de GC→TA (KATIYAR *et al.*, 2000; KIRK *et al.*, 2000; RASHID *et al.*, 1999; SHIMIZU *et al.*, 1999, YANG *et al.*, 1997), 7% em Beijing, Shangai, Hong Kong, Singapura, Coreia do Sul, Taiwan, Tailândia, Vietnam, Sul da Ásia, Sul da África e Egito (LUNN *et al.*, 1999; RASHID *et al.*, 1999; LUNN *et al.*, 1997; SHEN *et al.*, 1996), e de apenas 1% em regiões com baixa exposição à AFB₁, como Austrália, Europa, Japão e Estados Unidos (KATIYAR *et al.*, 2000; SHIMIZU *et al.*, 1999; VAUTIER *et al.*, 1999; BOIX-FERRERO *et al.*, 1999). A mutação R249S parece ser a única causada pela AFB₁ (SOHN *et al.*, 2000; WANG *et al.*, 1999). Uma pessoa com infecção por hepatite B, mesmo sem exposição à AFB₁,

tem um risco 4 vezes maior de desenvolver CHC (SHEN e ONG, 1996). Os mecanismos envolvendo um dos produtos do vírus da hepatite B (HBx) incluem ligação e inativação à proteína p53 (TRUANT *et al.*, 1995; WANG *et al.*, 1994).

FIGURA 4 – MECANISMO DE ATIVAÇÃO DA AFB1



NOTA - Mecanismo de ativação metabólica de AFB₁ pela isoenzimas CYP (citocromo P450), formando AFB₁-8,9-exo-epóxido, seguido de ligação à guanina do DNA. Entre os produtos iniciais formados, o aduto 8,9-dihidro-8-(N7-guanil)-9-hidroxiaflatoxina B₁ (AFB₁-N7-Gua) é o principal, o qual possui um anel glicosídico instável facilitando a liberação do sítioapurínico (sítio AP). Pode também acontecer que o aduto DNA-AFB₁-N7-Gua sofra uma abertura do anel imidazólico originando o aduto química e biologicamente estável, a formamidopirimidina (AFB₁-FAPY).

Revisado por SMELA *et al.*, 2001, figura reproduzida com permissão da Editora Oxford University.

Entretanto, notou-se que a frequência de mutações no códon 249 causada por AFB₁ era muito maior quando a linhagem de células estava exposta ao HBx (SOHN *et al.*, 2000), de tal forma que o mecanismo não parece ser um contato direto de HBx com o gene *TP53*, mas por outro mecanismo, provavelmente inibindo a apoptose, permitindo que células hepáticas lesadas pela AFB₁ sobrevivam e sejam selecionadas para continuar proliferando. Entretanto, não se sabe por qual mecanismo pessoas positivas para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg) sofrem especificamente mudança na guanina da terceira base do códon 249 (a transversoão GC→TA), e o contrário, onde existia casos negativos para HBsAg, a mutação encontrada acontece em outra guanina (SHEN & ONG, 1996; KATIYAR *et al.*, 2000 ; KIRK *et al.*, 2000). Neste sentido,

percebeu-se que existe um sinergismo entre AFB₁ e HBsAg levando ao CHC que é da ordem de 60 vezes, ou seja, um risco maior do que a soma dos riscos isolados, exposição ao VHB ou AFB₁ (ROSS *et al.*, 1992).

Não existe nada parecido nas mesmas proporções entre um fator ambiental e mutação no gene *TP53*, reproduzindo sempre a mesma alteração no códon 249. Este padrão foi considerado como um comportamento único, merecendo a expressão de “a assinatura da AFB₁ no gene *TP53*”. Pode-se deduzir que existe a possibilidade de se encontrar um produto químico responsável pela mutação R337H no *TP53*. A diferença entre as duas mutações apresentadas (R249S e R337H) é que todo processo no CHC causado por R249S é exclusivamente somático, ao contrário de R337H que até o presente foi encontrada apenas em linhagem germinativa, sempre presente em um dos pais e/ou em um dos avós. Este projeto não visa determinar a causa ambiental para o aparecimento da mutação R337H no *TP53*, porém outro grupo de pesquisa está desenvolvendo um estudo epidemiológico muito amplo (GEOMEDICNA) com a finalidade de verificar se existem evidências para este fenômeno no Paraná. O conjunto de informações obtidas, freqüência do alelo *TP53* R337H e sua distribuição nos diferentes municípios do Paraná juntamente com estudo epidemiológico detalhado dos possíveis fatores ambientais mutagênicos em nosso estado, certamente trará valiosa contribuição para a elucidação da etiopatogênese do TCA no estado do Paraná.

2.6 PREVALÊNCIA DE UM GENE NUMA POPULAÇÃO

O sistema HLA possui mais de 70 genes, e vários deles foram relacionados com maior probabilidade de desenvolver certos tipos de câncer (DAUSSET *et al.*, 1982), uma associação geralmente avaliada pelo risco relativo (RR) superior a 1 (HANSEN & SACHS, 1989). RR é definido pela freqüência do gene em indivíduos que têm o câncer, em relação à freqüência do gene em indivíduos que não têm a doença, de acordo com a fórmula de Woolf modificado por Haidane (WOOLF, 1992). A precisão da freqüência de determinado gene geralmente fica limitada pela pequena amostragem

no grupo controle, e pela amostragem ainda menor no grupo com a doença. Uma pesquisa reportou uma freqüência dos alelos HLA-DRB1 alelos 0406, 0410 e 1405 maior no grupo com câncer de próstata (n=57) do que na população geral (7.3%, 4.5% e 5.4% versus 3.03%, 1.79% e 2.22%, $p < 0.05$, respectivamente, n=1216), encontrando para cada alelo HLA-DRB1 0406, 0410 e 1405, um RR acima de 2,6 (AZUMA *et al.*, 1999). Entretanto, para genes como estes que apresentam freqüência elevada na população, não há problemas em se avaliar sua freqüência utilizando pequeno número de amostras; o contrário acontece com o *TP53* R337H que, apesar de ser encontrado em quase 100% dos casos de TCA (RIBEIRO *et al.*, 2001), sua freqüência na população geral fora do sul e sudeste do Brasil é muito baixa e no Paraná onde o TCA é 12-18 vezes mais freqüente (PIANOVSKI *et al.*, 2006) a sua penetrância é baixa (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B). Sendo assim, a freqüência de *TP53* R337H em determinada população é mais trabalhosa para ser estimada por ser preciso avaliar um número maior de pessoas por região ou município. Anteriormente, a freqüência de *TP53* R337H foi estimada com base na freqüência do fenótipo, ou seja, com base na freqüência de casos de TCA já avaliados e na penetrância do gene que gera o tumor. Por esta razão, optou-se neste trabalho pelo cálculo da freqüência na população geral.

Uma doença autossômica recessiva como a fenilcetonúria (PKU), acontece mais ou menos com a mesma freqüência por ano no Paraná que o TCA de crianças (aproximadamente 14 casos/ano). O PKU é mais freqüente em regiões onde existem casamentos consangüíneos, mas por ser relativamente pouco freqüente na população torna-se difícil calcular a freqüência dos heterozigotos. Por analogia, a probabilidade de se encontrar um casal de heterozigotos gerando um indivíduo com PKU com dois alelos mutados é aparentemente a mesma probabilidade de uma criança ter TCA por ter nascido com um alelo *TP53* R337H, seguido de perda do segundo alelo (selvagem) no córtex adrenal juntamente com a contribuição de outros fatores para finalmente desenvolver o TCA. A diferença é que nem toda criança com dupla mutação (*TP53* R337H herdada juntamente com qualquer outra mutação somática que elimine a função do *P53* selvagem, ou então um indivíduo homozigótico para *TP53* R337H que herdou um alelo da mãe e outro do pai) irá apresentar o fenótipo (TCA), haja vista que a

mutação não é suficiente para o aparecimento do TCA. Conforme citado anteriormente neste trabalho, inúmeros outros fatores podem estar envolvidos no processo de desenvolvimento do TCA (hipótese de origem multifatorial). Levando-se em conta que o número de casos de PKU por ano é semelhante ao número de casos de TCA por ano no Paraná, pode-se então formular a hipótese de que a frequência de *TP53* R337H no Paraná é mais comum do que a frequência do gene recessivo para PKU.

2.7 ASPECTOS DEMOGRÁFICOS DO ESTADO DO PARANÁ

2.7.1 Demografia

Segundo o censo de 2000, o estado do Paraná tem uma população de 9.564.643 habitantes. Em relação ao ano de 1991, quando a população era de 8.415.659 habitantes, esses números mostram uma taxa de crescimento anual de 1,4%, inferior à do Brasil como um todo (1,6% para o ano 2000). Ainda segundo o censo de 2000, o Paraná é o sexto estado mais populoso do Brasil e concentra 5,63% da população brasileira. Do total da população do estado, 4.826.038 habitantes são mulheres e 4.737.420 habitantes são homens. Para 2005, a estimativa era de 10.261.856 habitantes (www.ibge.gov.br/estados).

Esse crescimento é explicado não só pelo aumento natural da população paranaense, mas também pela entrada de colonos vindos principalmente de São Paulo, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Minas Gerais, atraídos pelos solos férteis de matas ainda virgens.

O censo de 2000 revelou que a população urbana do Paraná é hoje maior que a população rural. Cerca de 58% dos habitantes do estado moram nas cidades. A densidade demográfica estadual é de 47,9 hab./km². Em Curitiba e nos municípios da região a densidade demográfica chega a 206,6 hab./km².

2.7.2 Colonização

As terras que hoje pertencem ao Estado do Paraná eram habitadas, durante a época do descobrimento do Brasil pelos índios carijós do grupo tupi e pelos caingangues do grupo jê (<http://pt.wikipedia.org>).

Durante o século XVI, a região do atual Estado do Paraná ficou abandonada por Portugal. Aproveitando-se disto, inúmeras expedições de outros países visitaram-na em busca de madeiras de lei. As mais importantes foram as espanholas, que chegaram a criar núcleos de povoamento no oeste paranaense.

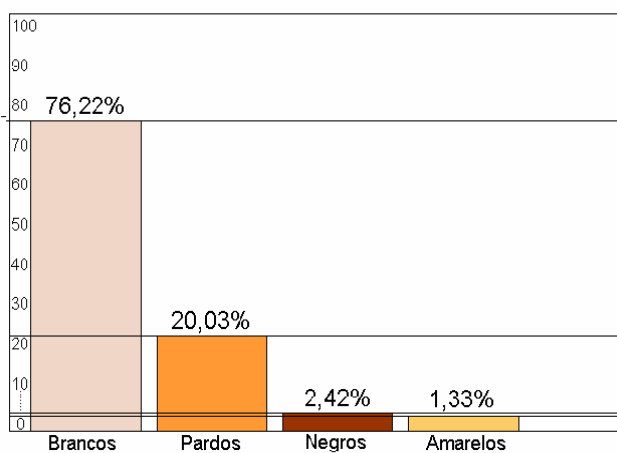
A partir de então, um programa oficial de imigração européia contribuiu para a expansão do povoamento e o aparecimento de novas atividades econômicas. As maiores levas de imigrantes que chegaram foram os poloneses, ucranianos, alemães e italianos e, os menores contingentes, suíços, franceses e ingleses. Para receber os novos habitantes para a região, foram fundados núcleos coloniais, principalmente no Planalto de Curitiba. Iniciou-se a exploração da madeira.

Na segunda metade do século XIX estimulou-se um tipo de colonização orientada para a criação de uma agricultura que suprisse as necessidades de abastecimento. Criaram-se núcleos coloniais nas proximidades dos centros urbanos constituídos de poloneses que se instalaram principalmente na região norte de Curitiba, alemães e italianos que se concentraram nas cidades da região metropolitana como São José dos Pinhais e Colombo, e em grupos menores, suíços, franceses e ingleses. Esses contingentes de imigrantes imprimiram à fisionomia étnica do Paraná uma notável variedade, sendo que em alguns lugares do Paraná se fala somente o holandês e em outras regiões do estado se fala somente o alemão, italiano, ucraniano, polonês e até o japonês, sem contar as línguas nativas de tribos indígenas.

2.7.3 Grupos Étnicos Predominantes no Paraná

A população do Paraná é composta basicamente de brancos, pardos, negros e indígenas.

FIGURA 5 - PERCENTUAL DE COR DE PELE NO PARANÁ



FONTE: IBGE, 1999.

No Brasil colonial, os colonizadores espanhóis foram os primeiros a iniciar o povoamento no território paranaense. Os portugueses e seus descendentes são a maioria da população do Estado. Existe também uma grande e diversificada população de descendentes de imigrantes, tais como italianos, alemães, poloneses, ucranianos, japoneses e árabes. Há também minorias de imigrantes holandeses, coreanos, chineses e búlgaros.

2.7.3.1 Portugueses

Os portugueses e seus descendentes constituem a maioria da população por terem sido o elemento colonizador e também por ser o único que não sofre restrições numéricas de entrada no Brasil. Estão presentes em todo o Paraná.

2.7.3.2 Espanhóis

Os espanhóis entraram no Brasil notadamente na época do Brasil Colônia, quando Portugal pertencia à Espanha. Localizaram-se junto às grandes cidades como São Paulo e Rio de Janeiro. No estado do Paraná, além de se concentrarem na região de Curitiba e de Jacarezinho, descendentes de espanhóis (argentinos e paraguaios) são encontrados na fronteira com o Paraguai e a Argentina, principalmente na região de Foz do Iguaçu.

2.7.3.3 Italianos

Os italianos começaram a chegar em maior número ao Brasil a partir de 1871. Dirigiram-se principalmente ao estado de São Paulo, onde se dedicam à cultura cafeeira e às atividades industriais. Também são numerosos no Rio Grande do Sul, onde se dedicam ao cultivo e à fabricação do vinho. No Paraná, imigrantes italianos se estabeleceram a princípio no litoral (Morretes), porém, devido às condições adversas do lugar, seus núcleos não progrediram. A maior parte transferiu para os arredores de Curitiba, Colombo e Santa Felicidade. Também são muito expressivos nas regiões norte e oeste, devido à migração interna.

2.7.3.4 Alemães

Os alemães formam um dos mais importantes grupos da imigração brasileira; sua influência é muito notada no Sul do Brasil. Os primeiros imigrantes chegaram ao Paraná em 1829, estabelecendo-se em Rio Negro. A partir de 1878, alemães do Volga (alemães-russos) estabeleceram-se nos Campos Gerais, próximos à Ponta Grossa e Lapa. Em 1951, alemães transferiram-se de Santa Catarina para o Paraná, na cidade de Palmeira e Guarapuava. No norte, os alemães se concentram em Cambé e Rolândia. Também são bastante numerosos em Curitiba.

2.7.3.5 Holandeses

Os holandeses (ou mais corretamente, "neerlandeses") são pouco numerosos e seus principais núcleos estão em Carambeí, Castrolândia e Arapoti. Ainda de origem germânica, estabeleceram-se, em proporções menores em terras paranaenses: austríacos, suíços, ingleses e estadunidenses.

2.7.3.6 Poloneses

Os poloneses foram o grupo mais numeroso de imigrantes do Paraná. Começaram a chegar em 1871, distribuindo-se pelos arredores de Curitiba, Araucária, São José dos Pinhais, Contenda e Campo Largo. Também se expandiram pelo centro-sul, formando colônias em Mallet, Cruz Machado, São Mateus do Sul, Irati, União da Vitória, Prudentópolis e Londrina.

2.7.3.7 Ucrânianos

Os ucranianos distinguem-se dos poloneses pela língua, pelos costumes e pela sua origem histórica. Formaram núcleos importantes em Prudentópolis, Ponta Grossa, União da Vitória, Cruz Machado, Vera Guarani, Rio Azul, Ivaí, Apucarana, Campo Mourão, Guarapuava e Curitiba.

2.7.3.8 Árabes e judeus

O maior grupo de brancos asiáticos encontrados no Brasil pertence aos povos semitas da Ásia Menor. São os judeus, os árabes, os sírios e os libaneses, espalhados pelas grandes cidades, inclusive em Curitiba.

2.7.3.9 Japoneses

Os japoneses são os que mais vêm para o Brasil. Dirigiram-se em sua maioria para São Paulo, Amazônia e norte do Paraná.

No Paraná, as primeiras colônias japonesas foram fundadas no litoral, mas o grande reduto de japoneses é o norte, principalmente em Londrina, Assaí, Maringá e Cambará.

2.7.3.10 Indígenas

A distribuição primitiva do índio no Paraná limitava-se aos do grupo tupi-guarani no litoral, no oeste e noroeste; aos Jê (botocudo e caingangue) com distribuição geográfica mal definida, mas preferencialmente sobre a Floresta de Araucária e ao grupo Xetá, que se instalaram no noroeste do estado. Os poucos descendentes indígenas existentes são protegidos pela FUNAI, e vivem em postos como São Jerônimo da Serra, Guarapuava, Palmas, Mangueirinha, Apucarana, Laranjeiras do Sul e outros.

2.7.3.11 Africanos

No Paraná, o negro aparece em menor número, concentrando-se primeiramente na Lapa, Ponta Grossa, Castro, Antonina, Paranaguá e Curitiba.

2.7.4 Municípios

A distribuição dos grandes municípios do Paraná é de certa forma bem homogênea (Figura 6). No leste, a Região Metropolitana de Curitiba engloba diversos municípios, contando com cerca de 3 milhões de habitantes. No norte, Londrina e Maringá polarizam outra região fortemente povoada. No oeste, a cidade de Cascavel com quase 280 mil habitantes e Toledo com pouco mais de 100 mil criam outra zona fortemente povoada, além de Foz do Iguaçu, que juntamente com Ciudad del Este no Paraguai e Puerto Iguazu na Argentina formam uma aglomeração de quase 700 mil habitantes. Na região central do Paraná, a despeito da baixa densidade populacional, encontra-se Guarapuava com cerca de 160 mil habitantes e Ponta Grossa, um pouco mais ao leste, com cerca de 300 mil.

Em ordem decrescente de número de habitantes, os 10 principais municípios do Paraná baseado nas estimativas do IBGE de 2005 estão descritos na Tabela 3.

TABELA 3 – PRINCIPAIS MUNICÍPIOS DO PARANÁ

Municípios	Número de habitantes
Curitiba	1.757.904
Londrina	488.287
Maringá	318.952
Foz do Iguaçu	301.409
Ponta Grossa	300.196
Cascavel	278.185
São José dos Pinhais	252.470
Colombo	224.404
Guarapuava	166.897
Paranaguá	144.797

FONTE – IBGE, 2005

Numa avaliação cartográfica da densidade populacional do Paraná (Figura 6) e dos nascidos vivos em 2004 no Paraná (Figura 7), reproduzindo dados da Tabela 3, percebe-se as localidades onde este projeto deverá ter maior número de maternidades cadastradas para coleta de exame de DNA dos recém-nascidos.

