

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

CECÍLIA FERNANDES LOREA

**Expressão dos genes relacionados a
apoptose celular em tumores
adrenocorticais de crianças**

Ribeirão Preto

2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

CECÍLIA FERNANDES LOREA

**Expressão dos genes relacionados a
apoptose celular em tumores
adrenocorticais de crianças**

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de mestre em Saúde da Criança e
do adolescente

Área de concentração: Oncologia Pediátrica

Orientador Dr. Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Lorea, Cecília Fernandes
Expressão dos Genes Relacionados a Apoptose Celular em Tumores
Adrenocorticais de Crianças
Cidade de Ribeirão Preto – SP. Ribeirão Preto, 2010.
X p.: Il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração Puericultura e Pediatria.
Orientador: Scrideli, Carlos Alberto

1. Tumor adrenocortical, 2. adenoma de supra-renal, 3. carcinoma de supra-renal, 4. adrenal, 5. supra-renal, 6. apoptose, 7. expressão gênica.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cecília Fernandes Lorea.

Expressão dos Genes Relacionados a
Apoptose Celular em Tumores
Adrenocorticais de Crianças.

Dissertação de Mestrado apresentada à
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre junto ao
Departamento de Puericultura e Pediatria.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

*Para Otávio pelo amor,
compreensão, apoio e confiança que
sempre depositou em mim.*

*E à pequena Amanda, meu
tesouro, por se comportar sempre que
precisei.*

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido orientador Professor Dr. Carlos Alberto Scrideli pela sabedoria, paciência e confiança em mim depositada.

Ao Professor Dr. Luiz Gonzaga Tone pela colaboração, disponibilidade e valiosas sugestões indispensáveis a este trabalho.

Aos meus pais Luiz Henrique e Lária pelos ensinamentos que tão sabiamente souberam transmitir e principalmente pelo amor e incentivo que sempre recebi ao longo da vida.

Às minhas irmãs Gabriela e Cláudia por estarem comigo todas as horas e aos meus cunhados por cuidarem delas.

Aos meus amigos Audrey, Tatiana e Marcos por serem parte imprescindível da conclusão deste trabalho. Pelo carinho, incentivo e hospitalidade, enfim, por serem minha família enquanto estive longe.

Os meus sogros Carlos Alberto e Eliana pelo apoio e incentivo na conclusão deste trabalho e pelo excelente trabalho na criação de seu filho.

Ao Dr. Elvis Cuevas Mateo pela imensa ajuda e companheirismo.

À Dr^a. Maria Angélica Abdalla de Freitas Cortez pela presteza, amizade e colaboração durante a realização deste trabalho.

À Dr^a. Rosane de Paula Gomes Queiróz pelo auxílio, amizade e sugestões tão úteis na conclusão deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Oncologia pelo agradável convívio e valiosos conhecimentos transmitidos.

À equipe de Urologia Dr. Silvio Tucci Junior, Dr. Augusto Fernandes Molina pela coleta do material.

Ao Dr. Luciano Neder Serafini, patologista, e Maria Paula Montiani Scandar por realizar as microdissecções das amostras.

À Amélia pelo auxílio durante a lise tecidual e à Silvia pela ajuda na quantificação do RNA.

À equipe da UTI Pediátrica e Neonatal do Hospital Universitário São Francisco de Paula pelo apoio e disponibilidade.

À equipe da Oncologia Pediátrica Dr. José Bernardes, Dr^a Bianca, Dr. Elvis, Dr. Ricardo pelos conhecimentos transmitidos, auxílio e amizade.

À equipe da Pediatria, Docentes, Contratados, Enfermagem e Residentes pela grande contribuição na minha formação como pediatra.

Às secretárias do Departamento de Pediatria pela ajuda e paciência durante estes anos.

À FAPESP pela concessão da bolsa de mestrado.

À FAEPA pelo auxílio financeiro.

Aos pacientes com tumores adrenocorticais e seus familiares por permitirem a inclusão de seus dados e análise de seus tumores.

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para realização deste trabalho.

*“Embora ninguém possa voltar atrás e
fazer um novo começo, qualquer um pode
começar agora e fazer um novo fim”*

ChicoXavier

Sumário

- Resumo	i
- Abstract	ii
- Lista de Tabelas	iii
- Lista de Figuras	iv
- Introdução – Tumor Adrenal	01
Desenvolvimento Adrenal	04
Apoptose	07
- Justificativa	15
- Objetivos	16
- Materiais	17
- Métodos	20
- Análise Estatística	24
- Resultados	25
- Discussão	37
- Conclusão	46
- Referências	47
- Anexo 1 - Análise dos genes pró apoptóticos por Mann-Whitney	57
- Anexo 2 - Análise dos genes antiapoptóticos por Mann-Whitney	59
- Anexo 3 - Protocolos do Laboratório de Biologia Molecular do HC-FMRP-USP	60
- Termo de consentimento informado para tumor adrenocortical	63
- Termo de consentimento informado para adrenal proveniente de tumor de Wilms	67

Resumo

Introdução: Tumores adrenocorticais são neoplasias raras, os quais correspondem a apenas 0,2% de todos os cânceres pediátricos. Tem-se sugerido que o processo apoptótico possa ser a chave para o desenvolvimento desses tumores. O objetivo deste estudo foi analisar, em tumores adrenocortical pediátricos, a expressão dos genes responsáveis pela apoptose. Os níveis de expressão dos genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *FADD*, *BCL2*, *BAX*, *APAF1*, *TNFA* e *NFKB*, da cadeia apoptótica foram analisados por meio de PCR, em tempo real quantitativo, em 22 amostras consecutivas de tumor obtidas de crianças com diagnóstico de tumor adrenocortical (11 classificadas como estadio I, 3 como estadio II, 1 como estadio III e 7 como estadio IV). Testes de Mann-Whitney e regressão logística foram usados para acessar a correlação entre os genes analisados e as variáveis clínicas e biológicas. As curvas de Kaplan Meier e o teste log rank foram usados para estimar a sobrevida geral em 5 anos. Valores de expressão gênica maiores que mediana foram consideradas hiperexpressos. A sobrevida geral em 5 anos foi de 64% no grupo de pacientes analisados. Hiperexpressão do *NFKB* foi associada a crianças de idade > 5 anos ($p=0,02$) e à presença da mutação *TP53-R337H* ($p=0,007$), hiperexpressão do *FAS* foi associada a crianças de idade >5 anos ($p=0,05$). Hipoexpressão do *BCL2* foi associada à presença de óbito ($p=0,04$) e hipoexpressão do *TNFA* ao estadio IV ($p=0,008$). Os pacientes que apresentaram hiperexpressão do gene *BCL2* tiveram melhor sobrevida geral em 5 anos (0,91 versus 0,53; $p=0,03$). Nossos resultados sugerem que os genes relacionados com apoptose podem estar relacionados com as variáveis clínicas, biológicas e sobrevida em tumores adrenocorticais de pacientes pediátricos. Estudos funcionais e análise de um maior número de casos são necessários para confirmar esses achados.

Palavras-chave: Tumor adrenocortical. Adenoma de suprarrenal. Carcinoma de suprarrenal. Adrenal. Suprarrenal. Apoptose. Expressão gênica.

Abstract

Propose: The adrenocortical tumors are rare malignancies, corresponding to only 0.2% of all pediatric cancers. It has been suggested that the apoptotic process could be a key event in the development of these tumors. The aim of this study was to analyze the gene expression profile of apoptosis-related genes in pediatric adrenocortical tumors. The levels of mRNA expression of the apoptosis-related genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *FADD*, *BCL2*, *BAX*, *APAF1*, *TNFA* and *NFKB* were analyzed by quantitative real-time PCR in consecutive microdissected tumor samples obtained from 22 children with diagnosis of adrenocortical tumors (11 classified as stage I, 3 as stage II, 1 as stage III and 7 as stage IV). Mann-Whitney and logistic regression tests were used to assess the correlation between the analyzed genes and clinical/biological variables. The Kaplan Meier curves and log rank test was used to estimate 5-year overall survival (OS). Values of gene expression higher the median were considered as overexpressed. The 5 years-OS was 64.6% for the overall group of patients analyzed. Overexpression of *NFKB* was associated to age >5 years (p:0.02) and *TP53-R337H* (p:0.007), overexpression of *FAS* was associated to age >5 years (p:0.05). Underexpression of *BCL2* was associated to adverse event (p:0.04) and underexpression of *TNFA* to stage IV classification (p:0.04). Patients who presented overexpression of the *BCL2* gene had a better 5 years-OS (0.91 versus 0.53, p:0.03). Our results suggest that apoptosis-related gene expression profile in pediatric adrenocortical tumors may be related to clinical/biological variables and survival. Functional studies and analysis of a large number of cases are needed to confirm these findings.