FIGURA 6 - DISTRIBUIÇÃO DA POPULAÇÃO NO PARANÁ

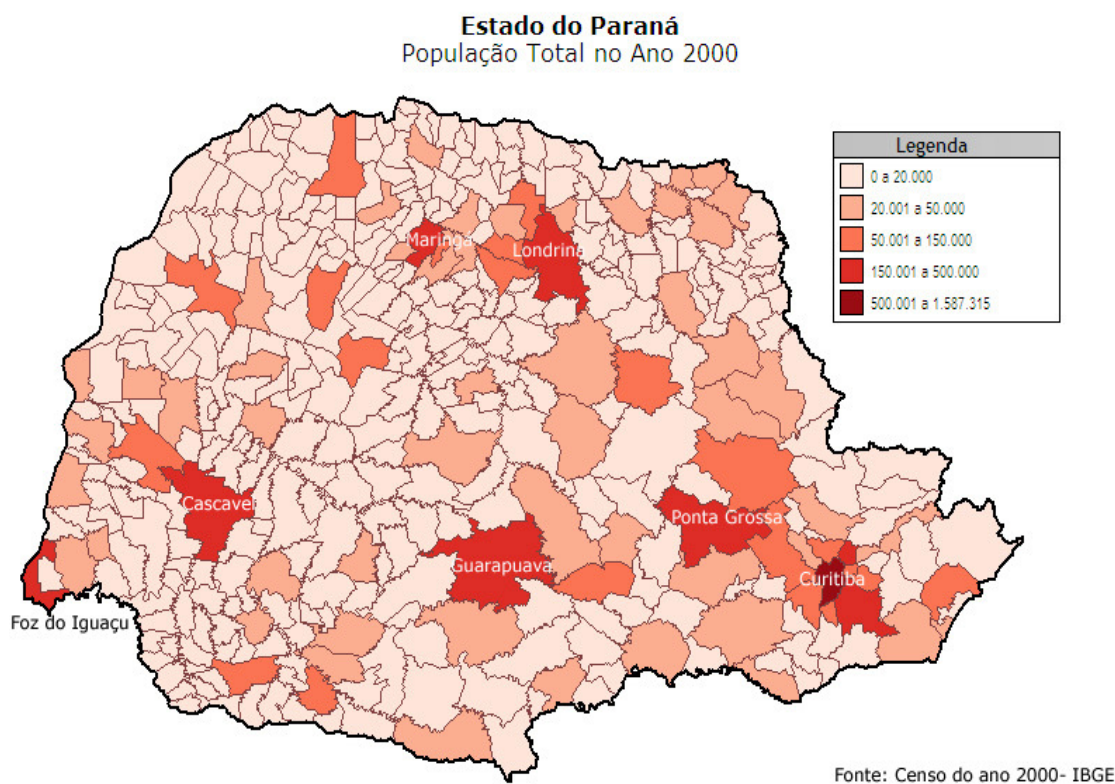
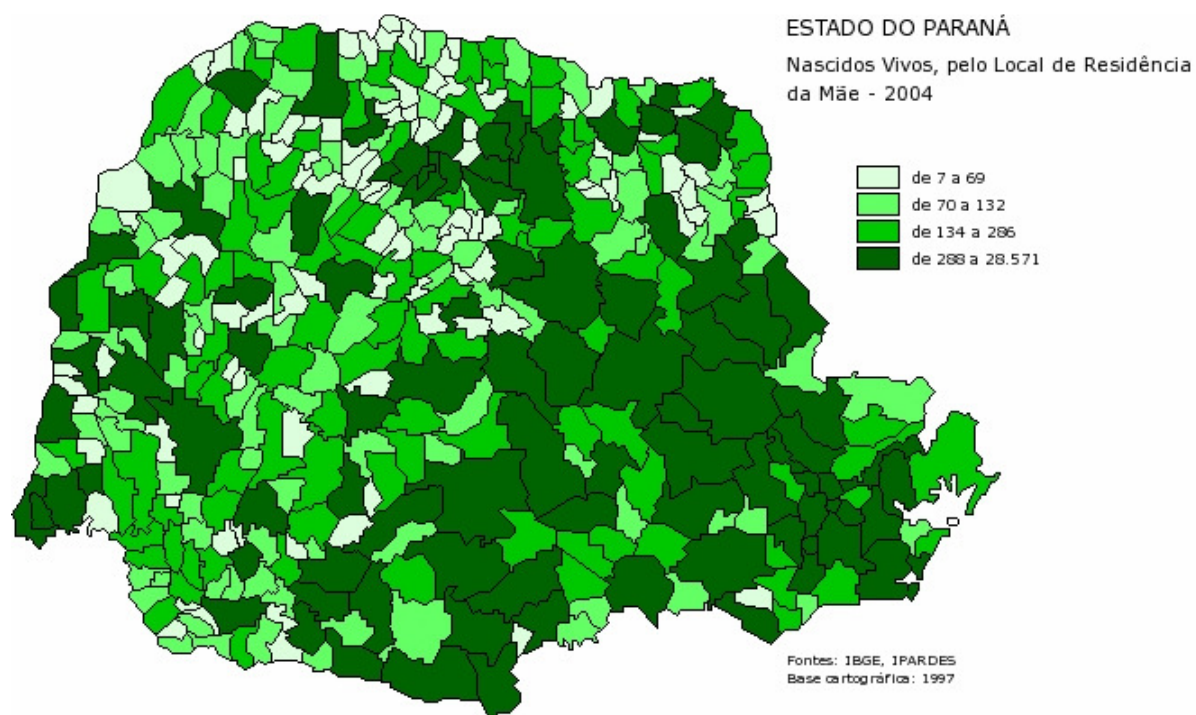


FIGURA 7- NASCIDOS-VIVOS PELO LOCAL DE RESIDÊNCIA DA MÃE



2.8 CONSIDERAÇÕES SOBRE O PROGRAMA NACIONAL DE TRIAGEM NEONATAL (PNTN).

O PNTN do Ministério da Saúde (MS) tem como objetivo avaliar os RNs vivos para identificar um grupo de indivíduos (de 0 a 30 dias de vida) com maior probabilidade de apresentarem determinadas patologias (BRASIL, Ministério da Saúde, 2002).

Pela portaria GM/MS nº 822 de 06 de junho de 2001, o PNTN estendeu a avaliação para as seguintes patologias: fenilcetonúria, hipotireoidismo congênito, doenças falciformes e outras hemoglobinopatias e fibrose cística. Atualmente o PNTN tem amparo legal para a realização obrigatória desta triagem em todo o território nacional, envolvendo desde a detecção precoce, cobertura nacional com meta de 100% dos nascidos vivos, busca ativa dos RNs suspeitos de serem portadores das patologias, confirmação diagnóstica, acompanhamento e tratamento adequados e ainda a criação de um banco de dados nacional.

O PNTN também possibilita a utilização das informações do banco de dados nacional para realizar estudos epidemiológicos e de projeções estatísticas para estabelecer novas estratégias em triagem neonatal e melhorar a qualidade do programa de triagem.

Para garantir esta qualidade, o PNTN estabeleceu normas e recomendações para diferentes atividades envolvidas no processo, desde a obtenção da amostra até a confirmação diagnóstica da patologia detectada no RN. Em cada fase, as recomendações visam alertar para possíveis causas de erros no processo analítico e padronizar as rotinas operacionais do programa. Os principais cuidados a serem tomados na coleta das amostras são:

- no laboratório especializado do Serviço de Referência em Triagem Neonatal: definir os postos de coleta de fácil acesso, distribuir material de coleta, treinar os profissionais da coleta e administração para a agilidade nos procedimentos;

- na obtenção das amostras: contemplar as diversas circunstâncias para os partos, como por exemplo os nascimentos em instituições ou em domicílio, a recusa dos pais à coleta e a necessidade de segunda coleta;

- nos postos de coleta: garantir as condições ideais para o armazenamento do papel de filtro, de iluminação, limpeza e ventilação adequados do ambiente de coleta, o registro dos dados de identificação do RN a ser testado, a seqüência do procedimento padrão preconizado para a realização da coleta da amostra de cada criança conforme Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do PNTN, alertando para os cuidados na utilização de luvas, posição da criança, verificação da qualidade da amostra coletada, secagem da amostra, condições de armazenamento das amostras secas, realização dos registros das atividades realizadas no posto de coleta, remessa das amostras ao laboratório especializado e entrega dos resultados.

2.8.1 Dificuldades Práticas da Triagem Neonatal

Várias são as dificuldades práticas já reconhecidas em Programas de Triagem Neonatal e que requerem ações e decisões imediatas para evitar erros. Entre as principais dificuldades foram apontadas: problemas na coleta e armazenamento da amostra, limitações da idade da criança, problemas relacionados com as diferentes condições laboratoriais, problemas na busca ativa da criança com teste alterado mas não facilmente localizável e dificuldades relacionadas com o estado de saúde da criança.

2.8.1.1 Coleta e armazenamento da amostra

O que tem sido reportado pelos diversos centros inclui:

- as amostras só devem ser coletadas no papel de filtro fornecido pelo laboratório;

- o papel de filtro deve ser manuseado com cuidado para evitar contaminações;

- calor e umidade excessivos podem alterar a capacidade de absorção do papel de filtro durante sua armazenagem e secagem (esta é a causa mais freqüente de devolução de amostras inadequadas);

- amostras inadequadas por quantidade insuficiente de sangue para a realização de todos os testes ou amostras muito escuras devido ao excesso de sangue, tornando o papel de filtro endurecido e retorcido devido à coagulação;

- O uso de anticoagulantes não é permitido em nenhuma hipótese;

- O tempo ideal para coleta da amostra do RN na maternidade é um fator limitante para todos os exames do programa de triagem neonatal porque depende da idade do RN, ser ou não prematuro, e se já foi ou não alimentado. Estas limitações não acontecem para exames usando DNA como marcador de alguma alteração genética.

- O tempo de espera da amostra armazenada até a realização dos exames é de no máximo 5 dias úteis, a partir do momento da coleta da amostra.

2.8.1.2 Idade da criança

As considerações mais citadas foram:

- é preciso evitar a coleta de material de uma criança com menos de 48 horas de vida ou sem ter ingerido proteína suficiente, os quais são fatores restritivos principalmente na triagem da fenilcetonúria e em segundo lugar para o hipotireoidismo congênito (crianças com menos de 2 dias);

- prematuridade e transfusão são fatores restritivos na triagem da anemia falciforme e outras hemoglobinopatias;

- a coleta de gêmeos deve ser realizada com correta identificação das amostras das respectivas crianças;

- as crianças que permaneceram internadas após o nascimento poderão ter sua coleta adiada por até 30 dias de vida.

2.8.1.3 Laboratório analítico

Os aspectos mais importantes são:

- evitar variação das condições locais onde estão armazenadas amostras e kits de análises; alterações de temperatura, umidade, trocas de fornecedores e mudança de fabricante dos kits e outros reagentes necessários para a realização das técnicas de análise;

- é preciso manter registrados os dados da ficha de identificação de cada criança, de maneira a deixá-los disponíveis em sistemas informatizados para facilitar o acesso interno e também para as autoridades competentes;

- os resultados individuais devem expressar claramente a interpretação das mensagens utilizadas, como por exemplo amostra insuficiente, resultado inconclusivo, resultado normal;

- além dos resultados individuais, deve-se também liberar resultados em forma de listagem para arquivamento no posto de coleta;

2.8.1.4 Busca ativa

É relativamente comum aparecerem crianças de famílias com endereços incompletos, nomes ilegíveis, localidades sem nome de rua, etc, o que gera os problemas de localização de crianças que residem em locais de difícil acesso. Podem acontecer também erros no preenchimento das informações de identificação do RN. Estes problemas só são identificados quando a criança apresenta um resultado alterado. Por outro lado, as crianças que nascem em suas casas ficam inteiramente na dependência dos pais para comunicarem os postos de saúde em prazo adequado para se submeterem aos testes de triagem.

2.8.1.5 Estado de saúde da criança

E por último, para evitar outros problemas é importante também considerar que crianças com doenças, ou prematuras, que receberam transfusão, estão sob o efeito de

medicações ou em estado nutricional precário podem ter resultados falso positivos ou falso negativos para as patologias testadas.

2.8.2 Dificuldades no Aconselhamento Genético Dentro do Programa Nacional de Triagem Neonatal

A grande maioria das famílias com RN com resultado alterado no teste do pezinho e confirmado para uma doença de origem hereditária (por exemplo, fenilcetonúria) não recebe o suporte necessário para a identificação dos parentes com a mesma mutação. Isto acontece devido à indisponibilidade de exames de DNA gratuito. Conseqüentemente, a realização do aconselhamento genético para os familiares fica sempre prejudicada.

2.9 FREQUÊNCIA DE TUMORES ADRENOCORTICAIS CONGÊNITOS

É muito raro o aparecimento de tumores adrenocorticais congênitos. Na revisão apresentada por SARWAR *et al.*, 2004 foram relatados apenas 23 casos, sendo 18 carcinomas e 4 adenomas. A idade uterina mais baixa foi 27 semanas, ou seja, em um período muito anterior ao início da apoptose da zona fetal do córtex adrenal (que acontece ao nascimento da criança). Explica-se este pequeno número de casos pela dificuldade de diagnóstico nesta idade, acarretando no diagnóstico tardio quando a criança já está com alguns meses de idade pós-natal. Na experiência deste grupo de pesquisa sobre os relatos apresentados pelos pais de crianças com TCA, sempre existe um período com manifestações clínicas anterior ao diagnóstico e com duração variando de alguns meses até acima de 2 anos de idade, dependendo do grau de instrução dos pais e na demora para a procura do especialista. A estimativa da frequência exata do TCA congênito ainda é uma questão que depende da identificação de pequenas massas ou de pequeno grupo de células de TCA em estágio de crescimento lento e conseqüentemente de difícil identificação por meio dos exames de imagens.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Identificar a prevalência do alelo *TP53* R337H no Paraná.

3.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Verificar se existe mutação *de novo* em recém-nascidos.

Identificar a distribuição do alelo *TP53* R337H nas diversas regionais de saúde e grupos étnicos do Paraná.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DA PESQUISA

A população da pesquisa corresponde aos recém-nascidos de 437 hospitais e maternidades do Paraná. As análises foram realizadas no período de Dezembro/2005 até novembro/2006, visando a detecção da mutação R337H no *TP53*. Para a realização do teste no RN é necessária a assinatura da mãe do RN no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Anexo 1). Depois de confirmada a mutação no RN (segunda coleta de sangue) e identificada a mutação em um dos pais, os familiares do lado do pai ou da mãe com a mutação são convidados para se submeterem ao mesmo exame de DNA depois de assinarem outros termos de consentimento (Anexos 3, 4, 5 e 6). Aos RNs é oferecido um acompanhamento médico, laboratorial e de imagem periodicamente (também mediante assinatura do pai ou da mãe no segundo TCLE (Anexo 2). Por se tratar de uma mutação que está intimamente relacionada com a evolução do TCA em crianças, optou-se pela população de RNs, aliando-se a finalidade de diagnóstico precoce do TCA para os RNs com teste positivo para mutação (o número de RNs vivos no estado do Paraná é de aproximadamente 180 mil por ano). O teste também é oferecido aos familiares do RN portador da mutação R337H, somente para o lado da família que segrega esta mutação germinativa.

A amostra utilizada para o teste da mutação é o sangue periférico coletado do pé dos recém-nascidos simultaneamente ao sangue coletado para o teste do pezinho da Fundação Ecumênica de Proteção ao Excepcional (FEPE). O sangue é armazenado em membrana especial (MGM ou FTA), mantida em temperatura ambiente e encaminhada para o CEGEMPAC (Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças) ou Instituto Pelé Pequeno Príncipe (IPPP) em Curitiba por SEDEX.

4.2 IMPLANTAÇÃO DO PROJETO

A partir de 05/dez/2005 iniciou-se na região metropolitana de Curitiba a divulgação do projeto para a realização do Teste de DNA (*TP53* R337H) para o diagnóstico precoce do TCA em crianças no estado do Paraná. A divulgação iniciou-se com entrevista coletiva de imprensa em Curitiba, onde foi apresentada a importância do projeto, sua contribuição social e a necessidade da participação de todas as maternidades e hospitais do Paraná, tanto públicas como privadas.

Na seqüência, alunos e profissionais envolvidos iniciaram a implantação do projeto nas maternidades e hospitais da mesma região após reuniões realizadas em cada Instituição, com abordagem do projeto para a Direção Clínica, equipe de pediatras e equipe de enfermagem de cada local, visando o treinamento destes indivíduos para esclarecimentos necessários junto aos pais dos RNs e procedimento adequado de coleta do material de análise.

Após a implantação deste projeto de pesquisa nas maternidades e hospitais da Regional Curitiba e Região Metropolitana, seguiu-se um período de realização de análises de DNA sem a implantação em novas regionais, visando o estabelecimento de protocolos para a conferência de várias etapas do processo, tais como:

- envio de material de coleta para as maternidades e hospitais, com o conhecimento do número de RNs / mês em cada Instituição (fornecido pela Secretaria Estadual de Saúde);
- esclarecimento de eventuais dúvidas por parte das equipes de enfermagem no processo de coleta de material;

- mecanismo de envio das amostras coletadas para o CEGEMPAC e IPPP via correio;

- cumprimento dos prazos agendados para o envio de amostras coletadas em cada maternidade e hospital já implantado;

- início da realização do teste de DNA em grande escala no CEGEMPAC e IPPP;

- registro dos resultados obtidos;

- envio dos primeiros resultados para as maternidades participantes.

A partir do conhecimento e controle do processo completo para a realização do teste na Regional 02 - Curitiba e Região Metropolitana, utilizada como projeto piloto, iniciou-se um cronograma para a implantação do projeto em outras regionais do Paraná, seguindo-se a seqüência de implantação:

- Regional 01 - Paranaguá

- Regional 19 - Jacarezinho

- Regional 03 - Ponta Grossa

- Regional 13 - Cianorte

- Regional 06 - União da Vitória

- Regional 05 - Guarapuava

- Regional 04 - Irati

- Regional 12 - Umuarama

- Regional 18 - Cornélio Procópio

- Regional 21 - Telêmaco Borba

- Regional 09 - Foz do Iguaçu

- Regional 10 - Cascavel

- Regional 16 - Apucarana

- Regional 22 – Ivaiporã

Até dezembro de 2006 estão programadas as seguintes implantações:

- Regional 14 - Paranaíba

- Regional 15 - Maringá

- Regional 17 - Londrina

Para Janeiro de 2007 estão programadas as últimas implantações:

- Regional 20 - Toledo
- Regional 08 - Francisco Beltrão
- Regional 07 - Pato Branco

A implantação do projeto à distância aconteceu em vários municípios, devido à impossibilidade da presença de um membro do projeto para a reunião de apresentação ou da dificuldade de se reunir grupos de várias maternidades da mesma regional para uma única reunião de apresentação do projeto. Nestes casos, a implantação à distância foi realizada com a seguinte conduta:

- contacto por telefone com a Direção Clínica da Instituição para apresentação do projeto e sua aprovação verbal para a participação;
- envio por SEDEX de material explicativo e material de coleta das amostras, com orientações por escrito sobre o procedimento de coleta e armazenamento do material coletado até a data de envio das amostras para Curitiba;
- novo contato por telefone para esclarecimentos de eventuais dúvidas com a equipe de enfermagem;
- controle individual de cada maternidade / hospital para a data de postagem das amostras já coletadas e envio para Curitiba.

4.3 ENVIO DAS AMOSTRAS DE ANÁLISE PARA CURITIBA

As amostras coletadas dos RNs juntamente com o TCLE autorizando a realização do teste são encaminhadas para Curitiba via SEDEX, em datas pré-programadas para não exceder o peso permitido por embalagem do correio. A postagem é totalmente gratuita para a instituição participante, desde que seja utilizado o envelope padrão que é encaminhado para a maternidade ou hospital juntamente com o material de coleta.

Os envelopes chegam a Curitiba no endereço do CEGEMPAC ou IPPP, onde é realizado o Teste de DNA. Os TCLEs de cada envelope entregues pelo correio são

contados e anotados em planilha para o controle do recebimento das amostras de cada maternidade/hospital.

4.4 TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O TCLE do Teste de DNA para o acompanhamento ambulatorial e detecção do TCA em crianças do Paraná contém informações e esclarecimentos sobre o teste, além de telefones para contato (em Curitiba) com o coordenador geral da pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo. No seu interior, o TCLE apresenta locais de preenchimento com informações de identificação da mãe do RN, como nome completo, CPF, RG, endereço completo, telefone fixo, telefone celular e assinatura da mãe. No verso do TCLE há um questionário que aborda o histórico familiar de câncer e grupos étnicos da família do RN, além do código de barras individual que identifica o TCLE e a respectiva membrana fixada, contendo o sangue coletado do RN para a análise de DNA. Este código de barras é composto por doze dígitos, sendo que os três primeiros dígitos identificam a maternidade e os dígitos restantes identificam o RN. Os 5 TCLEs (Anexos) foram exigidos e aprovados pelo CONEP – Conselho Nacional de Ética em Pesquisa – DF. Serão excluídas deste projeto as crianças:

- 1) sem assinatura de autorização da mãe no TCLE;
- 2) RN natimortos;
- 3) crianças com idade acima de 1 ano, a partir de dezembro/2006.

Para fins de aconselhamento genético, o projeto também oferece o teste de DNA gratuitamente aos familiares do RN com a mutação, necessitando também da assinatura do responsável no TCLE para cada membro da família. Caso não haja o interesse por parte dos familiares, o teste não será realizado e somente o RN será acompanhado pela equipe multidisciplinar do projeto.

4.5 CADASTRO DE INFORMAÇÕES

Um *software* foi especialmente desenvolvido para o registro das informações desta pesquisa. O TCLE distribuído nas maternidades é passado em um leitor de código de barras e os dados de identificação da mãe do RN são digitados, a fim de permitir a localização da família de um RN portador da mutação R337H no *TP53*.

A partir do registro do código de barras e das informações contidas no TCLE, o *software* permite:

- 1) escaneamento do TCLE: registro das informações do questionário no verso do termo;
- 2) planilhas de trabalho: ordenação das amostras para a realização do teste de DNA;
- 3) registro de resultados: digitação dos resultados obtidos no teste de DNA;
- 4) relatórios estatísticos: controle do número de testes já realizados, percentual de resultados normais e/ou com a mutação, distribuídos por hospitais, municípios ou regionais de saúde;
- 5) resultados para as maternidades: formulação de mala direta para as maternidades com os resultados obtidos dos bebês analisados.

4.6 METODOLOGIA ANALÍTICA

4.6.1 Coleta e Armazenagem do Sangue

O sangue é coletado por enfermeiras realizando-se punção em uma das áreas laterais da região plantar do calcanhar (aproveitando o mesmo sangue liberado para o tradicional Teste do Pezinho da FEPE), ou da polpa digital de crianças maiores e adultos.

4.6.2. Preparo da Amostra para o Teste de DNA

Na realização do teste de DNA para a detecção da mutação R337H no *TP53* a quantidade de DNA por indivíduo é aproximadamente igual, ou seja, dois discos de papel com 2 mm de diâmetro cada, contendo o sangue coletado. Os códigos das amostras são organizados em planilhas que são impressas com 96 células, correspondentes aos 96 poços da placa de PCR. Os agrupamentos de amostras são feitos de forma individual (uma amostra/célula) ou em grupos denominadas “*pool*” (3 amostras/célula). Na planilha “*pool*” as amostras são analisadas para uma triagem inicial, totalizando 6 discos de papel por poço na placa de PCR. Na planilha “individual” utilizam-se 2 discos de papel por indivíduo na placa de PCR.

Quando se identifica uma mutação em um *pool*, os três indivíduos são analisados separadamente em planilha individual, a fim de se detectar qual das três amostras apresenta a mutação. Após a finalização da picotagem, a placa de PCR contendo os discos de papel é mantida na sala de Pré-PCR, em temperatura ambiente, para posterior lavagem dos discos.

4.6.3. Lavagem dos Discos de Papel

A lavagem dos discos de papel (membrana MGM ou FTA-Watmann) tem por finalidade a eliminação da hemoglobina presente nas amostras. Para a lavagem dos discos são utilizadas soluções de lavagem (IPP “A” ou IPP “B”) e água ultra pura. O tempo necessário para a lavagem dos discos de papel é de aproximadamente 2 horas. O protocolo para a lavagem dos discos de papel está descrito na Tabela 4.

TABELA 4 - PROTOCOLO PARA LAVAGEM DOS DISCOS DE PAPEL

Reagente	Volume por reação (µL)	Procedimento
Solução de Lavagem IPP “A”	180	2 lavagens de 30 min a 56° C
Solução de Lavagem IPP “B”	180	2 lavagens de 5 min em TA
Água Ultra-pura	210	2 lavagens de 5 min em TA

Após a lavagem, os discos são levados para secagem na estufa a 60° C por 30 minutos e depois podem ser submetidos à PCR para detecção da mutação R337H no *TP53*. Se necessário, os discos podem ser congelados (freezer a -20° C) até o início da PCR.

4.6.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O ensaio para a detecção da mutação R337H no *TP53* é uma PCR que utiliza DNA de leucócitos de sangue periférico. A triagem inicial é realizada em PCR de um *pool* com grupo de 3 amostras testadas simultaneamente. Quando um poço de um *pool* apresentar um resultado sugerindo uma mutação R337H no *TP53*, realiza-se a PCR Individual para determinar qual dos 3 indivíduos testados no pool possui a mutação.

A PCR tem como objetivo gerar um fragmento de 447 pb, correspondendo ao exon 10 do gene *TP53*. Para delimitar esta região são utilizados os “primers” 5´-CTG AGG CAC AAG AAT CAC-3´ (*forward*) e 5´-TCC TAT GGC TTT CCA ACC-3´ (*reverse*).

O DNA é amplificado utilizando-se o protocolo descrito na Tabela 5 para o preparo dos reagentes para PCR.

TABELA 5 - PREPARO DOS REAGENTES PARA PCR

Reagente	Volume por Reação (µL)	PCR - Individual 100 reações (µL)	PCR – POOL 300 reações (µL)
Água ultra pura	18,8	1880	5640
Tampão PCR 10x	2,5	250	750
Mistura dNTP 25 mM	0,2	20	60
MgCl ₂ 50 Mm	0,75	75	225
“Primer” R 40 pmol	1,25	125	375
“Primer” F 40 pmol	1,25	125	375
Taq DNA polimerase (5U/µL)	0,25 1,25 U	25 125 U	75 375 U
Volume Total	25 µL	2500 µL	7500 µL

Os reagentes utilizados no preparo da mistura para PCR têm a seguinte composição:

Tampão PCR 10x

- Tris-HCl (pH 8,4) 200 mM
- KCl..... 500 mM

Mistura de dNTPs a 25 mM

- dATP 100 mM..... 250 µL
- dCTP 100 mM 250 µL
- dGTP..... 100 mM 250 µL
- dTTP..... 100 mM 250 µL

A concentração final dos nucleotídeos é de 25 mM em 1000 µL da mistura.

A amplificação do DNA genômico por PCR é realizada em termociclador (Amplifon® II – Thermolyne), com uma programação padrão de PCR, conforme descrito na Tabela 6, com duração de aproximadamente 2 horas.

TABELA 6 - PROTOCOLO DE AMPLIFICAÇÃO

Etapas do ciclo	Temperatura	Tempo
Desnaturação das amostras	95° C	4 min
30 ciclos compreendendo:		
- desnaturação	95 ° C	45 s
- anelamento dos iniciadores	62 ° C	45 s
- extensão	72 ° C	45 s
Extensão final	72 ° C	10 min
Finalização	4 °C	

Para cada placa de PCR são utilizados três controles em localizações pré-definidas, conforme estabelecido na Tabela 7:

- coluna 1, posição A ⇒ controle negativo (NEG), sem DNA;
- coluna 1, posição B ⇒ controle normal (NOR), contendo 6 discos de sangue sem a mutação (PCR de *pool*) ou uma amostra de sangue com apenas 2 discos (PCR individual);

- coluna 1, posição C ⇒ controle de portador da mutação (MUT), contendo 4 discos de sangue sem a mutação + 2 discos de um indivíduo que tem a mutação (PCR de *pool*), ou dois discos de sangue de quem tem a mutação em PCR individual.

TABELA 7 - COMPOSIÇÃO DOS CONTROLES NA PCR

Composição dos controles	PCR – Pool	PCR - Individual
Controle Negativo	3 µL de água ultra pura	1 µL de água ultra pura
Controle Normal	6 discos de papel de indivíduo sem a mutação	2 discos de papel de indivíduo sem a mutação
Controle de Mutação	2 discos de papel de indivíduo com a mutação + 4 discos de papel de indivíduo sem a mutação	2 discos de papel de indivíduo com a mutação

A placa é colocada no termociclador contendo um filme protetor para evitar evaporação da mistura de reação. A qualidade do material amplificado é averiguada mediante eletroforese em gel de agarose.

4.6.5. Digestão do Produto Amplificado na PCR

Para o ensaio de RFLP, o produto amplificado é digerido com enzima de restrição *Hha I* que é capaz de clivar o fragmento de 447 pb do *TP53* selvagem, gerando fragmentos de 154 pb e 293 pb, porém a enzima *Hha I* não é capaz de clivar o fragmento R337H com a mutação. Cada UI (unidade internacional) de *Hha I* corta completamente 1 µg de DNA.

A mistura dos reagentes para o ensaio de restrição é preparada conforme a PCR realizada. Para a restrição enzimática em material amplificado de PCR – Pool, a mistura de reação padronizada utiliza 2U da enzima *Hha I*. Para a restrição enzimática em material amplificado de PCR – Individual, a mistura de reação padronizada utiliza 4U da enzima *Hha I* (Tabela 8). O excesso de *Hha I* utilizado na restrição de material amplificado individualmente é uma garantia para evitar resultados falsos-positivos em testes de confirmação de mutação. O aparecimento da banda de 447 pb poderia

acontecer em uma situação de volume insuficiente da enzima *Hha I* agindo sobre o material amplificado.

TABELA 8 - PREPARO DOS REAGENTES PARA O ENSAIO DE RESTRIÇÃO

Reagente	PCR - Pool	PCR - Individual
Solução 1	1,7 µL	1,7 µL
Enzima <i>Hha I</i> (10U/ µL)	0,2 µL (2 U)	0,4 µL (4 U)
Volume final por reação	1,9 µL	2,1 µL

A solução 1 utilizada no preparo dos reagentes para o ensaio de restrição tem a seguinte composição:

Solução 1

- Tris-HCl (pH 8,0) 500 mM
- MgCl₂..... 100 mM
- NaCl..... 500 mM

Diluir 1 parte em 10 com água ultra-pura.

O produto amplificado obtido na PCR é homogeneizado utilizando-se pipeta eletrônica multicanal. Do volume final de amplificação, retira-se 20 µL e adiciona-se a uma nova placa de PCR contendo a mistura de reação para a restrição enzimática já distribuída nas posições da placa. A placa é tampada com um filme protetor e é colocada em termociclador por 60 min a 37^o C. Passado este período, o material é submetido a uma eletroforese para visualização das bandas.

4.6.6. Eletroforese

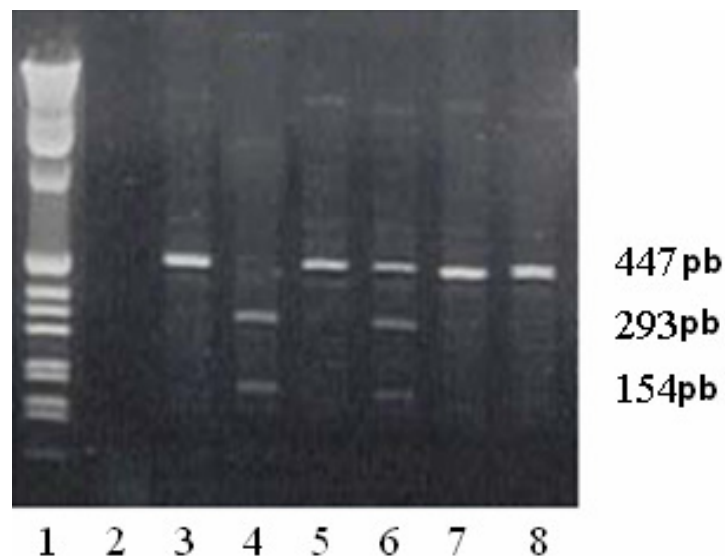
O produto da restrição enzimática é separado por eletroforese em gel de agarose a 1,8%, 200V, por uma hora.

- Solução de TBE 0,5X..... 350 mL
- Agarose 6,3 g

Para preparar o gel de agarose, aquece-se a mistura por 5 minutos para promover a polimerização da agarose. Aguardar o resfriamento por aproximadamente 20 minutos. Adicionar 30 μL de brometo de etídio (solução aquosa a 1%) e levar para uma cuba de eletroforese para solidificação.

Adiciona-se 5 μL de solução corante Loading Buffer (azul de bromofenol) aos 20 μL de produto digerido e em seguida aplica-se 20 μL da mistura final no gel de agarose, seguindo-se corrida eletroforética a 200 V por 60 minutos. Em seguida, o gel é colocado em transiluminador com UV e as imagens são fotografadas em sistema de fotodocumentação (Figura 8).

FIGURA 8 – RESULTADO DE PCR EM SANGUE PERIFÉRICO E TUMOR



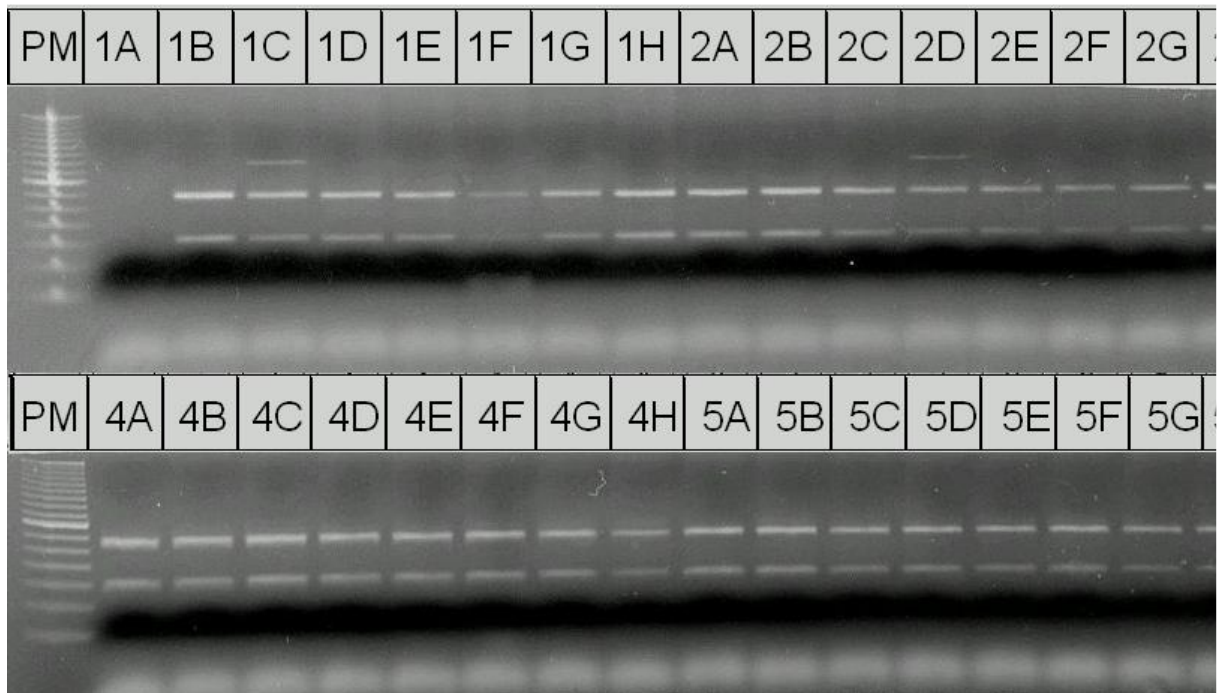
FONTE- FIGUEIREDO *et al.*, 2006B

A figura 8 mostra na coluna 1 o marcador de peso molecular com concentração 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com 1000 bases; na coluna 2 o controle negativo (NEG) do teste, sem DNA; na coluna 3 está o controle de amplificação de uma amostra normal (controle NOR - sem a mutação) com o fragmento de 447 pb obtido na PCR e na coluna 4 está o resultado do controle NOR, que após a restrição enzimática com a *Hha I* gerou as duas bandas com 154 e 293 pb; na coluna 5 está o controle de amplificação de uma amostra

com a mutação (controle MUT), com o fragmento de 447 pb obtido na PCR e na coluna 6 está o resultado da restrição enzimática desta amostra com a mutação R337H no *TP53* gerando as três bandas com 154, 293 e 447 pb. Os resultados revelam que indivíduos sem a mutação apresentam 2 bandas na eletroforese, enquanto o indivíduo heterozigoto, com mutação R337H, apresenta 3 bandas na eletroforese. Na coluna 7 está o controle de amplificação de uma amostra obtida diretamente de um tumor de córtex adrenal submetida à PCR e na coluna 8 está o respectivo resultado da restrição enzimática desta amostra [no tumor acontece a LOH - perda da heterozigose - desaparecendo o alelo normal do *TP53* selvagem e permanecendo somente o alelo com a mutação R337H; a *Hha I* corta o gene *TP53* normal em duas bandas, porém na LOH, o alelo mutante permanece sem corte gerando uma banda única com 447 pares de bases, correspondendo ao alelo R337H presente no tumor.]

A Figura 9 ilustra uma parte do gel de eletroforese fotografado referente a uma leitura de PCR-Pool, com os seguintes resultados:

FIGURA 9 - RESULTADO PCR –POOL

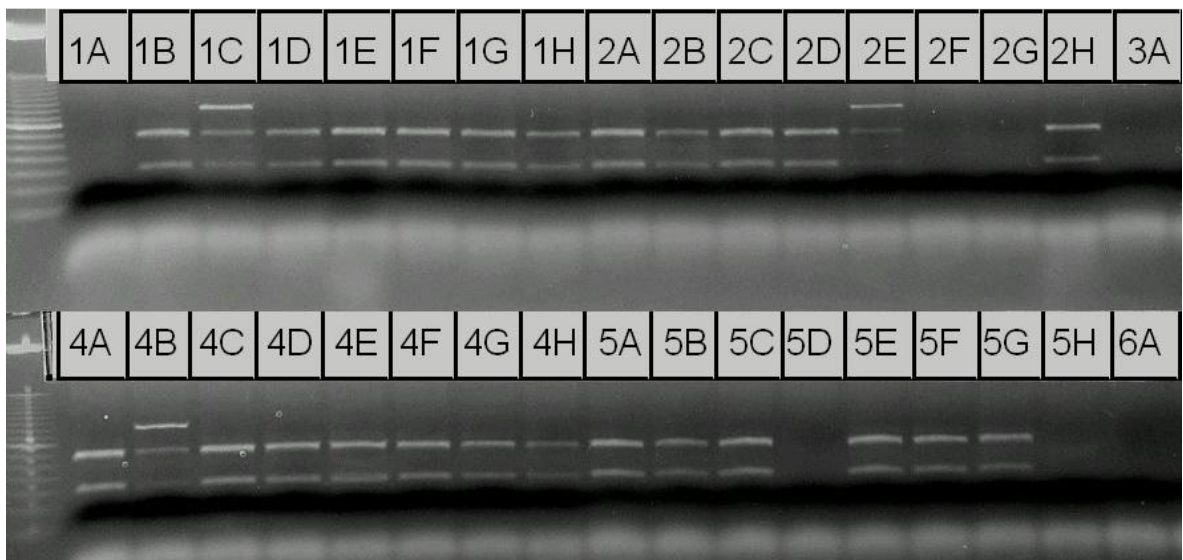


NOTA - Coluna 1, posição A = controle negativo
 Coluna 1, posição B = controle normal
 Coluna 1, posição C = controle com mutação

Coluna 2, posição D = resultado com mutação
 Outras colunas e posições = resultado normal

A Figura 10 ilustra uma PCR-Individual para confirmação de resultados de mutações, onde são utilizados 2 discos de papel para a análise individual de cada amostra.

FIGURA 10 – RESULTADO PCR-INDIVIDUAL



NOTA - Coluna 1, posição A = controle negativo
 Coluna 1, posição B = controle normal
 Coluna 1, posição C = controle com mutação

Coluna 2, posição E } Mutações
 Coluna 4, posição B } confirmadas

4.6.7. Critérios para Repetição dos Testes

Os testes são repetidos em situações onde a interpretação dos resultados pela visualização das bandas na eletroforese torna-se duvidosa. Algumas das situações que exigem a repetição do teste são discutidas a seguir.