Key Words: Adrenocortical tumors. Suprarenal adenoma. Suprarenal carcinoma. Adrenal. Suprarenal. Apoptosis. Gene expression.

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Estadiamento proposto para tumores adrenocorticais em crianças. (modificado de SANDRINI et al., 1997)	04
TABELA 2 - Descrição dos dados clínicos dos pacientes analisados com tumor de adrenal.	18
TABELA 3 - Valores hormonais pré e pós cirúrgicos dos pacientes.	19
TABELA 4 - Sequência dos genes <i>CASP3</i> , <i>CASP8</i> , <i>CASP9</i> , <i>FAS</i> , <i>BCL2</i> , <i>NFKB</i> , <i>TNFA</i> e <i>GUS</i> .	22
TABELA 5 - Valores de expressão relativa dos genes da apoptose para cada paciente.	29
TABELA 6 - Nível de expressão dos genes e sua associação com sobrevida global em 5 anos.	34
TABELA 7 – Correlação entre os genes estudados de acordo com o teste de Spearman.	36

Lista de Figuras

- FIGURA 1. Desenho esquemático ilustrando desenvolvimento adrenal. A - glândula com 6 semanas de gestação. B - com sete semanas. C - com oito semanas. F - recém nascido. G - Com 1 ano de vida. H - mostra a adrenal de uma criança de 4 anos demonstrando que o tamanho da glândula é menor do que no período fetal e que o córtex fetal foi totalmente involuído. (MOORE & PERSAUD, 1998) _____ 05
- FIGURA 2. Ilustra as alterações na morfologia celular ao sofrer apoptose. ____ 08
- FIGURA 3. Esquema mostrando a via intrínseca e extrínseca da apoptose e a ativação das caspases. (Baseado em HAJRA e LIU, 2004) _____ 10
- FIGURA 4. Dois passos importantes de ativação de caspases, um envolvendo os receptores de morte (FAS e TNF) e outro a mitocôndria (BCL2). (Baseado em VERMEULEN et al., 2005) _____ 14
- FIGURA 5. Sequenciamento do gene *TP53* exon 10, (A) sequência selvagem, (B) mutação *TP53-R337H*. _____ 24
- FIGURA 6. Sobrevida geral x estadiamento. Devido ao tamanho relativamente pequeno da amostra os pacientes foram agrupados em estádios I/II e III/IV _____ 27
- FIGURA 7. Sobrevida geral x idade do paciente maior ou menor de 5 anos
_____ 27
- FIGURA 8. Sobrevida geral x peso do tumor maior ou menor que 100 gramas
_____ 28
- FIGURA 9. Sobrevida geral x volume do tumor maior ou menor que 200 cm³
_____ 28
- FIGURA 10. Expressão relativa do gene *FAS* x idade maior ou menor de 5 anos
_____ 30
- FIGURA 11. Expressão relativa do gene *TNFA* x estadio IV
_____ 31
- FIGURA 12. Expressão relativa do gene *TNFA* x estadio I
_____ 31
- FIGURA 13. Expressão relativa do gene *BCL2* x ocorrência de óbito
_____ 32
- FIGURA 14. Expressão relativa do gene *NFKB* x idade maior ou menor de 5 anos
_____ 32

FIGURA 15. Expressão relativa do gene *NFKB* x presença ou ausência da mutação *TP53-R337H* _____ 33

FIGURA 16. Sobrevida global x expressão do gene *BCL2* abaixo (hipoexpresso) ou acima (hiperexpresso) do valor mediano de expressão _____ 35

1. Introdução

1.1. Tumor Adrenocortical

Tumores adrenocorticais (ACT) são neoplasias raras e, em estadios avançados, são frequentemente fatais. Sua incidência em criança é extremamente baixa, sendo 0,2% de todos os cânceres pediátricos. Por essa razão, há pouco conhecimento sobre sua malignidade, e muitos dados são obtidos por estudos realizados em adultos. (CIFTCI et al., 2001; SUTTER e GRIMBERG, 2006; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; SBAGIA et al., 2005).

Tumores adrenocorticais têm uma distribuição bimodal com picos na primeira e quarta década de vida. A incidência nos Estados Unidos é de 0,2-0,3 casos por milhão, enquanto, no Brasil, a incidência, nos estados de São Paulo e Paraná, é de 10 a 15 vezes maior. O motivo dessa maior frequência ainda é desconhecido. (CIFTCI et al., 2001; KIRSCHNER, 2006; MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; SBAGIA et al., 2005)

Tanto nos pacientes norte-americanos como nos brasileiros há uma associação com mutações no gene *TP53*. Entretanto, no Brasil, na região de maior incidência, foi observado que existe uma única mutação no exon 10 do gene *TP53*, mais precisamente no códon 337 onde ocorre a troca de arginina por histidina (*TP53-R337H*), enquanto nos pacientes norte-americanos a mutação ocorre primariamente nos exons 2 ao 8. Assim a penetrância da mutação brasileira é baixa (somente 10-15% dos portadores desenvolvem ACT) e parece não predispor a outras malignidades ao longo da vida (FIGUEIREDO et al., 2006; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005). Embora estudos mais recentes evidenciem essa mutação associada a

outros tumores como o carcinoma de mama, ainda existe discussão sobre sua correlação com a Síndrome de Li-Fraumeni e outras predisposições ao câncer (ACHATZ et al., 2007; PALMERO et al., 2008). Pinto et al. descrevem que a mutação *TP53-R337H* é encontrada em 78-97% dos pacientes da região sul e sudeste do Brasil e demonstrou, em seu estudo, que a maior frequência da doença nesta região e a sua homogeneidade na mutação se devem a um ancestral comum a maioria dos pacientes, apesar de esse fato não ter sido encontrado em outro estudo com marcadores polimórficos diferentes. (PINTO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2001). Dados ainda não publicados de grupo do sul do Brasil mostram que se encontram fortes indícios da existência de um efeito fundador para a mutação *TP53-R337H* com base em estudo da fina estrutura dos haplótipos do *TP53*, sugerindo, devido a um caso encontrado fora do Brasil (o qual possui essa mesma estrutura) que a origem seja possivelmente portuguesa (GARRITANO et al., 2009).

Mutações inativantes no locus 17p13, incluindo *TP53*, gene supressor de tumor, e alterações no locus 11p15 levando a super-expressão do *IGF-II* (“*insulin-like growth factor II*”) são frequentemente observadas (KIRSCHNER, 2006; WEST et al., 2007). O *IGF-II* é encontrado no córtex adrenal fetal e em 85% dos tumores adrenais (COULTER, 2005). A frequência de tumores suprarrenais aumenta em pacientes com Síndrome de Beckwith-Wiedmann, Li-Fraumeni (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; WEST et al., 2007).

Em crianças os tumores adrenocorticais aparecem tipicamente durante os primeiros 5 anos de vida (idade média, 3-4 anos), apesar de terem um pequeno pico na adolescência, ocorrendo, principalmente, no sexo feminino (1,5:1). Normalmente, causam distúrbios endócrinos e são diagnosticados 5-8 meses após os primeiros sinais ou sintomas. Em aproximadamente 90% dos pacientes, detecta-se virilização sozinha ou em associação. Síndrome de Cushing isolada é rara, aparece em somente 5% (KIRSCHNER, 2006; MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; TEINTURIER et al.,

1999). Neoplasias não funcionantes são incomuns em crianças, mas podem ser vistas em adolescentes e adultos jovens. Os carcinomas podem apresentar-se com doença regional e/ou metástases a distância que, usualmente, acometem fígado, pulmões, rins e ossos, nessa ordem (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005).