4.6.7.1 Ausência das bandas esperadas na visualização do gel de eletroforese

As causas mais comuns são:

- defeito em algumas placas de PCR que apresentaram poços furados, ocasionando o vazamento da mistura de PCR e impedindo a amplificação das amostras;
- problemas na lavagem dos discos de papel, com a presença de resíduos de hemoglobina nos discos de papel inibindo a PCR;
- falta de amplificação na PCR devido a interferências nas amostras.

4.6.7.2 Bandas com fluorescência mais fraca em comparação à fluorescência predominante no gel de eletroforese

Avaliando-se a intensidade de fluorescência predominante no gel de eletroforese, as bandas com menor intensidade de fluorescência são interpretadas como amplificação fraca e as amostras correspondentes são separadas para a repetição do teste.

4.6.7.3 Presença de outras bandas com pesos moleculares diferentes dos previstos

Na avaliação do gel de eletroforese após a restrição enzimática, a presença de bandas com pesos moleculares diferentes de 447 pb, 293 pb ou 154 pb tornam confusa a interpretação dos resultados; neste caso, as amostras correspondentes são separadas para a repetição do teste.

4.6.7.4 Confirmação de mutação detectada em PCR-pool

As amostras com a presença de mutação observada pelo padrão típico de três bandas na eletroforese após restrição enzimática são reavaliadas em PCR-individual e por último confirmadas com segunda coleta de sangue da criança e também de seus pais.

Considerando-se estes aspectos abordados, o percentual médio de repetições foi de 10% .

4.6.8 Liberação dos Resultados

Com poucas exceções, o tempo médio para divulgação dos resultados foi de 2 meses. Entretanto, devido a problemas relacionados entre a coleta e armazenagem da amostra até o ensaio com alteração na qualidade ou entrega dos reagentes (revisados no item 2.8), houve atrasos na divulgação para maternidade de até 4 meses. Este problema obrigou a equipe a desenvolver uma nova solução (solução “IPP”) mais eficiente para lavar e retirar os contaminantes que interferem com a PCR dos discos de papel com sangue do RN. A divulgação dos casos com mutação R337H, sempre feita diretamente para mãe do RN, tem sido realizada de maneira mais rápida do que a divulgação para a maternidade devido à urgência em se recrutar o RN para nova coleta de sangue juntamente com os pais para realização do exame de DNA.

4.6.9 Análise Estatística

4.6.9.1 Estimativa do tamanho da amostra

Considerando que a população total do Paraná é de aproximadamente 10 milhões de habitantes e por se tratar de um gene raro (*TP53* R337H), o tamanho da amostra (“n”) para o cálculo da prevalência deverá ser aquele com o menor risco de erro possível. A expressão matemática para o cálculo do tamanho da amostra (“n”) é a

correspondente à estimativa de uma proporção populacional, ou seja, $n = \frac{z^2 p_o q_o}{(p - p_o)^2}$.

Usa-se como estimativa das proporções populacionais a prevalência obtida $p_o=0,00207$ e $q_o=0,99793$, seu complemento (a soma deve ser igual a 1). A estatística “z”, para um nível de confiança de 95% é igual a 1,96 (DANIEL,1995). Na simulação de dois erros aceitáveis (0,5/1000 ou 1/1000), para obtenção de “n”, fixa-se o erro, ou seja, “ $p - p_o$ ”. Para um erro de 0,5/1000, $p - p_o = 0,0005$ e $n = 31.743$. Para um erro de 1/1000, $p - p_o = 0,001$ e $n = 7.936$.

4.6.9.2 Cálculo da diferença estatística da prevalência entre os grupos

O método estatístico utilizado para a avaliação da distribuição de *TP53* R337H nos municípios do Estado será o teste de proporções para as diferenças de prevalência entre os diversos municípios. Serão analisados todos os municípios do Paraná onde exista pelo menos 1 RN com a mutação R337H no *TP53*. Para cada município será calculada a prevalência do alelo *TP53* R337H em cada 1000 RNs.

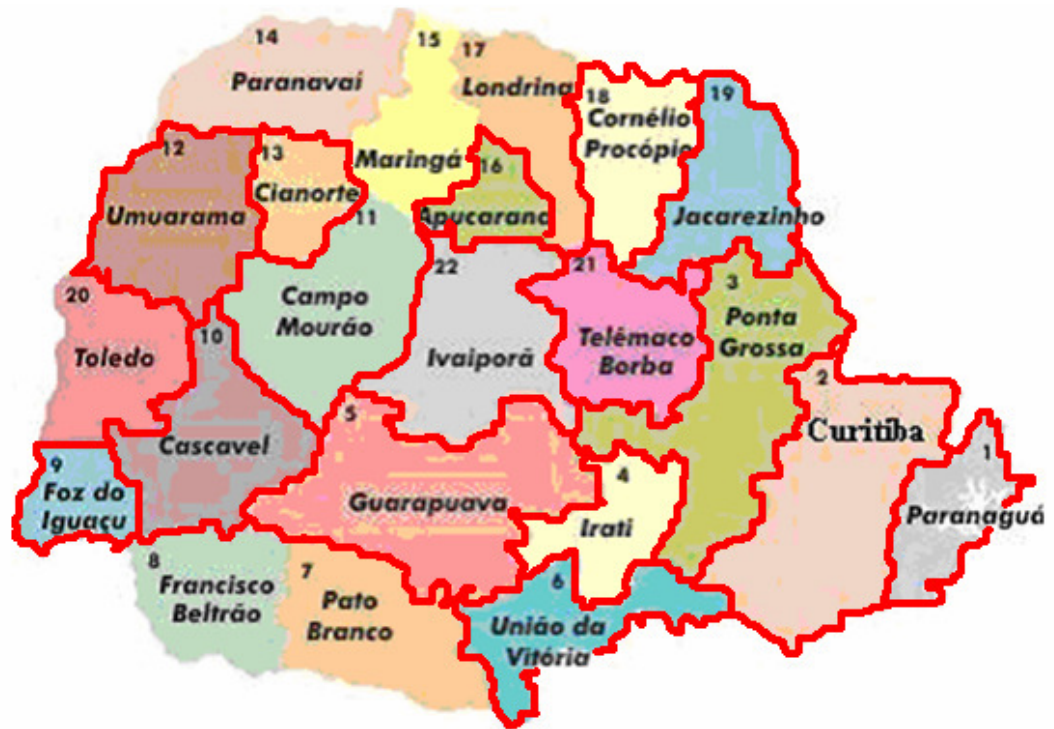
O percentual de distribuição do alelo *TP53* R337H nos diferentes grupos raciais e étnicos do Estado será avaliado para cada família com 1 RN que apresentar a mutação. As características relativas ao grupo racial e a etnia serão apresentadas para ambas as famílias, da mãe e do pai do RN, porém procurando especificamente o lado que segrega a mutação. As informações sobre etnia das famílias são obtidas através da análise do questionário no verso do TCLE e principalmente nas entrevistas. O questionamento realizado aborda a cor da pele e a ascendência familiar do pai e da mãe do RN.

5 RESULTADOS

5.1 PREVALÊNCIA DE *TP53* R337H NO ESTADO DO PARANÁ

De dezembro de 2005 a novembro de 2006 foram enviadas ao CEGEMPAC e IPPP aproximadamente 40 mil amostras de RNs para análise, totalizando 65% dos RNs vivos/mês do estado do PR (Figura 11).

FIGURA 11 - REGIONAIS ONDE A PESQUISA JÁ ESTÁ IMPLANTADA

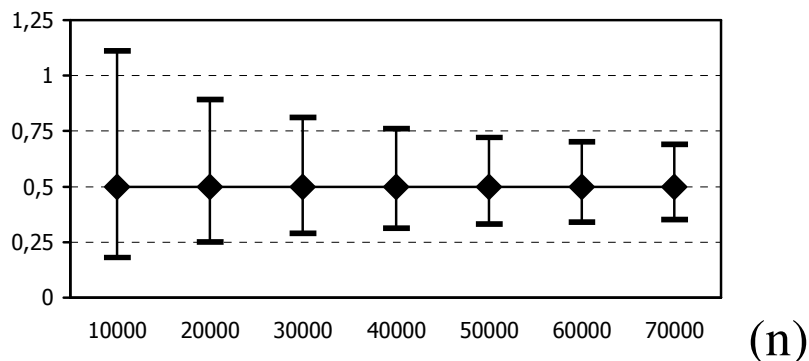


NOTA - As regionais onde a pesquisa já está implantada correspondem às áreas demarcadas em vermelho.

Deste total de 40 mil amostras, já foram analisadas 30.000 amostras e foram detectados 64 RNs portadores da mutação R337H no *TP53* até novembro de 2006. Considerando um intervalo de confiança de 95%, e fixando o tamanho de amostra em $n=30.000$ o erro da estimação ($p - p_o = z\sqrt{\frac{p_o q_o}{n}}$) fica em torno de $p - p_o = 0,000537$,

ou seja, aproximadamente 0,5/1000. Fazendo uma projeção para um tamanho de n até 70 mil amostras não há diferença na precisão, ou seja, o erro não se altera expressivamente (Figura 12).

FIGURA 12 – PROJEÇÃO DO TAMANHO DA AMOSTRA (n)



FONTE – IARC, LYON, FRANÇA

Dos 64 RNs, 22 e seus familiares já estão sendo acompanhados para aconselhamento genético, porém o foco da atenção principal é para os RNs oferecendo exames clínicos, hormonais e de imagens no programa de diagnóstico precoce do TCA. Este programa é também extensivo a outras crianças do lado da família que segrega a mutação, com a finalidade de permitir uma cirurgia com chance de ressecção total do tumor, o que aumenta a probabilidade de cura destas crianças para 100%. O acompanhamento é realizado por equipe multidisciplinar (médicos pediatras, oncologistas, geneticistas, epidemiologistas, psicólogos, assistentes sociais, farmacêuticos, biólogos) e é totalmente gratuito. Os resultados confirmatórios dos outros 42 RNs bem como o teste com amostras dos demais familiares estão em andamento.

5.2 AVALIAÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *TP53* R337H POR MUNICÍPIOS E REGIONAIS DE SAÚDE

O resultado obtido para prevalência da mutação considerando todas as 30.098 amostras das regiões estudadas do Paraná foi de 2,12/1000.

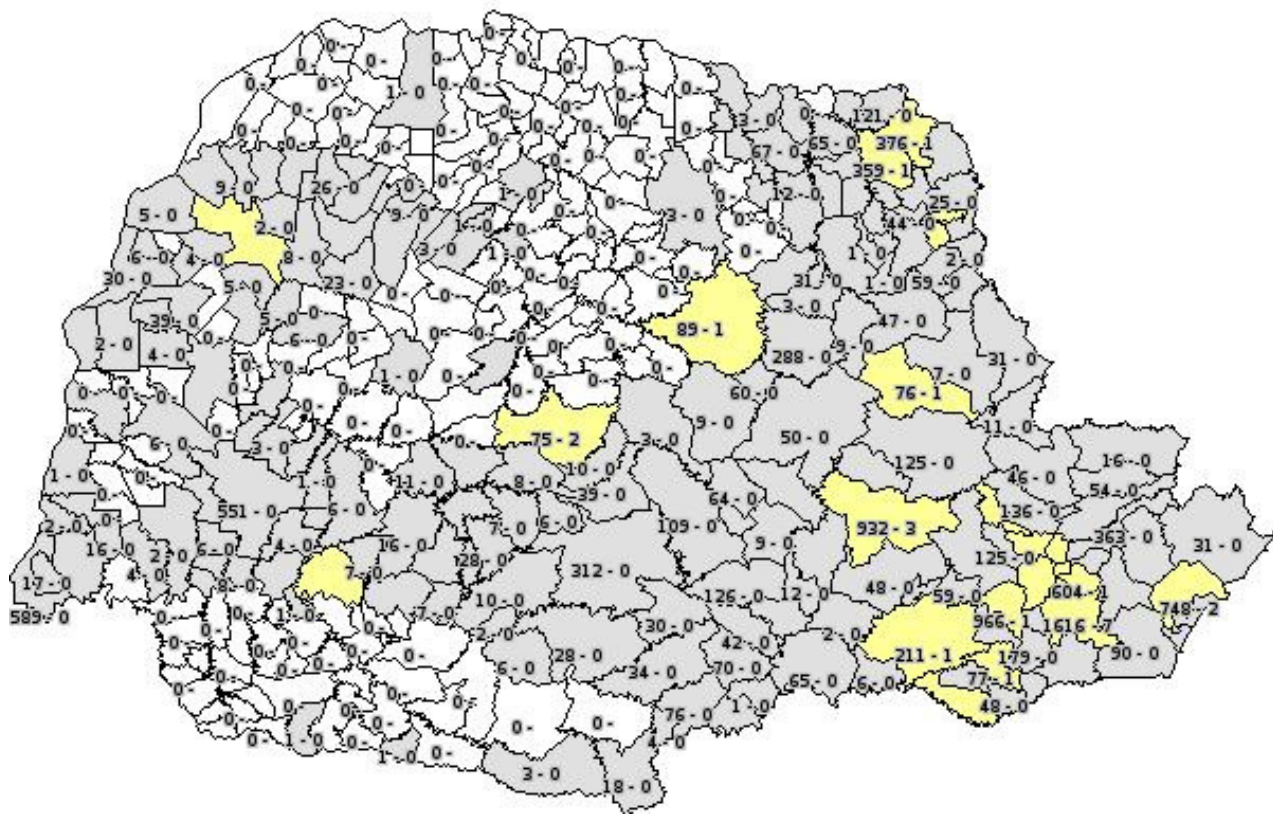
Para a avaliação da distribuição da mutação R337H no *TP53* nos municípios do Paraná foram avaliados todos os municípios onde se detectou pelo menos 1 RN com a mutação no período pré-estabelecido. Conforme a Tabela 9, o cálculo da prevalência da mutação R337H no *TP53* por município apresentou grande variação, o que se pode atribuir à grande diferença no tamanho da amostra analisada em cada município.

TABELA 9 - MUTAÇÃO ENCONTRADA EM RNs DE MUNICÍPIOS DO PARANÁ

MUNICÍPIO	RNs TESTADOS	RNs COM A MUTAÇÃO R337 no <i>TP53</i>	PREVALÊNCIA (/1000)
Almirante Tamandaré	714	2	2,8
Araucária	983	1	1,02
Colombo	1509	4	2,65
Curitiba	11750	25	2,12
Fazenda Rio Grande	547	1	1,83
Itaperuçu	139	2	14,38
Jacarezinho	381	1	2,62
Jaguariaíva	116	1	8,62
Lapa	210	1	4,77
Ortigueira	87	1	11,49
Paranaguá	815	3	3,68
Pinhais	822	2	2,43
Piraí do Sul	76	1	13,16
Piraquara	601	1	1,66
Pitanga	86	2	23,20
Ponta Grossa	982	3	3,05
Quedas do Iguaçu	87	1	11,49
Quitandinha	71	1	14,08
Rio Negro	213	1	4,69
Santo Antônio da Platina	359	1	2,78
São José dos Pinhais	1626	7	4,30
Siqueira Campos	74	1	13,51
Umuarama	142	1	7,04
TOTAL	30.098	64	2,12

Os dados constantes na Tabela 9 foram representados cartograficamente na Figura 13.

FIGURA 13 - MUTAÇÃO ENCONTRADA EM RNs DE MUNICÍPIOS DO PARANÁ



NOTA – As áreas amarelas representam municípios com uma ou mais mutações. As áreas brancas representam municípios onde a pesquisa ainda não está implantada. As áreas cinzas representam municípios sem resultado de mutação, com amostragem ainda pequena.

Considerando a grande variação da prevalência nos municípios do Paraná, foi estimada também a prevalência por Regional de Saúde, conforme demonstrado na Tabela 10.

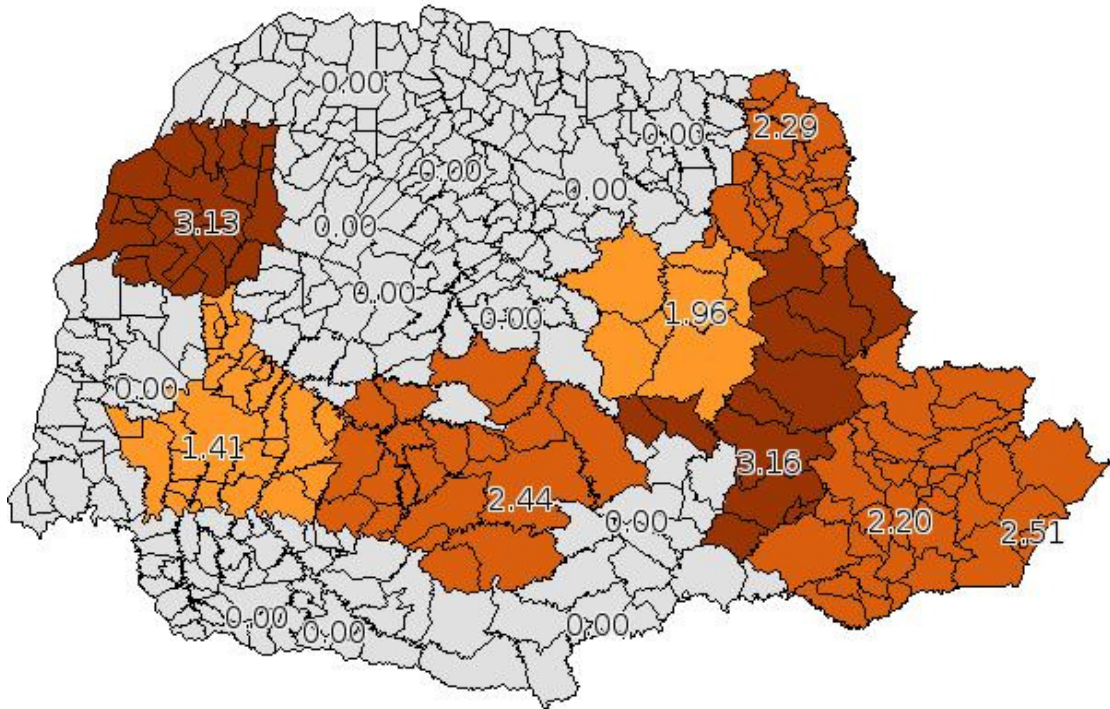
TABELA 10 - DISTRIBUIÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *TP53* R337H POR REGIONAL DE SAÚDE

REGIONAL	RNs TESTADOS	RNs COM A MUTAÇÃO R337H no <i>TP53</i> NA LINHAGEM GERMINATIVA	PREVALÊNCIA (/ 1000)	GRAU DE SIGNIFICÂNCIA*
Campo Mourão	16	zero		
Cascavel	708	1	1,41	P<0,008
Cianorte	317	zero		
Cornélio Procópio	255	zero		
Foz do Iguaçu	687	zero		
Francisco Beltrão	1	zero		
Guarapuava	820	2	2,44	ns
Irati	332	zero		
Ivaiporã	12	zero		
Jacarezinho	1310	3	2,29	ns
Londrina	4	zero		
Maringá	8	zero		
Metropolitana Curitiba	21818	48	2,20	ns
Paranaguá	1193	3	2,51	P<0,05
Paranavaí	1	zero		
Pato Branco	3	zero		
Ponta Grossa	1584	5	3,16	P<0,001
Telêmaco Borba	509	1	1,96	ns
Toledo	30	zero		
Umuarama	320	1	3,13	P<0,001 (amostra pequena)
União da Vitória	170	zero		
TOTAL	30098	64	2,12	

NOTA - *Grau de significância em relação à média do estado (n=30098 ou n=27486 sem considerar as regionais dentro da média) até um limite de p<0,05. ns = não significativo.

As informações da Tabela 10 foram representadas cartograficamente na Figura 14.