A diferenciação entre adenomas e carcinomas é difícil, estima-se que 10-20% dos casos pediátricos são adenomas. Para identificar malignidade, são analisados índices de mitoses, presença de necrose confluyente, mitoses atípicas, peso e tamanho da massa, invasão venosa e capsular, apesar de esses parâmetros falharem em identificar aquele paciente com doença localizada que irá recair. Hough, Weiss e van Slooten et al. criaram classificações histopatológicas (HOUGH et al., 1979; VAN SLOOTEN et al., 1985; WEISS, 1984) diferentes para separar essas neoplasias em graus de malignidade, fato que, associado aos outros critérios ajuda na decisão terapêutica, mas não podem ser usados como padrão-ouro no diagnóstico, pois um método pode classificar o paciente diferentemente do outro e nenhum prediz prognóstico (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; SBRAGIA et al., 2005; TEINTURIER, 1999). A classificação por estadiamento continua sendo o fator que mais determina prognóstico (TUCCI JR et al., 2005).

A sobrevida total de 5 anos livre de doença é de 54-74% (MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005). Podemos separar grupos para estimar prognóstico, Sandrini et al. propõem um estadiamento que é baseado na extensão da doença, tamanho e peso do tumor (tabela 1). Os dados de sobrevida do International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry (IPACTR) baseados nessa classificação estimam que mais de 90% dos pacientes com estadio I tratados somente com cirurgia sejam sobreviventes a longo prazo (PIANOVSKI et al., 2006), mas somente 10% dos pacientes com estadio IV, mesmo submetendo-os a tratamentos quimioterápicos intensos (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; SANDRINI et al., 1997).

Tabela 1 - Estadiamento proposto para tumores adrenocorticais em crianças (modificado de SANDRINI et al., 1997)

<i>Estadio</i>	Definição
I	Tumores pequenos ($<200\text{cm}^3$ ou $< 100\text{g}$) e completamente ressecados e normalização dos hormônios após a cirurgia
II	Tumores grandes ($\geq 200\text{ cm}^3$ ou $\geq 100\text{g}$) ou ruptura de tumor e normalização dos hormônios após a cirurgia
III	Tumores irressecáveis ou doença residual após a cirurgia ou persistência de níveis hormonais anormais após a cirurgia
IV	Doença metastática

Existem diferenças histopatológicas e em comportamento dos tumores que se apresentam em crianças pequenas e os de adultos e adolescentes. Isso sugere que haja uma diferença no local de origem das células mutadas. Nas crianças, por ter uma predominância de virilização, a origem das células neoplásicas poderia ser proveniente do córtex fetal que representa 85% do córtex adrenal durante o desenvolvimento fetal e, nos tumores de adultos, estas surgiriam do córtex definitivo (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

1.2. Desenvolvimento adrenal

O córtex adrenal sintetiza esteróides essenciais (ex. glicocorticóides, andrógenos e mineralocorticóides) que regulam diversos processos biológicos como pressão arterial, metabolismo da glicose, sistema imune e desenvolvimento sexual. No período embrionário, o córtex é subdividido em córtex definitivo e córtex fetal, sendo este último responsável pela produção de dehidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S)

que contribui para manutenção da gestação normal (COULTER, 2005; MESIANO e JAFFE, 1997; RATCLIFFE et al., 2003; SPENCER et al., 1999).

A suprarrenal tem uma origem dupla: o córtex se desenvolve a partir do mesoderma intermediário e a medula é de origem ectodérmica da crista neural. Durante a 5^a semana de desenvolvimento ocorre o aparecimento do córtex adrenal. Ainda as células mesoteliais entre a raiz do mesentério e a gônada em desenvolvimento começam a proliferarem-se e penetrar o mesênquima subjacente, em nível dos dois últimos somitos torácicos. A primeira coleção de células tem formato fino e esférico, que se diferencia em grandes órgãos acidófilos, o córtex fetal. O segundo grupo de células, menores que a primeira, circula o primeiro grupo e forma o córtex definitivo (COULTER, 2004), que se diferencia em zona glomerulosa e zona fasciculada (SADLER, 2005). A zona reticular parece originar-se da parte exterior do córtex fetal. A parte interna do córtex fetal permanece durante toda vida fetal, mas degenera-se rapidamente por apoptose depois do nascimento (RATCLIFFE et al., 2003). A estrutura adulta do córtex só é obtida na puberdade (Figura 1).

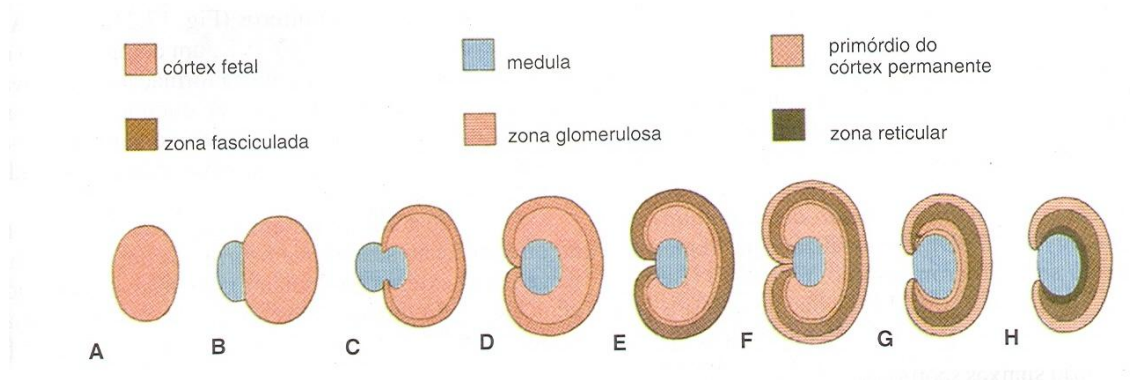


Figura 1. Desenho esquemático ilustrando desenvolvimento adrenal. A - glândula com 6 semanas de gestação. B - com sete semanas. C - com oito semanas. F - recém nascido. G - Com 1 ano de vida. H - mostra a adrenal de uma criança de 4 anos demonstrando que o tamanho da glândula é menor do que no período fetal e que o córtex fetal foi totalmente involuído. (MOORE & PERSAUD, 1998)

A zona glomerulosa - uma camada delgada de células localizada na superfície do córtex adrenal imediatamente abaixo da cápsula é - primariamente, responsável pela produção de aldosterona. A regulação da aldosterona é quase independente das outras zonas, esta é dependente da concentração de sódio e potássio no líquido extra-celular e do sistema renina-angiotensina, sofrendo pouco controle pelo hormônio anti-diurético (ACTH). A zona fasciculada (média) e zona reticular (profunda) produzem respectivamente cortisol e androgênios.

A medula se forma a partir das células cromafins que são células ganglionares simpáticas modificadas derivadas das células da crista neural, as quais migram para o interior da glândula, onde se dispõem em cordões e aglomerados. Elas congregam no centro ao redor das tributárias da veia suprarrenal e recebem contato sináptico direto através das fibras emergentes pregangliônicas do décimo primeiro e décimo segundo segmento torácico do cordão espinhal. A principal substância secretada pelas células cromafins é a epinefrina, a qual é liberada dentro dos leitos capilares circundantes das células individuais. As células cromafins são assim denominadas porque se coram de amarelo-castanho pelos sais de cromo. Durante toda a vida embrionária, as células cromafins são amplamente dispersas pelo embrião (MESIANO e JAFFE, 1997; SADLER, 2005), todavia, nos adultos, o único grupo persistente é na medula das glândulas suprarrenais.

O córtex fetal ocupa 85% do córtex adrenal durante o desenvolvimento embrionário e desaparece pouco tempo após o nascimento, perdendo em torno de 50% do seu volume nas primeiras 2 semanas (MESIANO e JAFFE, 1997) devido a uma apoptose maciça (SPENCER et al., 1999; WEST et al., 2007). Portanto, especula-se que esse seja o local no qual ocorre a transformação neoplásica e não no córtex adrenal definitivo. Ademais, alterações no processo apoptótico, promovendo sobrevida celular nessa região, podem ser a causa da proliferação neoplásica, principalmente nos casos brasileiros em que a mutação *TP53-R337H* está

presente, pois a apoptose eleva o pH intracelular desestabilizando o domínio de tetramerização deste gene causando perda da função supressora de tumor (DIGIAMMARINO et al., 2002; ROSATI et al., 2008).

1.3. Apoptose

Apoptose ou morte celular programada é um importante processo fisiológico necessário para a manutenção da composição celular nos órgãos e tecidos, bem como para remoção de células autorreativas e células que estão completando o seu ciclo de vida (VERMEULEN et al., 2005; WHITE e McCUBREY, 2001).

O equilíbrio fino entre apoptose e mitoses é responsável por regular o crescimento de um tecido, benigno ou maligno. Logo, as vias pró e antiapoptóticas controlam esse processo mantendo a homeostase. Quando há um desequilíbrio em favor do prolongamento da sobrevivência celular, há promoção do processo de carcinogênese que ocorre após uma série de eventos que fazem alterações moleculares e tornam a célula com fenótipo maligno. Alguns agentes carcinogênicos agem diminuindo a taxa de morte celular ao invés de aumentarem sua proliferação.

A apoptose se refere à iniciação e à execução de eventos intracelulares com gasto de energia que resulta em suicídio celular, sendo ela distinta de outras formas de morte celular e rigidamente controlada por meio da evolução. É marcada por uma série ordenada de marcos bioquímicos e por eventos morfológicos incluindo encolhimento celular, formação de projeções de membrana citoplasmática, condensação, fragmentação da cromatina nuclear e fragmentação celular em corpos apoptóticos como vistos na figura 2 (BATISTA et al., 2005;

REED, 2000; VERMEULEN et al., 2005). Exemplos de mortes não apoptóticas consistem em necrose, na qual as células morrem por insulto externo e senescência em que a célula expira quando atinge o fim de sua capacidade de replicação. Ao contrário da morte por necrose, a apoptose não provoca inflamação ou resposta imune.

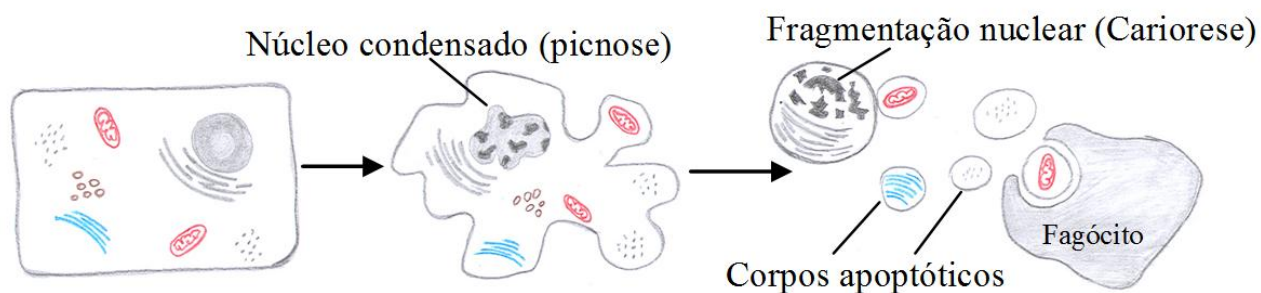


Figura 2. Ilustra as alterações na morfologia celular ao sofrer apoptose

Há duas razões para a célula sofrer apoptose: primeiramente, a morte celular é necessária para o desenvolvimento normal de um órgão ou tecido; segundo, ela é importante para destruir células errantes que impõem uma ameaça ao organismo, eliminando as que sofreram mutações genéticas e que poderão se tornar cancerosas (KUSHLINSKII et al., 2002). Existe uma série de genes que regulam a apoptose, entre eles estão as famílias: *BCL2*, *CASPASES* e *TNF* (VERMEULEN et al., 2005).

1.3.1. Famílias de genes responsáveis pela apoptose

1.3.1.1. CASPASES

CASPASES ("*cystenil, aspartate specific proteasis*") são membros de uma família de moléculas efetoras na via apoptótica. Chamadas assim por serem proteases de cisteína que clivam seletivamente proteínas na porção C-terminal destinado aos resíduos de aspartato. Elas têm alvos específicos como as proteínas da lâmina nuclear e o citoesqueleto, provocando a morte celular. Existem pelo menos 14 CASPASES que são sintetizadas como proenzimas e ativadas pela proteólise em 2 ou 3 locais, formando uma subunidade grande e uma pequena (VERMEULEN et al., 2005). Uma CASPASE madura é um heterotetrâmero composto de 2 subunidades grandes e 2 pequenas, sendo ativadas pela clivagem no resíduo conservado do ácido aspártico (JOHNSON, 1998; REED, 2000; WHITE e McCUBREY, 2001).

White e McCubrey (2001) propuseram um modelo no qual CASPASES são ativadas sequencialmente por outras. A cascata começa com a ativação do "iniciador" (*CASP 8* ou *9*) que ativa o "amplificador" (*CASP 1*) e, por sua vez ativa, os "efetores" (*CASP 3, 6* e *7*). Uma vez ativadas, as caspases efetoras degradam, através de proteólise, as proteínas celulares vitais, levando a célula a morte. Os substratos específicos das caspases incluem as proteínas estruturais como actina e lamina nuclear, proteínas reguladoras como a proteína-quinase dependente de DNA e inibidores da deoxiribonuclease (VERMEULEN et al., 2005). A proteólise celular causada pelas caspases efetoras resultam em alterações morfológicas e bioquímicas características da apoptose. As CASPASES são ativadas por 2 vias, por meio dos receptores de morte (FAS e TNF) ou pela via mitocondrial (família BCL2), conhecidos

também como via extrínseca e intrínseca (Figura 3), respectivamente (REED, 2000; VERMEULEN et al.,2005).

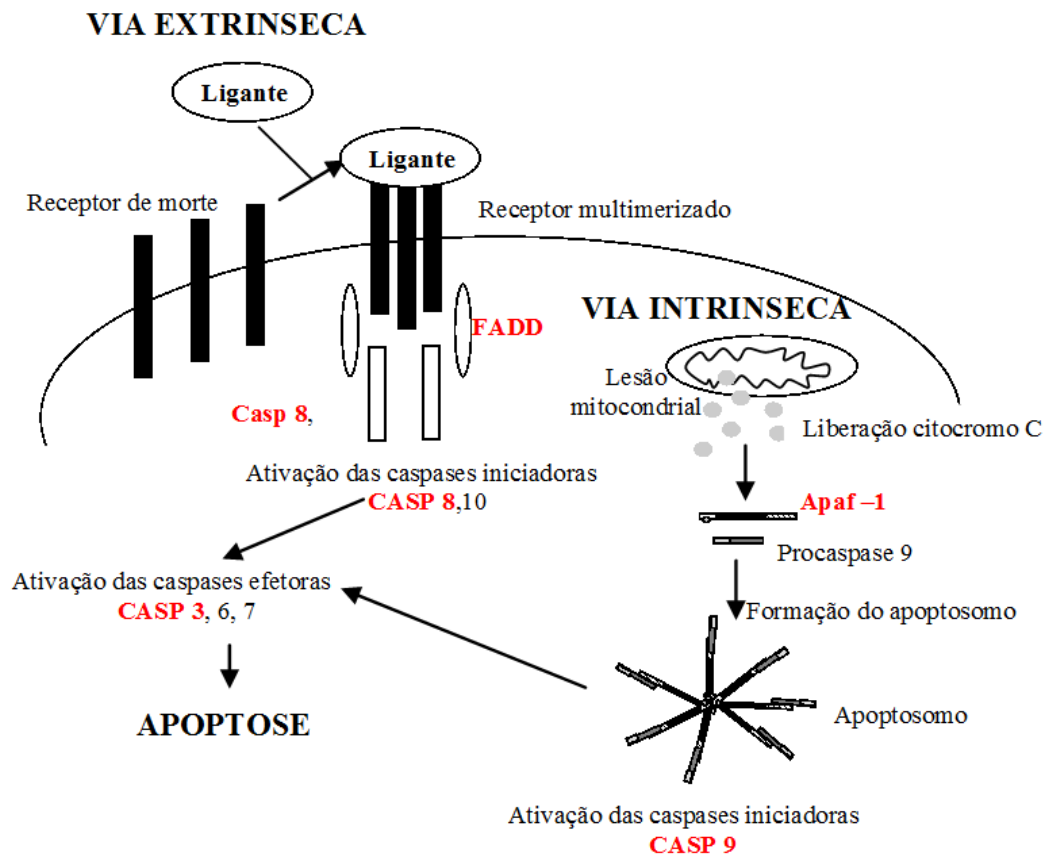


Figura 3. Esquema mostrando a via intrínseca e extrínseca da apoptose e a ativação das caspases. (Baseado em HAJRA e LIU, 2004)

1.3.1.2. *BCL2*

BCL2 ("B-Cell Lymphoma/Leukemia 2") é um oncogene celular que codifica proteínas capazes de inibirem a apoptose, demonstrando resistência à morte programada e a drogas citotóxicas. A família *BCL2* de proteínas citoplasmáticas é a reguladora chave da

cadeia interna (mitocondrial) da indução a apoptose. O protótipo dessa família é o proto-oncogene *BCL2* identificado na quebra cromossômica t(14;18) do linfoma folicular humano. O efeito do *BCL2* é promover a sobrevivência celular (JOHNSON, 1998).