FIGURA 14 - DISTRIBUIÇÃO DA PREVALÊNCIA DE *TP53* R337H POR REGIONAL DE SAÚDE



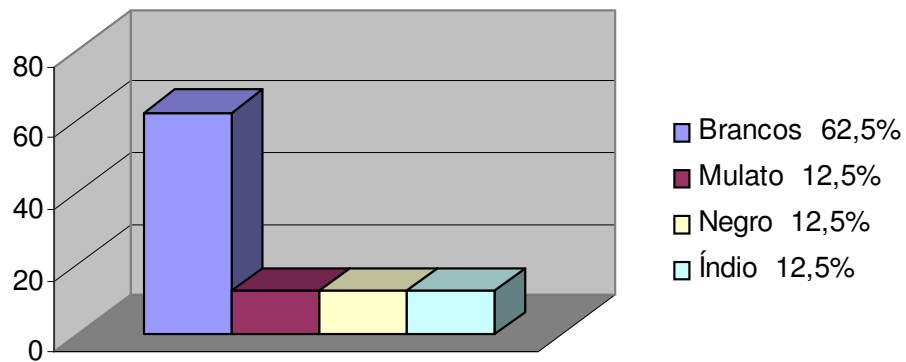
NOTA – As áreas nas tonalidades marrom representam prevalências em regionais de saúde, variando de 1,41 a 1,96/1000 (marrom claro), 2,2 a 2,51/1000 (marrom intermediário) e 3,13 a 3,16/1000 (marrom escuro). As áreas cinzas representam municípios sem resultado de mutação.

5.3 AVALIAÇÃO DO PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO *TP53* R337H NOS DIFERENTES GRUPOS RACIAIS E ÉTNICOS DO PARANÁ

Das 34 famílias em acompanhamento, 17 famílias se submeteram ao teste de DNA para se determinar a herança do alelo *TP53* R337H: dos 27 RNs com a mutação, 14 (51,8%) são do sexo masculino e 13 (48,2%) são do sexo feminino. Destes, em 64,7% (11/17) a herança foi herdada do pai e 35,3% (06/17) a herança foi herdada da

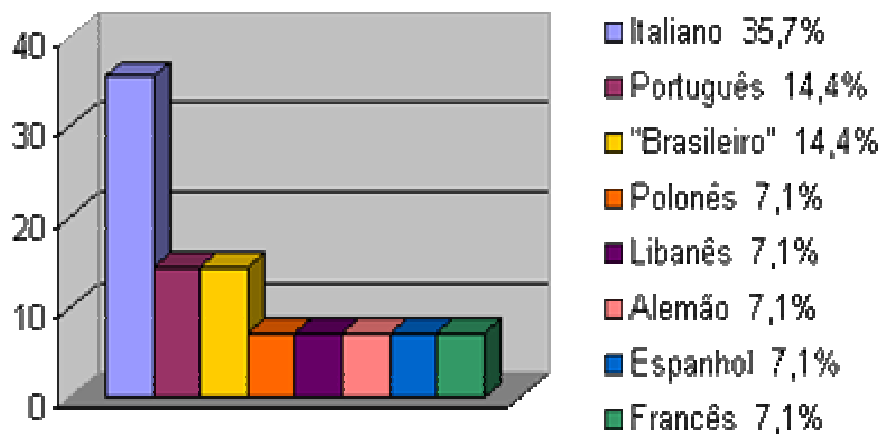
mãe. Este dado com maior número de RNs recebendo a mutação dos pai do que da mãe nos remete a pensar sobre algum fator facilitador como o fenômeno de *imprinting*. Este estudo já se encontra em andamento, mas ainda é inconclusivo.

GRÁFICO 1 - PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO *TP53* R337H NO LADO DA FAMÍLIA QUE SEGREGA A MUTAÇÃO POR COR DE PELE NO PARANÁ (n=17)



Considerando somente o lado da família que segrega a mutação, o percentual de distribuição dos grupos étnicos é:

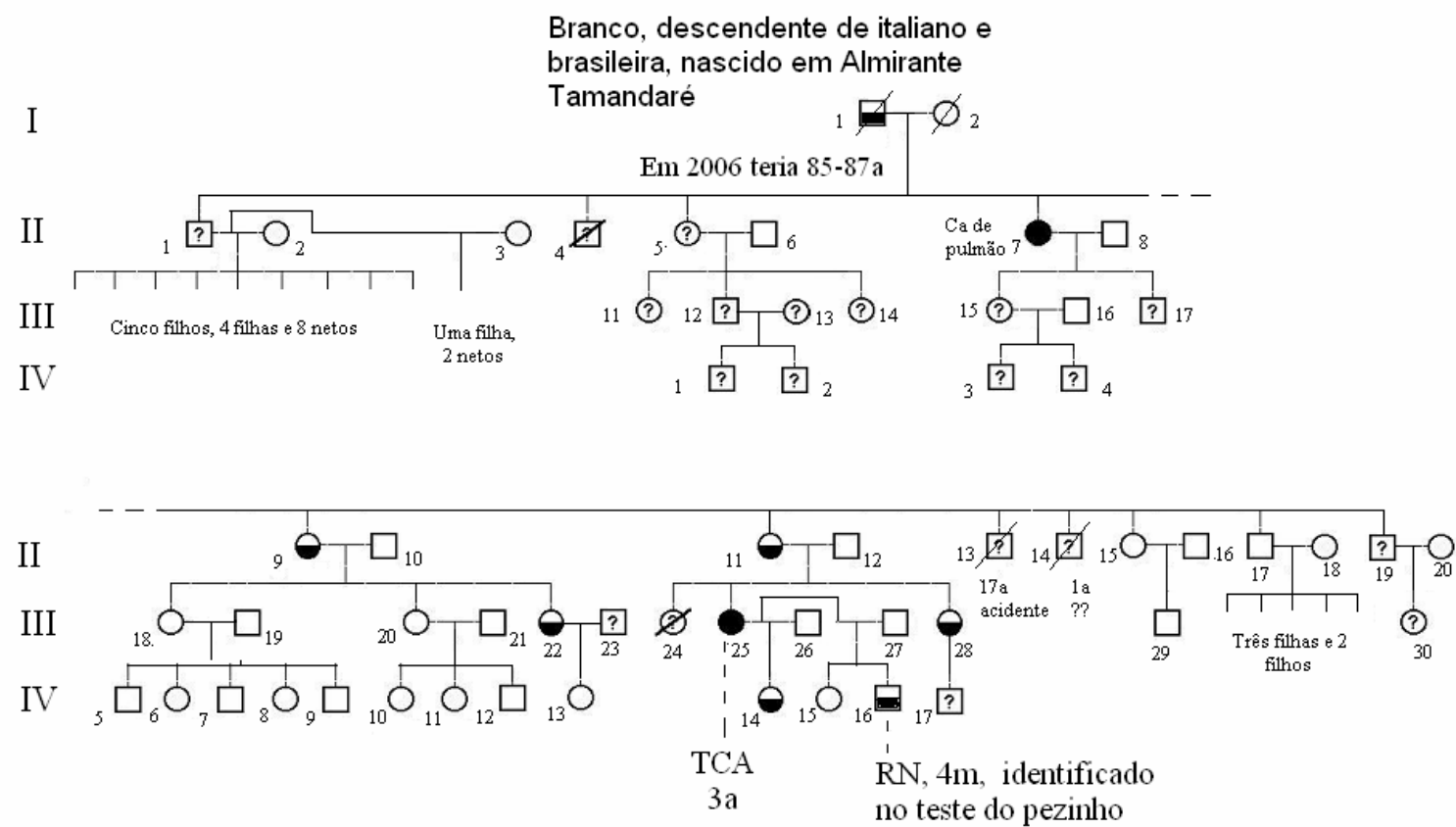
GRÁFICO 2 - PERCENTUAL DE DISTRIBUIÇÃO DO ALELO *TP53* R337H NO LADO DA FAMÍLIA QUE SEGREGA A MUTAÇÃO POR GRUPO ÉTNICO NO PARANÁ



A opção “Brasileiro” não é uma opção válida do questionário do TCLE, mas como foi citada por vários indivíduos acabou sendo incorporada ao cálculo de percentual de distribuição do alelo *TP53* R337H. No entanto, não é possível definir Brasileiro como um grupo étnico devido ao alto grau de miscigenação nesta população.

5.3.1 Perfil de uma Família com Antecedente de Câncer

A avaliação de cada família é feita a partir do heredograma, procurando identificar os parentes com a mutação, os parentes com câncer e os menores de 15 anos para fins de acompanhamento e de aconselhamento genético. Um aspecto importante do projeto geral é saber se cada caso de câncer tem ou não relação com a mutação R337H no *TP53*. No heredograma (Figura 15), o indivíduo III.25 teve TCA aos 3 anos e o tumor apresentou perda de heterozigose (perda somática do alelo normal, ficando apenas o alelo *TP53* R337H. Já o indivíduo II.7 com câncer de pulmão não se sabe se é portador da mutação R337H, mas o fato de ter sido fumante crônico sugere uma relação mais forte com o tabagismo e não com a mutação R337H no *TP53*. De qualquer forma é importante verificar alguma contribuição do alelo *TP53* R337H.

FIGURA 15 - HEREDOGRAMA ILUSTRATIVO DE UMA FAMÍLIA PORTADORA DE *TP53* R337H

6 DISCUSSÃO

O presente estudo de rastreamento da mutação R337H no *TP53* foi implantado em 156 maternidades de 235 municípios, abrangendo instituições onde mensalmente nascem aproximadamente 65% do total de crianças do estado do Paraná. Este percentual estudado corresponde às regiões com o maior número de nascidos-vivos do Paraná (Figura 7). A implantação do teste começou em dezembro de 2005 e o recrutamento das maternidades tem acontecido de forma escalonada, incorporando aproximadamente 10% de novas maternidades a cada 2-3 meses. Desta maneira foi possível até novembro de 2006 examinar o DNA de 30.098 recém-nascidos (RNs) e calcular a prevalência da mutação nesta parte do estado e por regional de saúde. Os resultados ainda não permitem análise comparativa de prevalência em todos os municípios estudados, mas já demonstram como será a prevalência para todo o estado (aproximadamente 2,12/1000), na regional metropolitana de Curitiba (2,2/1000, n=21.818), e regionais de Jacarezinho, Guarapuava e Paranaguá (prevalência entre 2,29 e 2,51/1000).

Foi a primeira iniciativa ao nível mundial para screening de DNA de RNs voltado para o mapeamento no Paraná (baseado no município de residência dos RNs) e com meta voltada para o diagnóstico precoce de câncer. Um dos motivos do diagnóstico tardio do câncer é o desconhecimento de marcadores de risco para maioria dos tipos de câncer, e neste caso, o alelo *TP53* R337H é apresentado como um marcador pré-cancerígeno. Enquanto na população geral o risco de TCA é de 0,2-0,4/milhão de crianças até 15 anos de idade (DESANDES *et al.*, 2004; BERNSTEIN & GURNEY, 1999), na população de crianças com este alelo mutado o risco estimado foi de aproximadamente 0,5-1,0/10 crianças até 15 anos de idade (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B). Nos primeiros 30 mil RNs testados foram identificados 64 bebês com a mutação, que já demonstra uma realidade do Paraná, com relação às suas implicações epidemiológicas, sociais, clínicas e moleculares. Este estudo foi previamente e criteriosamente avaliado com relação ao mérito científico, baseando-se em três critérios: (1) a incidência de TCA em crianças até 15 anos de idade no Paraná é de 12 a 18 vezes maior (PIANOVSKI *et al.*, 2006) do que na França (DESANDES *et al.*, 2004) ou nos Estados Unidos (BERNSTEIN & GURNEY, 1999), sendo que no nordeste do Brasil este tumor é muito raro; (2) quase 100% dos casos

de TCA de crianças do Paraná apresentaram a mutação germinativa R337H no *TP53*; as exceções de TCA sem a mutação eram de crianças procedentes de outros estados ou com mais de 10 anos de idade (sugerindo ser um subtipo mais semelhante ao de adulto) (RIBEIRO *et al.*, 2001); (3) no maior estudo já realizado sobre a evolução da criança com TCA (n=254) (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), aproximadamente 50% delas foram a óbito, apesar de terem sido utilizados sofisticados protocolos terapêuticos (ZANCANELLA *et al.*, 2006); isto ainda acontece devido ao diagnóstico tardio do TCA, pois as crianças com tumor pesando menos de 35g conseguem sobreviver (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

O TCA é relativamente fácil de se diagnosticar, devido às manifestações clínicas bastante evidentes (pelos pubianos, comedões e acne na face, aumento do tamanho do clitóris ou pênis, hipertensão arterial, com ou sem obesidade e outros sinais de síndrome de Cushing) (RIBEIRO *et al.*, 2006; RIBEIRO & FIGUEIREDO, 2004), a suspeita de doença é ignorada pelos pais devido ao seu baixo nível de escolaridade. Como consequência, ainda é comum estádios avançados III e IV ao diagnóstico.

O *TP53* é um gene autossômico recessivo que codifica um fator de supressão tumoral, ou seja, somente com a perda somática subsequente do segundo alelo normal poderá haver a perda da proteção antitumoral na célula afetada. Tal situação ocorre para a maioria das mutações no gene *TP53* em famílias com a síndrome de LI-Fraumeni (SLF) (VARLEY *et al.*, 1999), nas quais a grande parte dos indivíduos afetados geralmente morre de câncer antes de completar 80 anos de idade. No caso do alelo *TP53* R337H, que não tem alteração no domínio de ligação ao DNA (comum na maioria dos casos de SLF), codifica uma proteína normal que pode perder sua função de proteção em uma condição patológica adicional para célula que já perdeu o segundo alelo normal. Esta condição é um meio alcalinizado com temperatura febril (uma situação possível durante uma infecção, que é relativamente comum na vida intra-uterina). O pH alcalino e estado febril levam a um distúrbio no grau de protonação da histidina da proteína R337H que ocupa o lugar original da arginina (CAC no lugar de CGC no códon 337), conseqüentemente afetando a ponte de sal com o aminoácido 352, promovendo uma instabilidade na formação de dímeros e tetrâmeros de p53 e, finalmente, perda de função (DIGIAMARINO *et al.*, 2002). O acúmulo de todas estas

alterações não é algo tão fácil de acontecer. Aliando-se as descobertas subseqüentes sobre alterações que poderiam contribuir com a formação do TCA (FIGUEIREDO *et al.*, 2006A) pode-se sugerir a hipótese multifatorial para o surgimento do TCA.

Admite-se que no período entre a vida intra-uterina e imediatamente pós-natal acontecem todas as etapas necessárias à formação do TCA (mutação germinativa, perda somática do alelo normal, alteração do pH e elevação de temperatura com perda de função do p53) e participação de outros fatores alterados, de maneira mais sensível para o córtex adrenal (FIGUEIREDO *et al.*, 2000). Entretanto, existem evidências de outros tipos de tumores que acontecem em outros tecidos devido à falha da proteína p53 R337H (ACHATZ *et al.*, 2006; FIGUEIREDO *et al.*, 2006B). A atenção primária sempre foi dada aos tumores da população pediátrica e também aos familiares de crianças com TCA (estudos do nosso grupo de pesquisadores), criando-se um viés de informação, ou seja, sem acesso ao que acontece na população adulta sem TCA. Por outro lado, para o grupo que estudava apenas SLF e SLF-símile, geralmente avaliando mais adultos e poucas crianças, notava-se alguns adultos com tumores que tinham a mutação R337H no *TP53*, porém não se enquadrando exatamente como SLF-símile (ACHATZ *et al.*, 2006). Estas situações mantiveram sem esclarecimento a questão se a grande maioria de casos isolados de câncer em famílias tem alguma relação com a mutação R337H. A solução para esta dúvida era justamente um estudo de base populacional para detectar um RN com a mutação e a partir dele investigar toda família do lado materno ou paterno que segrega a mutação, como mostrado no heredograma da Figura 15. Assim, além dos objetivos desse projeto de dissertação de mestrado, no projeto global ao qual se insere este projeto se incluem também a determinação da penetrância e o diagnóstico precoce do TCA de crianças, avaliando-se também outras formas de câncer nos familiares de todas as idades (projetos de outros pesquisadores do mesmo grupo em andamento).

A estimativa inicial para a prevalência da mutação R337H no *TP53* (1:1500 RNs vivos) no Paraná foi baseada numa observação limitada a 30 famílias que tiveram 41 crianças com TCA, e aproximadamente 10 vezes o número de carreadores dessa mutação (n=410) (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B). Entretanto, nota-se que a prevalência média encontrada avaliando-se 65% da população do Paraná,

a partir do presente estudo foi 3 vezes superior, ou seja, 2,12/1000 (n=30.098). Pode-se considerar que a prevalência encontrada nesta pesquisa é mais correta por ter sido obtida diretamente na população e com um número de crianças estatisticamente aceitável para o cálculo da prevalência (Figura 12), quando comparada a uma simples projeção feita anteriormente (FIGUEIREDO *et al.*, 2006B). O significado desta elevada prevalência é preocupante porque indica que existe um grande número de pessoas com algum risco de desenvolverem algum tipo de câncer, sendo que este número pode aumentar nas próximas décadas. Como a distribuição da prevalência por município foi prejudicada naqueles com pequeno número de amostras analisadas, foram destacados no mapa os municípios que apresentaram pelo menos uma mutação (região amarela do mapa da Figura 13), em contraste com os municípios sem RN com a mutação (em branco porque ainda não foram incluídos neste projeto ou em cinza porque ainda não alcançaram um número suficientemente grande de amostras analisadas). Entretanto, o número se torna adequado quando se agrupam os dados dos municípios nas 22 regionais de saúde do Paraná. O mapa apresentado na Figura 14 mostra que em 4 regionais de saúde foi possível estimar a prevalência da mutação com um bom número de RNs avaliados. Nota-se que houve uma variação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre as regionais, com prevalência variando entre 1,41 a 3,16 (Tabela 10). As regionais de Guarapuava (2,44/1000, com 820 RNs testados), Jacarezinho (2,29/1000, com 1310 RNs testados), Metropolitana de Curitiba (2,2/1000, com 21.818 RNs testados) e Telêmaco Borba (1,96/1000, com 509 RNs testados), não apresentaram diferença estatisticamente significativa nos valores de prevalência obtidos. As regionais de Ponta Grossa (3,15/1000, com 1584 RNs testados) e Umuarama (3,12/1000, com 320 RNs testados) apresentaram uma tendência para alcance de prevalência acima da média do estado (2,12/1000), assim como a regional Cascavel (1,41/1000 com 708 RNs testados) apresentou prevalência abaixo da média do estado. Apesar da diferença ser estatisticamente significativa, como demonstrado para as regionais de Cascavel, Ponta Grossa e Umuarama, é necessário avaliar se esta diferença se mantém para um número de amostras analisadas bem maior como o da regional Metropolitana de Curitiba.

Não existe uma diferença evidente do ponto de vista racial entre as 4 regionais com as prevalências encontradas. Porém, independente do local de

residência dos RNs, procurou-se verificar quais as características raciais e etnias encontradas para os pais dos RNs que segregam a mutação R337H no *TP53*.