Existem no mínimo 20 membros da família de proteínas BCL2 que compartilham homologia em pelo menos duas das quatro áreas conservadas (BH1 – BH4), os quais podem promover sobrevivência (*BCL2*, *BCLX_L*, *MCL1*, *A1*) ou apoptose (*BAX*, *BAK*, *BAD*, *BCLX_S*, *BIK*, *BID*). A família BCL2 de proteínas é capaz de registrar uma variedade de estímulos positivos e negativos e integrá-los para determinar se a via apoptótica mitocondrial está ligada ou desligada (JOHNSON, 1998; WHITE e McCUBREY, 2001; VERMEULEN et al., 2005). Entre esses estímulos apoptóticos estão - privação de fator de crescimento/neurotrofina, hipóxia, radiação, drogas anti-câncer, oxidantes e excesso de Ca^{2+} (REED, 2000).

Na iniciação da via intrínseca da apoptose, o BAX libera citocromo C pela mitocôndria que se liga ao APAF1 ("*apoptotic protease activating factor -1*"), este forma complexo oligomerizado que acopla na PROCASPASE 9 e facilita o trans-processamento do zimógeno da CASPASE 9 via mecanismo de indução de proximidade. Ao contrário da CASPASE 8 - que é clivada e a enzima ativa fica livre no citoplasma - a CASPASE 9 precisa estar conectada ao APAF1 (apoptosomo) para sua atividade completa, e seu pro-domínio N-terminal é retido. Sabe-se ainda que a transcrição do BAX é indiretamente regulada pelo *TP53*, provendo, assim, uma conexão importante deste supressor de tumor com a via de apoptose (REED, 2000).

A apoptose também pode ser iniciada por uma ação extra-celular de mensageiros nomeados ligantes da morte. Estes se ligam aos receptores de superfície da célula, chamados de receptores da morte, os quais ativam o sinal intra-celular de eventos que começam a cascata apoptótica.

1.3.1.3. TNF/NGF

Os receptores do FAS e do TNF (Fator de Necrose Tumoral) são os dois receptores de morte mais bem caracterizados, componentes da superfamília TNF/NGF que inclui também TRAIL e TRAMP. Essa família é caracterizada por sítios ricos em cisteína em seu extracelular e uma sequência conservada citoplasmática chamada de área da morte. Seus ligantes correlatos são respectivamente o FASL e o TNF. A ativação do *FAS* pelo FASL está envolvida no mecanismo de ativação de células T citotóxicas e células NK contra células cancerosas e infectadas por vírus (KUSHLINSKII et al., 2002). É importante também em modular a resposta imune pela deleção periférica de células T ativadas. Assim, mutações no *FAS* podem levar a desordens imunes. O FASL liga três moléculas de FAS resultando em um trímero que é ajudado pela tendência de domínio de morte e associa-se entre si. Esse grupo de domínio de morte (DD) de FAS associa-se como uma proteína adaptadora chamada FADD ("*Fas-associated death domain*"), a qual se liga por intermédio de seu próprio DD. O FADD contém um segundo domínio chamado de DED ("*death effector domain*"), responsável pelo recrutamento da PROCASPASE 8 por meio dos domínios DED presentes em sua proenzima (VERMEULEN et al., 2005). PROCASPASE 8 sofre clivagem própria e ativação seguindo seus oligômeros no complexo protéico FAS-associado. Isso, por sua vez, ativa os efetores de CASPASES levando a célula a apoptose, como descrito anteriormente (WHITE e McCUBREY,2001).

O receptor de TNF também sinaliza para a ativação de CASPASES das proteínas adaptadoras de morte, mas o TNF, sozinho, raramente induz apoptose, talvez devido à

intervenção de caminhos antiapoptóticos como NF κ B, JNK e fosfatidilinositol 3-kinase (PI3K) (WHITE e McCUBREY, 2001).

O FADD tem como função central ligar a família TNF às caspases. Estudos demonstram a inabilidade do TNF, FAS e outros receptores de morte em ativar CASPASES na ausência do FADD.

1.3.1.4. NF κ B

NF κ B foi primeiramente descrito como uma proteína nuclear promotora da transcrição das cadeias leves de imunoglobulina em células B e, subsequentemente, foi demonstrado mediar sinais de sobrevivência que protegem contra apoptose na maioria das células (apesar de poder ser proapoptótico em alguns casos). O mecanismo pelo qual NF κ B promove a sobrevivência celular é devido, em parte, à indução de transcrição de um número de genes antiapoptóticos, como os membros da família BCL2 (A1/BFL1, BCLX_L e NRL3), proteínas de transdução do sinal do receptor de morte (TRAF1 e TRAF2), inibidores de apoptose (c-IAP1, c-IAP2 e X-IAP), fatores de transcrição (*MYCC* e *TP53*). A inibição da translocação nuclear de NF κ B aumenta o assassinato celular apoptótico pelo TNF, radiação ionizante, superexpressão de oncoproteínas ou pelo agente quimioterápico daunorubicina (WHITE e McCUBREY, 2001).

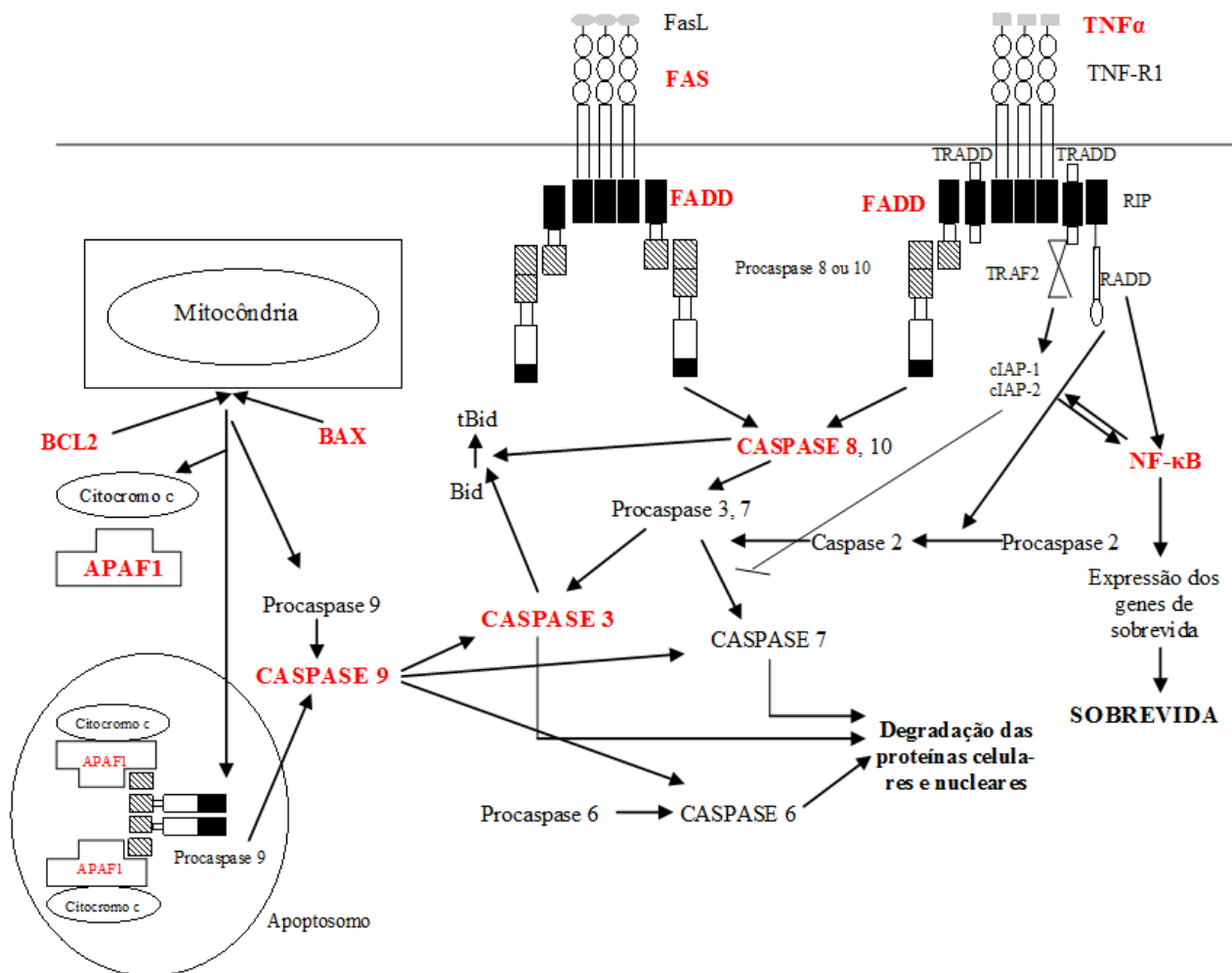


Figura 4. Dois passos importantes de ativação de CASPASES, um envolvendo os receptores de morte (FAS e TNF) e outro a mitocôndria (BCL2). (Baseado em VERMEULEN et al., 2005)

2. Justificativa

Tumores adrenais são neoplasias raras na infância, representando um grande desafio a oncologistas, patologistas e profissionais de saúde que lidam com essa patologia, pois ainda não existem métodos seguros para diferenciar adenomas de carcinomas. Isso torna difícil a decisão terapêutica e a informação prognóstica, já que, para tumores benignos, a realização de somente ressecção cirúrgica com margens é curativa e, em tumores malignos, além da ressecção, é necessária a quimioterapia agressiva e mesmo, com esta terapêutica, a sobrevida é baixa nos dias de hoje.

Devido a sua baixa incidência, poucos estudos têm sido conduzidos na tentativa de definir marcadores moleculares associados ao grau de malignidade. Sabe-se que a hipo/hiperexpressão de genes participantes da via apoptótica na célula neoplásica pode promover uma maior sobrevida, mantendo assim, células mutadas ou cancerígenas ainda em replicação. Entretanto, esse mecanismo não tem sido bem estudado em tumores adrenais.

O estudo dos genes associados a essa via podem ser importantes, não só por promover novos "*insights*" no mecanismo de crescimento e invasão tumoral, como também, por possibilitar definição de marcadores fidedignos para orientar decisão terapêutica.

3. Objetivos

- Caracterizar o perfil de expressão dos genes *CASPASE 3*, *8* e *9*, *FAS*, *FADD*, *TNFA*, *NFKB*, *BCL2*, *BAX* e *APAF1* em tumores adrenocorticais em pacientes menores de 18 anos.
- Analisar a associação entre os valores de expressão e as variáveis clínicas e biológicas: idade, tamanho e peso do tumor, presença da mutação *TP53-R337H*, estadiamento e evolução clínica.
- Avaliar o valor prognóstico do grau de expressão dos genes analisados nos pacientes com tumores adrenocorticais.

4. Materiais

Foram admitidos para diagnóstico e tratamento no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) durante o período de janeiro de 1991 a julho de 2007, 29 pacientes menores de 18 anos. Desses, foram analisadas amostras de tecido tumoral a fresco microdissecado, obtido de ressecção cirúrgica de 22 pacientes pediátricos e armazenadas no banco de tumores do Departamento de Puericultura e Pediatria do HC-FMRP-USP. Sete pacientes foram excluídos do estudo, 4 por não possuírem amostra armazenada e 3 devido à má qualidade da amostra após microdissecção (excesso de tecido necrótico e fibrose).

Os dados clínicos dos pacientes analisados estão descritos na tabela 2; os valores hormonais dos pacientes pré e pós cirurgia, na tabela 3, a expressão dos genes estudados, nos anexos 1 e 2.

Tabela 2 - Descrição dos dados clínicos dos pacientes com tumor de adrenal analisados

Paciente	Sexo	Cor	Idade (meses)	Peso Tumor (g)	Tamanho Tumor (cm ³)	Estadamento	Mutação TP53-R337H	Clínica	Metástases	Quimioterapia	Óbito	Sobrevivida (meses)
1	F	B	5	153	175,5	II	Sim	Virilização	Não	Não	Não	39
2	F	B	144	53	157,5	I	Não	Cushing	Não	Não	Não	65
3	F	B	84	3,3	1,8	I	Não	Virilização	Não	Não	Não	128
4	F	B	101	580	1008	III	Sim	Virilização	Não	Não	Sim	81
5	F	B	23	39	51,66	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	41
6	F	B	102	380	544	IV	Sim	Virilização	Sim	Sim	Sim	2
7	F	B	28	377	810	II	Sim	Virilização	Não	Sim	Não	122
8	F	B	21	20	31,68	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	14
9	F	B	16	35	75	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	106
10	F	NB	137	2350	3300	IV	Não	Dado não disponível	Sim	Sim	Sim	54
11	F	B	96	230	365,75	IV	Sim	Virilização	Sim	Não	Sim	15
12	F	NB	22	10	9	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	220
13	F	B	65	351	720	IV	Sim	Virilização /Cushing	Sim	Sim	Sim	15
14	F	B	36	16	26,87	II	Sim	Virilização	Não	Não	Não	109
15	M	NB	33	828	2025	IV	Sim	Cushing	Sim	Sim	Sim	7
16	M	B	20	60	69,3	IV	Sim	Virilização	Sim	Sim	Não	149
17	M	B	12	40	53,75	I	Não	Virilização	Não	Não	Não	132
18	M	B	25	80	150,69	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	190
19	M	B	11	25,9	47,25	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	163
20	M	B	180	703	1120	IV	Sim	Cushing	Sim	Sim	Sim	9
21	F	B	39	15	36	I	Não	Virilização	Não	Não	Não	23
22	M	B	33	28,5	50,96	I	Sim	Virilização	Não	Não	Não	75

Tabela 3 – Valores hormonais dos pacientes pré e pós cirúrgicos.

<i>Pacientes</i>		<i>Idade</i>	<i>17OH</i>	<i>Androstenediona</i>	<i>Cortisol</i>	<i>DHEAS</i>	<i>Testosterona</i>
1	Pré	5m	204	442	11,5	121	180,5
	Pós			5,6	9,8	<3,9	<10
2	Pré	12a	28,4	80,2	13,9	9,6	38,3
	Pós			77	7,9	95,9	49,2
3	Pré	7a	60	67,2	12	37	220
	Pós			14,4	28,8	<3,9	10
4	Pré	8a 5m	256	4838	10,8	4640	728
	Pós		26	286		280	24,8
5	Pré	1a 11m		523,9		294,4	211
	Pós		63,9	<3,9	5,7	<3,9	20,8
6	Pré	8a 6m		31	23,2	6	26,3
	Pós				5,4	<3,9	27
7	Pré	2a 3m	453	1173	7,5	1440	120
	Pós		12,5	5,7	6,1	<3,9	<10
8	Pré	1a 9m	114,3	114,2		183	275,5
	Pós		<3,9	2,6		<3,9	<10
9	Pré	1a 4m	191	563,3	12	>5000	273
	Pós			21,5	3,9	<3,9	<10
10	Pré	11a 5m					
	Pós			24	2,2	<3,9	<10
11	Pré	7a 11m					
	Pós			<3,9	<1,2	<3,9	27,5
12	Pré	1a 8m	46	110,8	11,2	165	34
	Pós			13,2	1,7	<3,9	<8
13	Pré	5a 5m	550	216,9	35	1673	88,8
	Pós			27,7		139	40,6
14	Pré	3a	129	175	14,4	390	235
	Pós			21		<3,9	<10
15	Pré	2a 9m	614	1055		621	59,8
	Pós		116	66,9		5,5	60,8
16	Pré	1a 5m	184	176		1040	
	Pós			70,3		<3,9	
17	Pré	11m	200	658	7,4	450	500
	Pós			9,6	3,5	<3,9	<10
18	Pré	2a 1m	75,3	214	9,6	1080	138,7
	Pós		63,6	41	30,4	38	<10
19	Pré	10m	1980	665	7,3	1160	569
	Pós			14,1	2,3	<3,9	<10
20	Pré	15a 4m		326,4		287	
	Pós					103,6	
21	Pré	3a 3m	427	220		408	128
	Pós		15	<3,9	6,3	<3,9	<10
22	Pré	2a 8m	237	316		658	872
	Pós		<3,9	10,7		<3,9	<10

5. Métodos

5.1. Coleta de Amostras e Microdissecção

As amostras de adrenal foram coletadas em criotubo na ressecção cirúrgica, sendo imediatamente colocadas em nitrogênio líquido e depois estocadas.