O estado do Paraná tem características muito diferentes do nordeste do Brasil, onde a mutação R337H no *TP53* não foi encontrada em um estudo com dez TCAs de crianças de Pernambuco, Rio Grande do Norte e Bahia (ainda em andamento). Uma das muitas diferenças entre o Paraná e outros estados do nordeste é na predominância racial e etnia da população. O Paraná apresenta uma origem predominantemente branca e européia bem diversificada, enquanto no nordeste predomina uma mistura de descendentes portugueses e africanos. Atualmente o IBGE (1999) reconhece 4 grupos raciais no Paraná, baseado na cor da pele: branco (76,22%), pardo (20,03%), negro (2,42%) e amarelo (1,33%). Consideram-se brancos todos os descendentes de europeus e de outros povos de cor branca. Embora os brancos sejam a maioria da população brasileira, estudos genéticos mostraram alto grau de miscigenação nesses brasileiros, pois muitos possuem alguma ascendência indígena e/ou africana, o que comprova que no Brasil não há grupos étnicos definidos. Além da constituição genética do indivíduo ser diferente no Paraná, nota-se que neste Estado existe a maior atividade agrícola do país, o que sugere um grande consumo de agrotóxicos. Este assunto não estava sendo tratado de maneira sistemática, relacionando morbidade ou mortalidade por câncer com uso de agrotóxico em cada município do estado, mas já existe um projeto dessa natureza em andamento. O conhecimento do grupo étnico predominante dos portadores mais idosos da mutação em cada família seria uma alternativa modesta para se chegar à(s) origem(ns) das etnia(s). Se a mutação fosse de origem ambiental, muito provavelmente surgiria em qualquer grupo racial. Se a mutação fosse um evento de surgimento raro, como se tivesse surgido há 3 ou 4 séculos atrás como efeito fundador, poderia se espalhar para todos os grupos étnicos do Paraná segundo a predominância dos diferentes grupos raciais do estado.

Os pardos compõem 38,5% da população brasileira, somando cerca de 70 milhões de indivíduos e estão espalhados por toda a nação. Os negros compõem 6,2% da população brasileira, somando cerca de 11 milhões de indivíduos. Estão espalhados por todo o território brasileiro, embora a maior concentração esteja no Nordeste. Consideram-se negros todos os descendentes dos povos africanos

trazidos para o Brasil e que têm a pele negra. Consideram-se amarelos todos os descendentes de povos asiáticos. Os amarelos compõem 0,5% da população brasileira, somando cerca de 1 milhão de indivíduos e estão concentrados em dois estados brasileiros: São Paulo e Paraná, embora populações menores estejam espalhadas por todo o território brasileiro. A grande maioria dos amarelos brasileiros são descendentes de japoneses (<http://pt.wikipedia.org/>).

Quase todos os pais com RN positivo para mutação foram parcialmente entrevistados no que diz respeito à cor da pele e descendências, do lado materno, e separadamente do lado paterno (40/62, 64%). Nas famílias contactadas, pelo menos o pai e a mãe do RN com a mutação compareceram aos exames e concordaram em se submeter ao teste para a detecção da mutação (16/62, 26%). Neste último caso, o alvo da pergunta sobre a cor da pele e descendência era voltada para o lado que segregava a mutação (pai ou mãe). Até o presente, pelo menos um dos pais possui a mesma mutação encontrada no RN e portanto nenhum RN apresentou mutação *de novo*. Para os pais e mães que possuem a mutação, a predominância foi maior para cor da pele branca (62,5%), morenos (12,5%), negros (12,5%) e índios (12,5%). Entre o grupo de pele branca, a descendência mais freqüente foi de italianos (35,7%), portugueses (14,4%), brasileiros (14,4%), alemães (7,1%), poloneses (7,1%), espanhóis (7,1%), libaneses (7,1%) e franceses (7,1%). Não houve nenhum pai ou mãe com a mutação relatando qualquer parentesco com raça asiática. Entretanto, este estudo ainda não foi implantado nas regionais com grande número de japoneses (regional de Londrina). A maior dificuldade está na definição racial destes indivíduos e mais ainda na população urbana brasileira, tornando impossível se fazer qualquer associação com grupo racial ou étnico.

Em publicação anterior FIGUEIREDO *et al.* (2006B) demonstraram a existência da mutação R337H no *TP53* há pelo menos 110 anos. Considerando-se que nenhum dos 4 marcadores que reconhecem seqüências de DNA de dentro (2) e fora (2) do gene *p53* conseguiu identificar grau de parentesco ou confirmar um ancestral comum (efeito fundador) em mais de 95% das amostras analisadas (RIBEIRO *et al.*, 2001), pode-se sugerir que a mutação existe há muito mais tempo. Sendo impraticável definir a origem desta mutação e não havendo casos de mutação "*de novo*" para se avaliar algum fator mutagênico de origem ambiental, ainda se torna muito importante a investigação de fatores ambientais influenciando

etapas somáticas em direção à formação do TCA ou outros tumores em quem já possui a mutação germinativa R337H no *TP53*. Por este motivo a pesquisa atual sobre GEOMEDICINA procura investigar a relação química com a morbi-mortalidade por câncer no Paraná.

A maior contribuição do ponto de vista social deste estudo é a notificação e inclusão de crianças no programa de acompanhamento para o diagnóstico precoce e tratamento cirúrgico do TCA. Apesar do impacto psicológico inicial para família, percebe-se que, após os primeiros meses em contato com a equipe multidisciplinar, o comportamento fica muito mais tranquilo e de maior cooperação dos familiares. Como apresentado no heredograma (Figura 15), o rastreamento poderá identificar famílias com casos de tumores relacionados com a mutação R337H. Neste heredograma, ilustramos um caso de TCA (indivíduo III.25 com TCA de pequeno tamanho e que teve cura) e mais um caso de câncer de pulmão em fumante crônico (indivíduo II.7). Além desta família, já identificamos outras apresentando apenas 2-3 casos de câncer de mama e outros tipos de câncer. Embora não seja descartada a possibilidade de câncer em adultos, acredita-se que não se justifica oferecer um acompanhamento de diagnóstico precoce de câncer devido ao alto custo/benefício. Entretanto, a finalidade do heredograma é possibilitar um aconselhamento genético para os familiares adultos, reforçando a necessidade do acompanhamento de rotina principalmente sobre câncer de mama e pulmão nas mulheres e câncer de próstata e pulmão nos homens, os quais correspondem aos primeiros da lista de incidência em quase todas as populações do mundo. Do ponto de vista científico, as duas principais contribuições a partir do recrutamento de um grande número de RNs para acompanhamento são a possibilidade de se estimar corretamente a real penetrância do TCA e de se definir que outros tumores podem surgir (tumores com perda de heterozigose, ou seja, com perda do alelo normal). O conhecimento atual sobre as alterações responsáveis pelo aparecimento do TCA em crianças (revisão apresentada anteriormente) apontam para três alterações: (1) perda de função do *TP53* R337H levando a uma instabilidade cromossômica, (2) expressão elevada de fatores que aumentam proliferação celular como SF-1 (FIGUEIREDO *et al.*, 2005) e IGF-2 (WEST *et al.*, 2006, prelo), e (3) falha no sistema imunológico contra células cancerosas (PARISE *et al.*, em preparação). Percebe-se que já é bastante difícil completar a primeira alteração (mutação somática com perda do alelo normal do

TP53), mas considerando um córtex adrenal em desenvolvimento nos últimos meses da gestação e após o nascimento, com atividade proliferativa seguida de morte celular na zona fetal, a probabilidade de erro levando a novas mutações é aparentemente maior. Uma situação semelhante foi descrita por VARLEY *et al.*, (1999), ou seja, com mutação no códon 152 ou 158, ambas da domínio de ligação ao DNA, que não estavam relacionadas com SLF nem com famílias com histórico de câncer, porém foi encontrado apenas como mutação germinativa em crianças com TCA (22/25). O que estes dados sugerem é que, apesar da baixa penetrância do *TP53* R337H, e das mutações nos códons 152 e 158, existe uma condição de maior sensibilidade do tecido cortical da criança em desenvolvimento levando à formação do TCA com maior frequência do que em outros tecidos.

O que tem sido ponderado neste estudo e nos programas de triagem neonatal foi alertado aos participantes. Situações que podem levar a resultados falso positivos ou falso negativos foram previamente revisadas. Com base nestas eventualidades, o texto dos termos de consentimento já prevê e alerta aos participantes sobre o risco de erros em probabilidade muito pequena, mas não impossível de acontecer. Desta maneira fica muito remota a possibilidade de uma ação judicial por parte de algum participante devido a resultados falso positivos ou falso negativos.

As amostras são coletadas e identificadas pelas equipes das maternidades participantes do projeto. Em qualquer processo analítico várias são as causas que podem gerar resultados falso positivos ou falso negativos, como erros de identificação da amostra coletada, armazenamento e transporte inadequados da amostra coletada ao laboratório de análise, problemas técnicos que possam interferir na metodologia analítica, erros de digitação no resultado a ser divulgado e outros fatores. Qualquer uma destas situações vai comprometer todo o processo analítico e gerar um resultado falso positivo ou falso negativo a ser divulgado para a família do RN.

Em relação a um resultado falso positivo, até o momento não houve nenhuma discrepância nos resultados positivos para a mutação R337H no *TP53* obtidos na primeira amostra (enviada pela maternidade) e na segunda amostra coletada da criança e dos pais por ocasião da consulta para confirmação do resultado positivo para a mutação. Cada resultado positivo para a mutação é testado por pelo menos quatro vezes para então ser divulgado à família, o que minimiza qualquer

interferência técnica neste processo analítico. Um resultado falso negativo é possível de acontecer, com uma probabilidade maior do que para resultado falso positivo e como nos demais tipos de triagem neonatal, é uma situação que pode ser bastante remota quando são adotadas medidas preventivas para se reduzirem os riscos de falhas nos ensaios. Uma grande vantagem do teste neste estudo que utiliza uma quantidade muito pequena de DNA em relação aos demais tipos de testes de triagem neonatal é não depender da integridade de moléculas extremamente sensíveis à degradação devido à mudança de temperatura. Por exemplo, no caso do hormônio TSH no hipotireoidismo congênito, uma demora de algumas horas entre a coleta da amostra e o teste pode gerar um resultado falso negativo. Analisando-se o DNA do indivíduo, este tempo pode ser de vários meses sem haver comprometimento do teste. Um resultado falso-negativo para a mutação em um RN que posteriormente venha a desenvolver o TCA é uma situação de controle mais difícil, pois a grande maioria dos resultados encontrados para os RNs são negativos para a mutação e não são repetidos. Por outro lado, a possibilidade de aparecimento de um TCA em uma criança do Estado do Paraná com resultado falso negativo para mutação R337H no *TP53* é bastante remota, haja vista que mais de 90% dos portadores da mutação não desenvolvem o TCA.

Sendo a prevalência de R337H no Paraná de 2,12/1000 RN em 30.098 testes realizados e extrapolando-se esta prevalência para os 10 milhões de habitantes do Estado, a estimativa do número aproximado de pessoas heterozigóticas para o gene com esta mutação poderia ser obtida a partir da fórmula de Hardy e Weinberg (APUD BEIGUELMAN, 1977) para populações em equilíbrio ($p^2 + 2pq + q^2 = 1$, onde “ p^2 ” é freqüência do alelo dominante (normal) e “ q^2 ” a freqüência do alelo *TP53* R337H, $2pq$ = freqüência de heterozigotos, sendo $p = 1 - q$). Assim, a estimativa aproximada do número de indivíduos heterozigotos no Paraná ($2pq$) é $2 \times 0,9979 \times 0,0021 \times \text{população do Paraná (10.000.000)} = 41.000$ indivíduos. A única maneira de oferecer aconselhamento para estas pessoas seria por meio do teste no RN, o que facilmente nos levaria aos parentes portadores, resultando em cerca de 4 a 24 mutações por família, dependendo do tamanho de cada família (baseado em estimativa anterior, segundo FIGUEIREDO *et al.*, 2006B).

7 CONCLUSÕES

1. Existe uma prevalência muito elevada para a mutação R337H no *TP53* no Paraná, a qual tem uma tendência a ser homogênea e em torno de 2,2 - 2,5/1000. As regionais com prevalência acima da regional metropolitana de Curitiba, ou acima da média para o estado, podem se manter elevadas ou reduzir com o aumento do número de amostras analisadas.
2. Não existe evidência de mutação *de novo* nos recém-nascidos avaliados.
3. A distribuição da prevalência do alelo *TP53* R337H por regional de saúde é homogênea quando comparada à prevalência média obtida para todo o Estado do Paraná.
4. O percentual de distribuição do alelo *TP53* R337H nos grupos étnicos mostrou uma predominância em indivíduos de pele branca, com relativa homogeneidade entre os grupos étnicos mencionados e com ausência do alelo em indivíduos japoneses, chineses ou outra etnia oriental.

8 PERSPECTIVAS

1. Com este mapeamento tornam-se possíveis estudos moleculares e epidemiológicos que irão esclarecer a penetrância para o TCA e outros tipos de câncer. Conhecendo-se os portadores, será possível dar um atendimento sistemático para os RNs e adultos com a mutação, sobretudo no que diz respeito ao tratamento precoce e curativo do TCA.
2. Ainda fica como desdobramento deste projeto a investigação sobre a participação ambiental na origem da mutação (mesmo não existindo mutação *de novo* até o presente) e/ou na formação do TCA e outras formas de câncer.

REFERÊNCIAS

- ACHATZ, M.I.; OLIVIER, M.; CALVEZ, F.L. *et al.* The *TP53* mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett.** 2006. (no prelo) .
- AZUMA, H.; SADA, M.; TSUJI, T. *et al.* Relationship between HLA-DR antigen and HLA-DRB1 alleles and prostate cancer in Japanese men. **Int. Urol. Nephrol.** , v. 31, n. 3, p. 343-9, 1999.
- BARDONI, B.; ZANARIA, E.; GUIOLI, S. *et al.* A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat. Gen.**, v.7, n.4, p.497-501, 1994.
- BEIGUELMAN, B. **Genética médica: dinâmica dos genes nas famílias e nas populações.** São Paulo: EDART, 1977. p.241
- BERNSTEIN, L. & GURNEY, J.G. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: RIES, L.A.G.; SMITH, M.A.; GURNEY, J.G. *et al.* editors. **Cancer and survival among children and adolescents:** United States: SEER program 1975–1995. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 1999. p.139–147.
- BEUSCHLEIN, F.; MUTCH, C.; BAVERS, D. L. *et al.* Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. **Endocrinology**, v.143, n.8, p.3122-3135, 2002.
- BEUSCHLEIN, F.; REINCKE, M.; KARL, M. *et al.* Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. **Cancer. Res.** V.54, n.18, p. 4927-32. 1994.
- BORNSTEIN, S.R.; STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. **Ann. Intern. Med.**, v.130, n.9, p.759-771, 1999.
- BOIX-FERRERO, J.; PELLIN, A.; BLESÁ, R. *et al.* Absence of p53 gene mutations in hepatocarcinomas from a Mediterranean area of Spain. **Virchows Arch.**, v. 434, n. 6, p. 497-501, 1999.
- BOULLE, N.; LOGIE, A.; GICQUEL, C. *et al.* Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.83, p.1713-1720, 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Coordenação Geral de Atenção Especializada. **Manual de Normas Técnicas e Rotinas Operacionais do Programa Nacional de Triagem Neonatal.** Brasília: Ministério da Saúde, 2002.

BUGG, M. F.; RIBEIRO, R. C.; ROBERTSON, P. K. *et al.* 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. **Am. J. Clin. Pathol.**, v.101, n.5, p.625-629, 1994.

BURRIS, T. P.; GUO, W.; LE, T. *et al.* Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX-1 promoter. **Biochem. Biophys. Res. Com.**, v.214, n.2, p.576-581, 1995.

BUSBY, W.F.Jr.; PAGLIALUNGA, S.; NEWBERNE, P.M. *et al.* Transfer RNA methylase activity and capacity during aflatoxin B1-induced hepatocellular carcinogenesis. **Cancer Res.**, v. 36, n. 6, p. 2013-8, 1976.

CALL, K.M.; GLASER, T.; ITO, C.Y. *et al.* 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.

CAROSELLA, E.D. & DAUSSET, J. Progress of HLA-G in cancer. **Semin. Cancer Biol.**, v.13, n. 5, p. 315-6, 2003.

CAVENEY, W.K.; DRYJA, T.P.; PHILLIPS, R.A. *et al.* Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. **Nature**, v.305, n.5937, p.779-784, 1983.

CHISSOE, S.L.; BODENTEICH, A.; WANG, Y. F. *et al.* 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.

COULTER, C.L.; GOLDSMITH, P.C.; MESIANO, S. *et al.* 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.

DANIEL, W.W. **Biostatistics: a foundation for analysis in the Health Sciences.** John Wiley & Sons Ltda. 6^a ed. New York, 1995, p.173

DESANDES, E; CLAVEL, J; BERGER, C. *et al.* Cancer incidence among children in France, 1990-1999. **Pediatric Blood Cancer**, v.43, n.7, p.749-757, 2004.

DEVLIN, J.; ELDER, P.A.; GABRA, H *et al.* High frequency of chromosome 9 deletion in ovarian cancer: evidence for three tumour-suppressor loci. **Br. J. Cancer.** V.73, n.4, p. 420-30, 1996.

DIGIAMARINO, E.L.; LEE, A.S.; CADEWELL, C. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat. Struct. Biol.**, v.9, n.1, p.12-16, 2002.

FIGUEIREDO, B.C.; PIANOVSKI, M.A.D.; CUSTÓDIO, G. TUMORIGÊNESE DO CORTEX ADRENAL. In: LONGUI, C.A. **Endocrinologia para o Pediatra**. São Paulo: Ed. Atheneu, 2006A. p.941-53.

FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G.P. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J. Med. Genet.**, v. 43, n. 1, p. 91-6, 2006B.

FIGUEIREDO, B.C.; CAVALLI, L.R.; PIANOVSKI, M.A. *et al.* Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.90, n.2, p.615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B.C.; RIBEIRO, R.C.; PIANOVSKI, M.A. *et al.* Atualização sobre a biologia, tratamento e prognóstico do tumor de córtex adrenal pediátrico. In: FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L.; PIANOVSKI, M.A. **Tumores de córtex adrenal: fisiologia, clínica, epidemiologia, patologia, genética e tratamento**. 2.ed. São Paulo: Sonopress, 2004. CD room.

FIGUEIREDO, B.C.; RIBEIRO, R.C., ZAMBETTI, G. *et al.* 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.1217-24, 2000.

FIGUEIREDO, B.C.; STRATAKIS, C.A.; SANDRINI, R. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J. Clin. Endoc. Metab.**, v.84, n.3, p.1116-1121, 1999.

FOSTER & WILSON. **Williams Textbook of Endocrinology**. 8th edition, 1992. p.489-619.

GANDOUR, M.J.; GRIZZLE, W.E. A small adrenocortical carcinoma with aggressive behavior. An evaluation of criteria for malignancy. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, v.110, n.11, p.1076-1079, 1986.

GICQUEL, C.; BERTHERAT, J.; LE BOUC, Y. *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.

GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; SCHNEID, H. *et al.* Rearrangement at the 11p15 locus and overexpression of IGF-II gene in sporadic adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.78, n.6, p.1444-1453, 1994.

GODBOUT, R.; DRYJA, T.P.; SQUIRE, J. *et al.* Somatic inactivation of genes on chromosome 13 is a common event in retinoblastoma. **Nature**. V.304, n.5925, p. 451-3. 1983.

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

HABER, D.A.; BUCKLER, A.J.; GLASER, T. *et al.* 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.

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

HAMMER, G.D.; PARKER, K.L.; SCHIMMER, B.P. Minireview:transcriptional regulation of adrenocortical development. **Endocrinology**, v.146, n.3, p.1018-1024, 2004.

HENSKE, E. P.; SHORT, M.P.; JOZWIAK, S. *et al.* Identification of VAV2 on 9q34 and its exclusion as the tuberous sclerosis gene TSC1. **Ann. Hum. Genet.**, v.59, n.1, p.25–37, 1995.

HOWELL, W.M.; CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Gene polymorphisms, inflammatory diseases and cancer. **Proc. Nutr. Soc.**, v. 61, n. 4, p. 447-56, 2002 .

HOYLE, C.; NARVAEZ, V.; ALLDUS, G. *et al.* Dax-1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. **Mol. Endocrinol.**, v.16, n.4, p.747-756, 2002.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estados>. Acesso em:16/11/2006.

ILVESMAKI, V.; KAHRI, A. I.; MIETTINEN, P. J. *et al.* Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.77, 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. **Mol. Cell. Biol.**, v.17, n.3, p.1476-83, 1997.

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

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

JOHNSON, D. W.; QUMSIYEH, M.; BENKHALIFA, M. *et al.* 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.; *et al.* Localization of the retinoid X receptor alpha gene (RXRA) to chromosome 9q34. **Ann. Hum. Genet.**, v.57, p.195-201,1993.

KAMIO, T., SHIGEMATSU, K., SOU, H., *et al.* Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptors in human adrenocortical carcinoma. **Hum. Pathol.** v.21, p.277-282,1999.

KATIYAR, S.; DASH, B.C.; THAKUR, V. *et al.* P53 tumor suppressor gene mutations in hepatocellular carcinoma patients in India. **Cancer**, v. 88, n. 7, p. 1565-73, 2000.

KAWABE, K.; SHIKAYAMA, T.; TSUBOI, H. *et al.* Dax-1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. **Mol. Endocrinol.**, v.13, n. 8, p.1267-1284, 1999.

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.

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

KIRK, G.D.; CAMUS-RANDOM, A.M.; MENDY, M. *et al.* Ser-249 p53 mutations in plasma DNA of patients with hepatocellular carcinoma from the Gambia. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 92, n. 2, p. 148-53, 2000.

KIRSCHNER, L.S. Signaling pathways in adrenocortical cancer. **Ann. NY Acad. Sci.** v.968, p.222-239, 2002.

KNUDSON, A.G. Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.** v.68, n.4, p.820-3,1971.

LALLI, E.; BARDONI, B.; ZAZOPOULOS, E. *et al.* A transcriptional silencing domain in DAX-1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. **Mol. Endocrinol.**, v.11, n13, p.1950-1960, 1997.

LATRONICO, A.C.; CHROUSOS, G.P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, n.5, p.1317-1324, 1997.

LATRONICO, A.C.; PINTO, E.M.; DOMENICE, S. *et al.* An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.86, n.10, p.4970-4973, 2001.

LEE, A.S.; GALEA, C.; DIGIAMMARINO, E.L. *et al.* Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. **J. Mol. Biol.**, v.327, n.3, p.699-709, 2003.

LIOU, L.S.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. Review and recent innovations. **Urol. Clin. North. Am.**, v.27, n.3, p.403-421, 2000.

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

LONGUI, C.A.; LEMOS-MARNI, S.H.; FIGUEIREDO, B. *et al.* Inhibin alpha-subunit (INH α) gene and locus changes in pediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. **J. Med. Genet.**, v.41, n.5, p.354-359, 2004.

LUNN, R.M., LANGLOIS, R.G.; HSIEH, L.L. *et al.* XRCC1 polymorphisms: effects on aflatoxin B1-DNA adducts and glycophorin A variant frequency. **Cancer. Res.**, v. 59, n. 11, p. 2557-61, 1999.

LUNN, R.M.; ZHANG, Y.J., WANG, L.Y. *et al.* p53 mutations, chronic hepatitis B virus infection, and aflatoxin exposure in hepatocellular carcinoma in Taiwan. **Cancer. Res.**, v. 57, n. 16, p. 3471-7, 1997.

MALKIN, D.; LI, F.P.; STRONG, L.C. *et al.* Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. **Science**, v.250, n.4985, p.1233-1238, 1990.

MATZUK, M.M.; FINEGOLD, M.J.; MATHER, J.P. *et al.* Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. **PNAS**, v.91, n.19, p.8871-8821, 1994.

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

MENDONÇA, B. B.; LUCON, A. M.; MENEZES, C. A. V. *et al.* Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. **J. Urol.**, v.154, n.6, p.2004-2009, 1995.

MILLER, E.C. Some current perspectives on chemical carcinogenesis in humans and experimental animals: Presidential Address. **Cancer Research** , v.38, n. 6, p. 1479-96, 1978.

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

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B. *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.

MITANI, F; MUKAI, K; MIVAMOTO, H. *et al.* The undifferentiated cell zone is a stem cell zone in adult rat adrenal cortex. **Biochim. Biophys. Acta.**, v.1619, n.3, p. 317-24, 2003.

MOORE, A.W.; McINNES, L.; KREIDBERG, J. *et al.* 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. *et al.* Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Mol. Endoc.**, v.7, n.9, p.1196-1204, 1993.

MUSCATELLI, F.; STROM, T. M.; WALKER, A. P. *et al.* 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.

OZISIK, G.; ACHERMANN, J.C.; MEEKS, J.J. *et al.* SF-1 in the development of the adrenal gland and gonads. **Horm. Res.**, v.59, n.1, p.94-98, 2003.

PARKER, K.L. & SCHIMMER, B.P. Genetics of the development and function of the adrenal cortex. **Rev. Endocr. Metab. Disord.**, v.2, n.3, p.245-252, 2001.

PARKIN, D.M.; KRAMÁROVÁ, E.; DRAPER, G.J. *et al.* **International Incidence of Childhood Cancer**, vol. II, IARC Scientific Publication, n. 144, 1998. 500 p.

PEREIRA, R.M.; MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, F. *et al.* Tumores do Córtex Adrenal na Infância. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, v.48, n.5, p.651-658, 2004.

PIANOVSKI, M.A.; MALUF, E.M.; DE CARVALHO, D.S. *et al.* Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr. Blood Cancer**. V.47, n.1, p. 56-60. 2006.

PINTO, E.M.; BILLERBECK, A.E.; VILLARES, M.C. *et al.* Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.**, v. 48, n. 5, p. 647-50, 2004.

RASHID, A.; WANG, J.S.; OIAN, G.S. *et al.* Genetic alterations in hepatocellular carcinomas: association between loss of chromosome 4q and p53 gene mutations. **Br. J. Cancer.** , v. 80, n.1-2, p. 59-66, 1999.

REINCKE, M.; MORA, P.; BEUSCHLEIN, F. *et al.* Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v.82, n.9, p.3054-3058, 1997.

RIBEIRO, R.C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; ZAMBETTI, G.P. *et al.* Uncommon Endocrine Tumors in Children and Adolescents. In: RAGHAVAN, D.; BRECHER, M.L.; JOHNSON, D.H.; MEROPOL, N.J.; MOOTS, P.L.; ROSE, P.G.; MAYER, I.A. **Textbook of Uncommon Cancer**. Londres: John Wiley & Sons Ltda, 2006. p.775-797

RIBEIRO, R.C. & FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **Eur. J. Cancer**. V. 40, n.8, p.1117-26, 2004 .

RIBEIRO, R.C.; 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**, v.98, n.16, p.9330-9335, 2001.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI NETO, R.; SCHELL, M. J. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J. Clin. Oncol.**, v.8, n.1, p.67-74, 1990.

RICE, D.A.; MOUW, A. R.; BOGERD, A. *et al.* A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. **Mol. Endocrinol.**, v.5, n.10, p.1552-1561, 1991.

ROSS, R.K.; YUAN, J.M.; YU, M.C. *et al.* Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma. **Lancet**, v. 339, n. 8799, p. 943-6, 1992.

SASANO, H.; SUZUKI, T.; SHIZAWA, S. *et al.* Transforming growth factor alpha, epidermal growth factor, and epidermal growth factor receptor expression in normal and diseased human adrenal cortex by immunohistochemistry and in situ hybridization. **Mod. Pathol.**, v.7, p.741-746, 1994.

SCHEDL, A. & HASTIE, N. Multiple roles for the Wilms tumor suppressor gene, Wt1 in genitourinary development. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v.140, n.1-2 p.65-69, 1998.

SHEN, H.M. & ONG, C.N. Mutations of the p53 tumor suppressor gene and ras oncogenes in aflatoxin hepatocarcinogenesis. **Mutat. Res.**, v. ,366., n. 1, p. 23-44, 1996.

SHIMIZU, Y.; ZHU, J.J.; HAN, F. *et al.* Different frequencies of p53 codon-249 hot-spot mutations in hepatocellular carcinomas in Jiang-su province of China. **Int. J. Cancer.** , v. 82, n. 2, p. 187-90, 1999.

SMELA, M.E.; CURRIER, S.S.; BAILEY, E.A. *et al.* The chemistry and biology of aflatoxin B(1): from mutational spectrometry to carcinogenesis. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 4, p. 535-45, 2001.

SOHN, S.; JAITOVITCH-GROISMAN, I.; BENLINAME, N., *et al.* . Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis. **Mutat. Res.** , v. 460, n. 1, p. 17-28, 2000.

STEENMAN, M.; WESTERVELD, A.; MANNENS, M. Genetics of Beckwith-Wiedeman Syndrome-Associated tumors: Common genetic pathways. **Genes Chromosomes Cancer**, v.28, p.1-13, 2000.

STRATAKIS, C. A. Genetics of adrenocortical tumors: Carney complex. **Ann. Endocrinol.** , v.62, n.2, p.180-4, 2001.

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.

SUZUKI, T.; KASAHARA, M.; YOSHIOKA, H. *et al.* LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 e LRH-1. **Mol. Cel. Biol.**, v.23, n.1, p.238-249, 2003.

SARWAR, Z.U.; WARD, V.L.; MOONEY, D.P. *et al.* Congenital adrenocortical adenoma:case report and review of literature. **Pediatr. Radiol.**, v.34, n.12, p.991-4, 2004.

TAKETO, M.; PARKER, K.L.; HOWARD, T.A. *et al.* 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.

TRUANT, R.; ANTUNOVIC, J.; GREENBLATT, J. *et al.* Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation. **J. Virol.** , v. 69, n. 3, p. 1851-9, 1995.

VARLEY, J.M.; MCGOWN, G.; THORNCROFT, M. *et al.* Are there low-penetrance TP53 Alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am. J. Hum. Genet.**, v.65, n.4, p.995-1006, 1999.

VAUTIER, G.; BONFORD, B.; PORTMANN, B.C. *et al.* p53 mutations in british patients with hepatocellular carcinoma: clustering in genetic hemochromatosis. **Gastroenterology** , v. 117, n. 1, p. 154-60, 1999.

VIERHAPPER, H. Adrenocortical tumors: clinical symptoms and biochemical diagnosis. **Eur. J. Radiol.**, v.41, n.2, p.88-94, 2002.

WAJCHENBERG, B.L.; ALBERGARIA PEREIRA, M.A.; MENDONÇA, B.B. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, v.88, n.4, p.711-736, 2000.

WANG, J.S.; HUANG, T.; SU, J. *et al.* Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 10, n. 2, p. 143-6, 2001.

WANG, J.S.; SHEN, X.; HE, X. *et al.* Protective alterations in phase 1 and 2 metabolism of aflatoxin B1 by oltipraz in residents of Qidong, People's Republic of China. **J. Natl. Cancer Inst.** , v. 91, n. 4, p. 347-54, 1999.

WANG, X.W.; FORRESTER, K.; YEH, H. *et al.* Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.**, v. 91, n. 6, p. 2230-4, 1994.

WEBER, M.M.; FOTTNER, C.; SCHMIDT, P. *et al.* Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. **Endocrinology**, v.140, p.1537-1543, 1999.

WEBER, M.M.; AUERNHAMMER, C.J.; KIESS, W. *et al.* Insulin-like growth receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. **Eur. J. Endocrinol.**, v.136, p.296-303, 1997.

WEST, A.N.; NEALE, G.A.; POUNDS, S. *et al.* Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors. *Cancer Research*. No prelo.

WIKIPÉDIA – A ENCICLOPÉIDA LIVRE. Disponível em: <<http://pt.wikipedia.org>. Acesso em: 17/11/2006

WOOLF, B. On estimating the relation between blood group and disease. **Ann. Hum. Genet.**, n. 19, p. 251–253, 1955.

WORLEY, K.C.; ELLISON, K. A.; ZHANG, Y-H. *et al.* 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, M.; ZHOU, H.; KONG, R.Y. *et al.* Mutations at codon 249 of p53 gene in human hepatocellular carcinomas from Tongan, China. **Mutat. Res.**, v. 381, n. 1, p. 25-9, 1997.

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. **Mol. Endocrinol.**, v.12, n.7, p.1010-1022, 1998.

ZANARIA, E.; BARDONI, B.; DABOVIC, B. *et al.* Xp duplications and sex reversal. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v.350, n.1333, p.291-296, 1995.

ZANARIA, E.; MUSCATELLI, F.; BARDONI, B. *et al.* 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. *et al.* DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. **Nature**, v.390, n.6657, p.311-315, 1997.

ANEXOS

ANEXO 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O RN

RESPONDA SE DESEJAR (marque com X)

Considere criança até 15 anos de idade e adulto acima de 15 anos.

1. Na minha família teve câncer em:

- 1 criança 2 crianças mais de 2 crianças
- 1 adulto 2 adultos mais de 2 adultos

Na família de meu esposo teve câncer em:

- 1 criança 2 crianças mais de 2 crianças
- 1 adulto 2 adultos mais de 2 adultos

2. Os locais ou tipos de câncer encontrados em crianças foram:

- Mama Cérebro Próstata Leucemia (sangue)
- Ovário Testículo Útero Estômago
- Intestino Fígado Pulmão Pele
- Pescoço Esôfago Garganta Rim
- Osso Tumor na glândula adrenal Não sei
- Outro tipo de câncer é: _____

3. Os locais ou tipos de câncer encontrados em adultos foram:

- Mama Cérebro Próstata Leucemia (sangue)
- Ovário Testículo Útero Estômago
- Intestino Fígado Pulmão Pele
- Pescoço Esôfago Garganta Rim
- Osso Tumor na glândula adrenal Não sei
- Outro tipo de câncer é: _____

4. A minha família é uma mistura de:

- Branco Negro Pardo Amarelo Índio
- Português Italiano Polonês Russo
- Ucraniano Japonês Paraguai Argentino Libanês
- Espanhol Outra raça europeia Outra raça oriental
- Chinês América do Sul (outros) Outros

5. A família de meu esposo é uma mistura de:

- Branco Negro Pardo Amarelo Índio
- Português Italiano Polonês Russo
- Ucraniano Japonês Paraguai Argentino Libanês
- Espanhol Outra raça europeia Outra raça oriental
- Chinês América do Sul (outros) Outros

Maternidade:
Município da Mat: _____



3 8 5 0 0 0 0 0 4 6 9



3 8 5 0 0 0 0 0 4 6 9

Teste de DNA

Proteja seu filho do câncer de córtex adrenal
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Saúde Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 33.669 - Matrícula 122.075

Instituto Pelé Pequeno Príncipe - Pesquisa em Saúde da Criança e do Adolescente

Av. Silva Jardim, 1632 • Água Verde • Curitiba - PR • CEP 80250-200

Tel / fax: (41) 3310 1126 • e-mail: curadoica@hpp.org.br

Centro de Genética Molecular e Pesquisa de Câncer em Crianças - Universidade Federal do Paraná
R. Agostinho Leão Jr., 400 • Alto da Glória • Curitiba - PR • CEP 80030-110

Telex (41) 33363 6264

REALIZAÇÃO:



PATROCÍNIO:



O TESTE DE DNA PARA RECÉM-NASCIDO PODE PREVER O APARECIMENTO DE UM TIPO DE CÂNCER COMUM EM CRIANÇAS DO PARANÁ
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)



O QUE A MÃE DO RECÉM-NASCIDO PRECISA SABER: este teste, feito com uma gota de sangue, pode identificar, na criança, uma alteração genética (chamada mutação) responsável pelo surgimento de um tumor em uma das glândulas adrenais, localizadas sobre os rins. Esse câncer, embora seja raro em outros países e em outros estados do Brasil, tem no Paraná uma frequência de 12 a 18 vezes maior. Por isso, se a mãe é paranaense, a chance da criança ter a mutação é em torno de 1 em 1500 (uma em mil e quinhentas). Esse tipo de alteração PODE OU NÃO ser herdada de um dos pais. Quando diagnosticado precocemente e tratado adequadamente esse tipo de tumor tem quase 100% de chance de cura. Alguns casos são diagnosticados tardiamente e a cura pode não ser mais possível. Por esse motivo, é importante realizar o exame. É importante lembrar que esse exame precisa ser feito antes da criança completar 1 ano de vida.

Se você ainda tiver dúvidas a respeito do teste ou desejar saber mais sobre o assunto basta entrar em contato com o coordenador desta pesquisa, Dr. Ronald C. Figueiredo, pelo telefone (41) 3363 6264 ou (41) 33 10 1126.

Esta campanha foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e Hospital Pequeno Príncipe, em Curitiba.

DECLARAÇÃO DA MÃE:

"Estou ciente de que receberei o resultado do teste na maternidade em 2 meses. Como em todos os tipos de exame, existe uma possibilidade muito pequena de haver erro, o que não pode ser previsto, por isso os resultados positivos serão sempre repetidos. Se o resultado for positivo, receberei orientação e todo apoio de uma equipe de especialistas, e de um médico da rede de saúde pública próxima de minha residência. A minha criança poderá ser acompanhada por um pediatra ou médico de minha escolha (e responsabilidade) e também receberá suporte da equipe desta pesquisa.

Depois de identificada a alteração no DNA o acompanhamento terá como objetivo diagnosticar precocemente o câncer. Em caso de aparecimento do tumor, minha criança, após autorização, poderá ser submetida à cirurgia, com chances de cura de quase 100%. O teste e todas as instruções para o acompanhamento (oferecido somente às crianças com teste positivo) serão inteiramente gratuitos. É importante saber ainda que o nome do meu bebê não aparecerá em futuras publicações e que a **AMOSTRA DE SANGUE NÃO SERÁ USADA PARA OUTRA FINALIDADE.**"

ATENÇÃO MÃE: por favor não leve este termo para sua casa, porque outra criança poderá ficar sem fazer o exame. Este TCLE obedecerá todas as normas estabelecidas na Resolução 196/96 para garantia dos seus direitos.

Sim, eu mãe da criança, li o TCLE (ou alguém leu para mim), entendi as explicações ao lado, considero esclarecidas todas as minhas dúvidas e autorizo a realização deste teste. Estou ciente das perguntas sobre câncer na família no verso deste termo e poderei ou não respondê-las.

Nome: _____

CPF: _____ RG: _____

Enderço completo: _____

CEP: - Cidade: _____ Estado: _____

Tel.: () _____ Celular: () _____

Assinatura _____ (ou impressão digital)

Nome da Maternidade: _____

Nº da declaração de nascido vivo: _____



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
(CRM 33869 - Matrícula 122475)

SANGUE

**ANEXO 2 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
ACOMPANHAMENTO DO RN**

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos
Página 1 de 3**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Consentimento para acompanhamento de seu(sua) filho(a) por um médico com suporte da equipe do projeto abaixo:

“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”

Fui consultada na maternidade e concordei em submeter meu(minha) filho(a) a um exame para verificar se ele(a) é portador(a) de uma alteração no DNA, chamada mutação, que pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, o qual ocorre nas glândulas adrenais (situadas sobre os rins), principalmente em crianças com menos de 4 anos.

Eu já conversei com o coordenador desta pesquisa pelo telefone e pude ouvir todas as explicações sobre o que significa uma criança ter resultado positivo para esse teste. Aceitei receber maiores explicações por meio de material impresso (uma cartilha) e áudio-visual (um vídeo), além da conversa com o médico indicado para meu(minha) filho(a). Neste presente termo, eu estou sendo consultada para decidir se aceito que meu(minha) filho(a) seja submetido(a) ao um acompanhamento pelo médico apresentado na cartilha anexa, com suporte de membros da equipe deste projeto.

Foi explicado a mim, pelo telefone e por meio da cartilha e do vídeo, que o risco de meu(minha) filho(a) apresentar o tumor na glândula adrenal é em torno de 10% e que - se isso acontecer - é mais provável que seja nos primeiros 4 anos de idade. Foi esclarecido também que o objetivo da equipe é oferecer ao(a) meu(minha) filho(a) a oportunidade de que, caso se desenvolva, esse tumor seja diagnosticado precocemente e retirado, o mais breve possível, através de uma cirurgia com grande chance de cura. Foi explicado que a equipe desta pesquisa não pode impedir o aparecimento do câncer, mas que, com certeza ela proporcionará uma chance de quase 100% de cura, sendo necessário para isso que meu(minha) filho(a) participe regularmente deste programa de proteção.