Antes de a amostra ser processada, foi realizada microdissecção pelo Departamento de Patologia da FMRP-USP para retirada de tecido normal e necrótico garantindo, dessa forma, que o material estudado seja somente tumoral.

5.2. Extração do RNA, DNA e Proteína

Previamente ao início do processo de extração, as amostras foram pesadas e aliquotadas entre 5 e 20mg de tecido adrenal. A extração foi realizada por meio de colunas utilizando o *RNA/DNA/ Protein Purification Kit*[®] (Cat. #23500; Norgen, Canada) conforme orientação do fabricante.

O DNA e RNA de cada amostra foram quantificados em fotômetro.

Para a verificação da integridade do RNA obtido, cada amostra foi submetida à eletroforese em gel de agarose 1%. E o DNA foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% (ANEXO 3).

5.3. cDNA

A construção do DNA complementar (cDNA) foi realizada por transcrição reversa por meio da enzima Superscript II (ANEXO 3). O cDNA obtido foi, então, submetido à amplificação por PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR).

5.4. PCR quantitativa em tempo real (RQ-PCR)

Para quantificar a expressão desses genes foi realizada análise utilizando-se a técnica de reação de cadeia de polimerase em tempo real (RQ-PCR) em um instrumento ABI7700 (Applied Biosystems) por monitorização contínua de fluorescência pelo SYBR Green ou sonda TaqMan (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante (ANEXO 3). As condições finais para a reação de RT-PCR foram as que se seguem: desnaturação inicial a 94°C por 4 minutos e pareamento a 60°C por 2 minutos, seguido de 38 ciclos de desnaturação a 94°C, pareamento a 60°C e extensão a 72°C por 1 minuto cada, seguidos de um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Foram construídas curvas-padrão para a quantificação relativa da expressão de cada um dos genes estudados. Para elaboração das curvas de calibração (curvas-padrão) foram amplificadas em quadriplicata o cDNA derivado de tecido adrenal obtido de criança com tumor de Wilms para cada um dos genes *CASPASE 3*, *8 e 9*, *FAS*, *TNFA*, *NFKB* e *BCL2*, com eficiências de 0,9 a 1,1.

Os *primers* gene-específicos *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *BCL2*, *NFKB*, e *TNFA* utilizados foram construídos com base nas sequências descritas no *blast*

(www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/) e ensembl (www.ensembl.org) através do programa oligo3, sintetizados pela Invitrogen, e analisados por SYBR Green e curva de dissociação (tabela 4). Para os genes *FADD* (HS00538709_m1), *BAX* (HS99999001_m1), e *APAF1* (HS00559441_m1), foram utilizadas sondas TaqMan (Applied Biosystems).

Tabela 4 - Sequência dos genes *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *BCL2*, *NFKB*, *TNFA* e *GUS*.

<i>Gene</i>	<i>Sequência</i>
<i>CASP3</i> sense <i>antisense</i>	GGTATCCATGGAGAACACTGAA GAGTCCATTGATTTCGCTTCC
<i>CASP8</i> sense <i>antisense</i>	TTGCAAGAGGAAATCTCCAAA TCCAGCAGGTCCATGTCATCATC
<i>CASP9</i> sense <i>antisense</i>	CTGTTCAGGCCCATATGAT CTGGCCTGTGTCCTCTAAGC
<i>FAS</i> sense <i>antisense</i>	GCATCTGGACCCTCCTACCT CCAATCCCTTGGAGTTGATG
<i>TNFA</i> sense <i>antisense</i>	CTCTTCTGCCTGCTGCACTT GCCAGAGGGCTGATTAGAGA
<i>BCL2</i> sense <i>antisense</i>	ATGTGTGTGGAGAGCGTCAA GCCGTACAGTTCCACAAAGG
<i>NFKB</i> sense <i>antisense</i>	CCACGACTTGTAGGAAAGG CTGGATGCGCTGACTGATAG
<i>GUSB</i> sense <i>antisense</i>	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT CCGAGTGAAGATCCCCCTTTTA

O cálculo da expressão dos genes foi realizado por análise do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Para todas as reações foi utilizado tecido adrenal de paciente com tumor Wilms como calibrador, exceto para os genes *FADD*, *BAX* e *APAF1*, nos quais utilizada a linhagem leucêmica K562, devido a não expressão desses genes pelo tecido adrenal utilizado. O gene *GUSB* foi utilizado como gene de referência interna. As diferenças na quantidade de cDNA total adicionada a cada reação foram normalizadas utilizando-se o gene *GUSB* como controle interno.

5.5. Sequenciamento

Utilizando o DNA em que o processo de extração e quantificação já foi descrito, realizamos o sequenciamento do gene *TP53* à procura da mutação *R337H* no exon 10.

De acordo com as instruções do fabricante, as amostras foram purificadas com Kit Wizard PCR Preps DNA Purification System[®] (Promega, Madison, WI) e sequenciadas por PCR assimétrico usando o ABI-Prism[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit em um sequenciador ABI Prism 377 DNA sequencer Apparatus (Perkin-Elmer Corporation), foram usados os primers 5'-CTG AGG CAC AAG AAT CAC-3'(sense) e 5'-TCC TAT GGC TTT CCA ACC-3' (antisense) (SANDRINI et al., 2005).

Os cromatogramas e sequências foram analisados com os *softwares* ABI Sequence Analysis v.3.3 e Chromas v.2.33 (Technelysium Pty Ltd / www.technelysium.com.au, Queensland, Australia), respectivamente.