Quais os riscos deste acompanhamento?


Estou ciente de que, durante a coleta de sangue para dosagem de hormônios (produzidos pelo tumor), minha criança poderá se queixar de dor em razão da picada da agulha. Sei que há uma pequena chance de que ela desmaie, bem como que poderá haver um pequeno sangramento no local da introdução da agulha. Além disso, tenho ciência de que poderá haver algum impacto psicológico pelo fato da minha criança estar regularmente sendo examinada pelo médico e realizando dosagens hormonais e exames de imagem (ecografia).

Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Foi avisado a mim que serei informada a respeito de qualquer informação nova obtida durante o curso deste acompanhamento e que, caso seja de minha vontade, posso saber quando e como obter informações sobre esta pesquisa, entrando em contato com o Dr. Ronald Cavalcante de Figueiredo pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos

Página 2 de 3

O que dizer sobre confidencialidade?

Fui informada de que a identidade de minha criança será codificada e de que o código e o resultado dos exames serão armazenados separadamente em arquivos diferentes. Tenho conhecimento de que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo, sem menção ao nome da minha criança.

DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade que minha criança tome parte deste acompanhamento.
2. Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. Bonald C. Figueiredo e com o Dr. _____, médico que irá cuidar de minha criança cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e sobre seus riscos.
3. Estou ciente de que este estudo poderá ter alguns riscos, apontados acima ou outros ainda não previstos.
4. Estou ciente de que posso retirar minha criança deste estudo quando desejar.
5. Fui devidamente informada de que não haverá custos adicionais para que minha criança participe desta pesquisa.
6. Fui informada de que é norma do CEGEMPAC não pagar para que qualquer pessoa participe deste estudo ou de outros estudos realizados por essa instituição.
7. Fui informada de que caso venha a acontecer em minha criança alguma injúria decorrente da picada realizada para a coleta de sangue, ela receberá suporte dos médicos desta equipe e terá acesso a um acompanhamento com psicólogos caso seja necessário.
8. Fui informada de que os dados clínicos da minha criança não serão disponibilizados para qualquer pessoa que não faça parte desta equipe.
9. Estou ciente de que, quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias que ocorrerem devido à coleta de sangue, posso entrar em contato com o Dr. Bonald C. Figueiredo através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
10. Sei que posso obter mais informações sobre meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927) e que os direitos de minha criança como participante desta pesquisa estarão protegidos como determina a Resolução 196/96.
11. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido:

R337H em Parentes < 18 anos
Página 3 de 3**DECLARAÇÃO DA MÃE /DO PAI OU GUARDIÃO**

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento, fui incentivada a fazer perguntas sobre ele e todas elas foram devidamente respondidas. Eu dou permissão para que minha criança faça o acompanhamento com o(a) médico(a) Dr.(a), que contará com o auxílio da equipe deste projeto.

Nome: _____

Assinatura da mãe (ou pai ou guardião)_____
Local e data_____
Hora

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário e **NÃO AUTORIZO O ACOMPANHAMENTO** DA MINHA CRIANÇA, MAS FUI INFORMADA DE QUE, MESMO ASSIM, PODEREI PROCURAR AJUDA E ESCLARECIMENTOS DA EQUIPE QUANDO QUISER.

Assinatura da mãe (ou pai ou guardião)_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL**

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o(s) pai(s) da criança participante. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo sobre os riscos que podem dele decorrer. Declaro, ainda, que a mãe, o pai ou o guardião, bem como o próprio paciente, foram incentivados a fazer perguntas sobre este estudo.

Nome: _____

Médico(a) designado(a)_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA**

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, os riscos, os benefícios e as opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

Testemunha_____
Local e data_____
Hora

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) 3363 62 64.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARENTES MENORES DE 15 ANOS**

Código do recém-nascido

Parentes com < 15 anos
Página 1 de 4

Consentimento para teste da mutação TP53 R337H em parentes com menos de 15 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”

Eu li a cartilha, assisti ao vídeo e tive a oportunidade de tirar minhas dúvidas sobre a alteração no DNA encontrada no recém-nascido de minha família. Fui consultado(a) para realizar um exame de DNA que irá verificar se meu(minha) filho(a) é portador(a) dessa mesma alteração no DNA (chamada mutação), a qual pode estar presente ou não em vários de meus familiares. Essa mutação é responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor nas das glândulas adrenais que ficam sobre os rins e ele pode ou não se desenvolver em crianças de até 15 anos de idade, sendo mais freqüente, entretanto, antes dos 4 anos.

Entendi tudo que foi apresentado sobre este estudo, concordei em fazer o teste na minha criança e assinei este termo consciente de que ainda posso solicitar respostas e esclarecimentos a respeito de possíveis dúvidas sobre a presente pesquisa, entrando em contato direto ou por meio do telefone (0XX41) 3363 62 64 com o Dr. Bonald C. Figueiredo.

Por que este estudo está sendo realizado?

Sei que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele. É de meu conhecimento que os familiares portadores da mutação receberão informações, sobre ela, e aconselhamento genético.

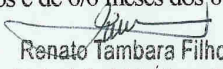
Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, da polpa digital de meu(minha) filho(a), uma gota de sangue e de que essa amostra de sangue será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se ele(a) possui ou não a mutação.

Entendi que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quanto tempo meu(minha) filho(a) ficará neste estudo?

Após coletar de meu(minha) filho(a) uma única gota de sangue, ele(a) não precisará realizar outros testes, ESTOU CIENTE, PORÉM, DE QUE ELE(A) PODERÁ SER CONVIDADO(A) A FAZER UM ACOMPANHAMENTO MÉDICO ATÉ QUE COMPLETE 15 ANOS DE IDADE (sendo de 3/3 meses até os 4 anos de idade, de 4/4 meses entre 4 e 8 anos e de 6/6 meses dos 8 aos 15 anos de idade), CASO ELE(A) SEJA PORTADOR DA MUTAÇÃO.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes <15 anos

Página 2 de 4

Quais são as conseqüências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.

Quais os riscos deste estudo?

Estou ciente de que, durante a coleta de sangue, poderei sentir dor devido à picada e de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou orelha.

Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece devido àquela mesma alteração no DNA e que os resultados podem auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças. Entendi que, caso também seja portador da mutação, poderei me beneficiar de um aconselhamento quando tiver meus próprios filhos.

Que outras opções existem?

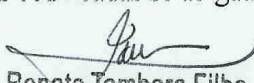
Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonifácio Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob cuidados do Dr. Bonifácio C. Figueiredo.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

Parentes com < 15 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da polpa digital de meu(minha) filho(a) para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.
3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.
4. Estou ciente de que eu, meu(minha) filho(a) e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.
5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza posso telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do fone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
5. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).
7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido _____

Parentes com < 15 anos

Página 4 de 4

DECLARAÇÃO DO PARENTE COM IDADE ABAIXO DE 15 ANOS

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas sobre ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o guardião (mãe ou pai) até que não houvesse mais dúvidas.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado _____

Local e data _____

Hora _____

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

Testemunha _____


Local e data _____

Hora _____

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: () Pai; () Mãe; () Irmão; () Irmã; () Tio; () Tia; () Primo; () Prima; () Avô; () Avô; () Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) 3363 62 64.


 Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
 em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
 CRM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 3 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARENTES DE 15 A 18 ANOS**

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos

Página 1 de 4

Consentimento para teste da mutação TP53 R337H em parentes de 15 a 18 anos.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

"VIGILÂNCIA EPIGENOMICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, BANCADA INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDAGÓGICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de cólon adrectal)"

Para maiores detalhes, antes de ler este termo, aconselha-se que você leia o cartilha e assista ao vídeo, entregue aos pais do recém-nascido com a alteração no DNA. Você foi consultado(a) para realizar um exame de DNA que verificará se você é também portador(a) dessa mesma alteração (chamada mutação), a qual pode ou não aparecer em outros membros da família. Recomenda-se também que você faça todas as atividades com relação à pesquisa antes de assinar este termo, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Romão C. Figueiredo, por meio do telefone (0XX41) 3363 62 64. Essa mutação pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, que ocorre nas glândulas autonias (situadas sobre os rins) de crianças, principalmente naquelas com menos de 41 anos.

Este termo de consentimento livre e esclarecido contém informações sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender esse estudo e, se concordar em participar dele, será solicitada sua assinatura e você receberá uma cópia do termo.

Inicialmente, é importante que você saiba que fica inteiramente a seu critério decidir se participa ou não deste estudo. Como você tem menos de 18 anos, um dos seus pais também precisa ler este termo, tirar todas as dúvidas que tiver e, somente depois, assinar caso concorde com a realização do exame. Mesmo sendo menor de idade, o exame não será feito se isso não for de sua vontade.

Por que este estudo está sendo realizado?

Tanto o conhecimento de que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele, e que aqueles portadores a mutação, recebem informações sobre ele e aconselhamento genético.

Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, de minha palma digital, uma gota de sangue e de que essa amostra será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se eu possuo ou não a mutação.

Só que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material de amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quanto tempo ficará neste estudo?

Entendi que, após a coleta de uma única gota do meu sangue, eu não precisarei realizar mais testes nem serei acompanhado(a) por essa equipe de pesquisa.


Romão C. Figueiredo

Coordenador do Núcleo de Genética em Pesquisa
Serviço de Diagnóstico e Referência em Genética - UFRN
Rua Augusto Severo, 95 - Natal/RN 50712-970

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 ano

Página 2 de 4

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.

Quais os riscos deste estudo?

Estou ciente de que, durante a coleta de sangue, poderei sentir dor devido à picada e de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou orelha.

Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece devido àquela mesma alteração no DNA e que os resultados podem auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças. Entendi que, caso também seja portador da mutação, poderei me beneficiar de um aconselhamento quando tiver meus próprios filhos.

Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonifácio Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob a supervisão do Dr. Bonifácio C. Figueiredo.



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____, médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da minha polpa digital para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.
3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.
4. Estou ciente de que eu e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue em minha polpa digital e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.
5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).
6. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).
7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes < 18 anos
Página 4 de 4**DECLARAÇÃO DO PARENTE COM IDADE DE 15 A 18 ANOS**

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DE PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL**

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o MENOR acima.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA**

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário.

Nome: _____

Testemunha_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DO GUARDIÃO (pai ou mãe)**

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas a(o) minha (meu) filha(o).

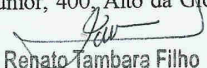
Nome: _____ () pai; () mãe;

Assinatura_____
Local e data_____
Hora

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: () Pai; () Mãe; () Irmão; () Irmã; () Tio; () Tia; () Primo; () Prima; () Avô; () Avó; () Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) 3363 62 64.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

**ANEXO 5 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA
PARENTES MAIORES DE 18 ANOS**

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 1 de 4Consentimento para teste da mutação TP53R337H em parentes \geq 18 anos.**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO****“VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (tumor de córtex adrenal)”**

Para maiores detalhes, antes de ler este termo, aconselha-se que você leia a cartilha e assista ao vídeo, entregues aos pais do recém-nascido com a alteração no DNA. Você foi consultado(a) para realizar um exame de DNA que verificará se você é também portador(a) dessa mesma alteração (chamada mutação), a qual pode ou não aparecer em vários membros da família. Recomenda-se também que você tire todas as dúvidas com relação à pesquisa antes de assinar este termo, podendo inclusive entrar em contato direto com o coordenador desta pesquisa, Dr. Ronald C. Figueiredo por meio do telefone (0XX41) 3363 62 64. Essa mutação pode ser responsável pelo aparecimento de um tipo de tumor, que ocorre nas glândulas adrenais (situadas sobre os rins) de crianças, principalmente naquelas com menos de 4 anos.

Este termo de consentimento lhe dará informações sobre o estudo que será discutido com você. Assim que você entender esse estudo e, se concordar em participar dele, será solicitada sua assinatura e você receberá uma cópia do termo.

Por que este estudo está sendo realizado?

Tenho conhecimento de que a equipe está tentando descobrir quem são e onde moram os parentes do recém-nascido que apresentam a mesma alteração encontrada nele e que aqueles, portadores da mutação, receberão informações, sobre ela, e aconselhamento genético. Sei que, caso meu teste seja positivo, o risco de que eu desenvolva algum tipo de câncer é muito baixo em razão de já estar na idade adulta e que, por essa razão, receberei apenas aconselhamento e material para consultas (cartilha e vídeo).

Qual é o envolvimento deste estudo?

Estou ciente de que será coletada, de minha polpa digital, uma gota de sangue e de que essa amostra será utilizada para realizar um teste de DNA que tem como objetivo saber apenas se eu possuo ou não a mutação.

Sei que este estudo procura investigar apenas a alteração específica do DNA que causa o tumor e que o material da amostra não será utilizado para fazer nenhum outro tipo de teste, referente a outras doenças ou situações clínicas.

Quais são as consequências da desistência de continuar neste estudo?

Nenhuma. Sei que posso desistir de continuar neste estudo a qualquer momento e, caso resolva participar mais tarde, poderei me submeter ao teste.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 2 de 4

Quais os riscos deste estudo?

Estou ciente de que, durante a coleta de sangue, poderei sentir dor devido à picada e de que há uma pequena chance de desmaio ou de sangramento no local de introdução da lanceta, localizado na polpa digital ou na orelha.

Quais são os benefícios deste estudo?

Tenho conhecimento de que as informações obtidas a partir deste estudo propiciarão à equipe um melhor entendimento sobre o tumor que acontece devido àquela mesma alteração no DNA e que os resultados poderão auxiliar a compreensão das chances de desenvolvimento desse tumor em algumas crianças. Entendi que, caso eu também seja portador da mutação, poderei me beneficiar de um aconselhamento quando tiver meus próprios filhos.

Que outras opções existem?

Posso escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Sei que tenho o direito de saber sobre os resultados deste estudo e que, se for de minha vontade saber mais sobre quando e como obter esses resultados, posso falar diretamente com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo, pelo telefone (0XX41) 3363 62 64.

O que dizer sobre confidencialidade?

Tenho conhecimento que o código de minha identidade e o resultado do teste serão armazenados separadamente em arquivos diferentes e que as informações codificadas serão guardadas no CEGEMPAC de Curitiba, sob os cuidados do Dr. Bonald C. Figueiredo.



Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 3 de 4**DECLARAÇÃO DE ENTENDIMENTO**

1. Eu li o texto acima e aceito de livre e espontânea vontade tomar parte neste estudo.

Tive a oportunidade de conversar abertamente com o Dr. _____ médico responsável pelo acompanhamento da primeira criança de minha família cujo teste foi positivo, sobre as razões deste estudo e em relação aos seus riscos. Tive acesso à cartilha ("Cartilha para o Diagnóstico Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças") e ao vídeo (sobre "Detecção Precoce e Cura do Tumor de Córtex Adrenal em Crianças"), além da chance de esclarecer todas as minhas dúvidas com o coordenador desta pesquisa, Dr. Bonald C. Figueiredo.

2. Estou ciente de que este estudo poderá ter riscos, como dor provocada pela perfuração da minha polpa digital para coleta de sangue, impacto psicológico e alguma forma de transtorno ou incômodo por se tratar de uma alteração no DNA.

3. Fui informado de que é norma do CEGEMPAC não pagar para qualquer pessoa com o objetivo de que ela participe deste estudo, bem como de qualquer outro estudo realizado por essa instituição.

4. Estou ciente de que eu e meus familiares poderemos receber todo suporte da equipe desta pesquisa para eventuais problemas relacionados à coleta de sangue em minha polpa digital e caso se faça necessário o suporte de profissionais médicos e/ou psicólogos.

5. Estou ciente de que quando eu precisar esclarecer mais dúvidas a respeito deste estudo ou sobre injúrias de qualquer natureza poderei telefonar para o coordenador, Dr. Bonald C. Figueiredo, através do telefone (0XX41) 3363 62 64 (CEGEMPAC de Curitiba).

6. Sei que poderei obter mais informações sobre os meus direitos como participante deste estudo através do escritório da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (0XX41 3360 1896 ou 0XX41 3363 2927).

7. Receberei uma cópia deste termo de consentimento.



Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
PRN 3369 - Matrícula 122475

Código do recém-nascido

R337H em Parentes \geq 18 anos
Página 4 de 4**DECLARAÇÃO DO PARENTE ADULTO**

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas em relação a ele. Declaro que todas as minhas perguntas foram devidamente respondidas e que aceito participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DO MÉDICO/PESQUISADOR OU DA PESSOA DESIGNADA PELO MÉDICO RESPONSÁVEL**

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o adulto acima. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo os riscos de que dele podem decorrer.

Nome: _____

Médico/pesquisador ou designado_____
Local e data_____
Hora**DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA**

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, o teste de DNA, o acompanhamento proposto para as crianças, o aconselhamento genético para os adultos, os riscos, benefícios e opções de tratamento foram apresentadas ao voluntário de maior idade.

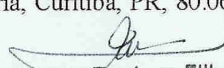
Nome: _____

Testemunha_____
Local e data_____
Hora

Parentesco do voluntário com o recém-nascido que teve teste positivo: Pai; Mãe; Irmão; Irmã; Tio; Tia; Primo; Prima; Avó; Avô; Outro:

Observação: o MENOR só deverá fazer o teste apenas se já for confirmado que ele pertence ao lado da família de onde vem a alteração.

Em caso de perguntas ou emergências com referência a este protocolo, por favor contatar diretamente: CEGEMPAC, Rua Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória, Curitiba, PR, 80.060-240, telefone (0XX41) 3363 62 64.


Renato Tambara Filho
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas-UFPR
CRM 3369 - Matrícula 122475

ANEXO 6 - PARECER CONEP



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1557/2005

Registro CONEP: 11859 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0023.0.208.000-05

Processo nº 25000.056983/2005-82

Projeto de Pesquisa: "Vigilância epidemiológica na Paraná genotipagem, rede informatizada e encaminhamentos para um câncer pediátrico hereditário que aumenta progressivamente neste Estado".

Pesquisador Responsável: Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo

Instituição: Hospital de Clínicas/Universidade Federal do Paraná.

Área Temática Especial: Genética humana.

Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1162/2005, cabem as seguintes considerações

- a) O pesquisador respondeu satisfatoriamente as pendências relativas a adequações nos Termos de Consentimento Livre e Esclarecido e modificações no corpo do texto conforme solicitado.
- b) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- c) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado

Brasília, 6 de setembro de 2005.

WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

**ANEXO 7 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES
HUMANOS DO HC/UFPR**

PARECER CEP

Protocolo: CEP-HC/UFPR 997.036/2005-02 CAAE: 0023.0.208.000-05

Projeto de Pesquisa: "VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA NO PARANÁ: GENOTIPAGEM, REDE INFORMATIZADA E ENCAMINHAMENTOS PARA UM CÂNCER PEDIÁTRICO HEREDITÁRIO QUE AUMENTA PROGRESSIVAMENTE NESTE ESTADO (TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL)"

Pesquisador: Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo

Instituição: Hospital de Clínicas da UFPR

Área Temática Especial: Genética Humana.

Ao proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1162/2005, comunicamos que as respostas apresentadas foram analisadas e encontram-se atendidas de forma objetiva. O investigador concorda com todas as alterações no TCLE enviando uma nova versão para análise a qual foi aprovada por este CEP.

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto proposto, recomendando que o investigador aguarde o parecer final da CONEP para início da pesquisa no Centro.

Parecer do CEP: Aprovado

Curitiba, 10 de agosto de 2005.

PROF. DR. FLÁVIO DE QUEIROZ TELLES FILHO
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
em Seres Humanos do Hospital de Clínicas / UFPR
CRM Nº 5778 / Mat. 83623

Renato Tambara Filho

Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)