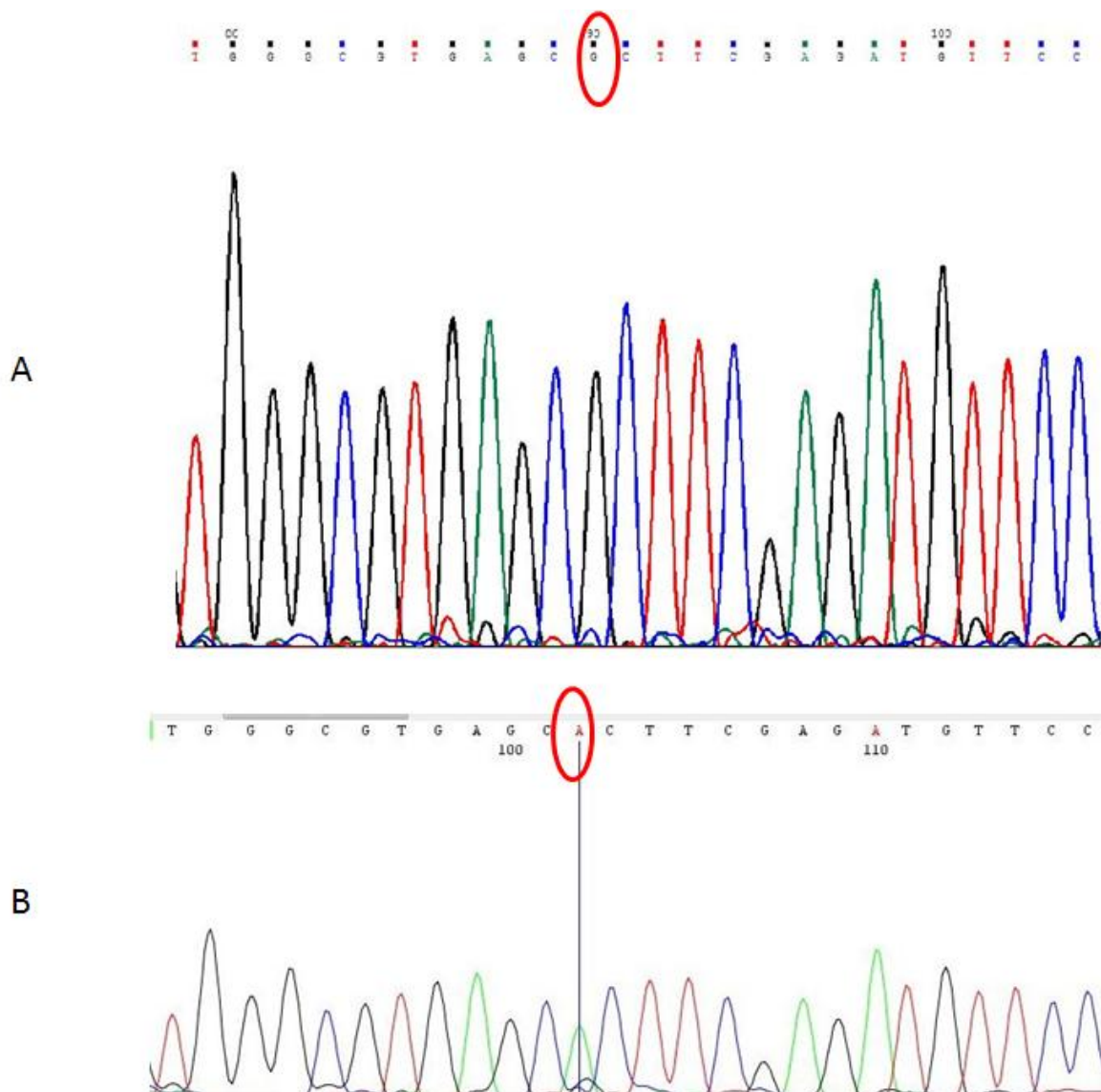


Figura 5. Sequenciamento do gene *TP53* exon 10, (A) sequência selvagem, (B) mutação TP53R337H.

6. Análise estatística

Análise estatística foi realizada com auxílio dos *softwares* GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) e SPSS 15.0 (SPSS Inc. Chicago, USA). A associação entre as variáveis analisadas (idade, tamanho e peso do tumor, presença da mutação *TP53-R337H*, estadiamento e evolução clínica) e os níveis de expressão gênica foi

avaliada utilizando-se o teste de Mann-Whitney. Sobrevida global, considerada da data do diagnóstico até data do óbito ou do último retorno, foi analisada por curvas de Kaplan-Meier e comparadas pelo teste log-rank para as diferentes variáveis analisadas. A correlação entre os genes estudados foi analisada pelo teste de correlação de Spearman. Valores de $p \leq 0.05$ serão considerados como significantes.

7. Resultados

7.1. Variáveis clínicas e laboratoriais

A idade dos pacientes estudados variou entre 5 e 180 meses, com uma média de 53 meses e mediana de 33 meses. Pacientes classificados como estadio I/II apresentaram média e mediana de idade menor (33,2 e 23 meses, respectivamente) que os pacientes classificados como estadios III/IV (66,7 e 96 meses, respectivamente). Dos 22 pacientes estudados, 15 (68,2%) eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino (31,8%), com relação de 2,1:1.

O peso tumoral das amostras variou de 3,3 a 2350g (média 289,89g) e o volume de 1,8 a 3300 cm³ (média 492,26 cm³), sendo que 13/22 (59,1%) tinham peso do tumor menor que 100g e 15/22 (68,2%) tinham volume do tumor menor que 200cm³. Quanto à classificação histológica, 15 pacientes foram classificados como carcinomas, 3 como adenomas e em 4 não foi possível a diferenciação histopatológica precisa. Dos 22 pacientes 7 (31,8%) apresentavam metástases ao diagnóstico e 4 recidivaram, sendo estes inicialmente classificados como estadio III/IV. Quanto ao estadiamento: 11/22 (50%) foram classificados

como estadio I, 3/22 (13,64%) como estadio II, 1/22 (4,54%) como estadio III e 7/22 (31,82%) como estadio IV. Dezoito pacientes apresentaram sintomas de virilização, sendo 17 com virilização apenas e 1 associado a sintomas de hipercortisolismo; 3 pacientes apresentaram Síndrome de Cushing isolada e, em um dos pacientes, não foi possível a caracterização precisa dos sintomas. Devido ao número reduzido de pacientes no grupo com ausência de virilização, não foi possível a realização de análise estatística para essa variável. A mutação do gene *TP53-R337H* foi encontrada em 17/22 (77,27%) pacientes.

O tempo de seguimento dos pacientes em remissão clínica variou de 14 a 220 meses, com mediana de 90 meses. Óbito ocorreu em 7/22 pacientes (31,8%), todos classificados como estadio III/IV, nestes o tempo de sobrevida variou de 2 a 81 meses, com uma mediana de 15 meses. Sobrevida global em 5 anos foi de 64,6% no grupo total de pacientes analisados, sendo 100% para pacientes estadios I/II e 25% para pacientes estadios III/IV ($p < 0,0001$) (Figura 6)

Ao analisarmos as variáveis clínicas em relação à sobrevida global em 5 anos, verificamos uma associação significativa em relação à idade (92,5% para os menores de 5 anos e 37,5% para os maiores de 5 anos, $p: 0,001$), peso (100% para tumores menores que 100g e 29,6% para tumores maiores que 100g, $p < 0,001$) e tamanho (93,3% para tumores menores que 200cm^3 e 28,6% para tumores maiores 200cm^3 , $p < 0,001$). As curvas de sobrevida são mostradas nas figuras 7, 8 e 9.

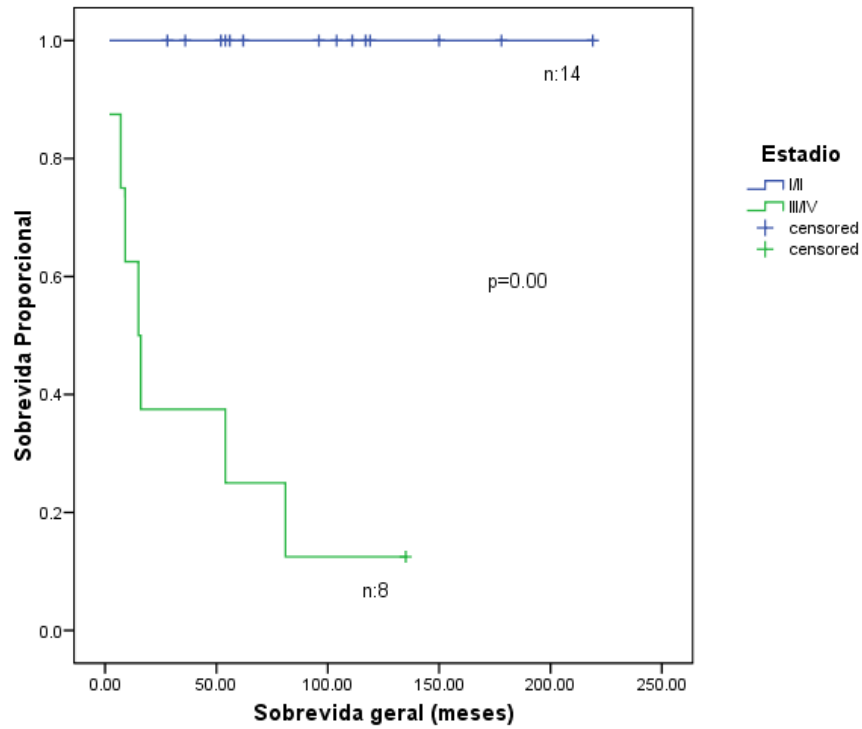


Figura 6. Sobrevida geral x estadiamento. Devido ao tamanho relativamente pequeno da amostra os pacientes foram agrupados em estadios I/II e III/IV.

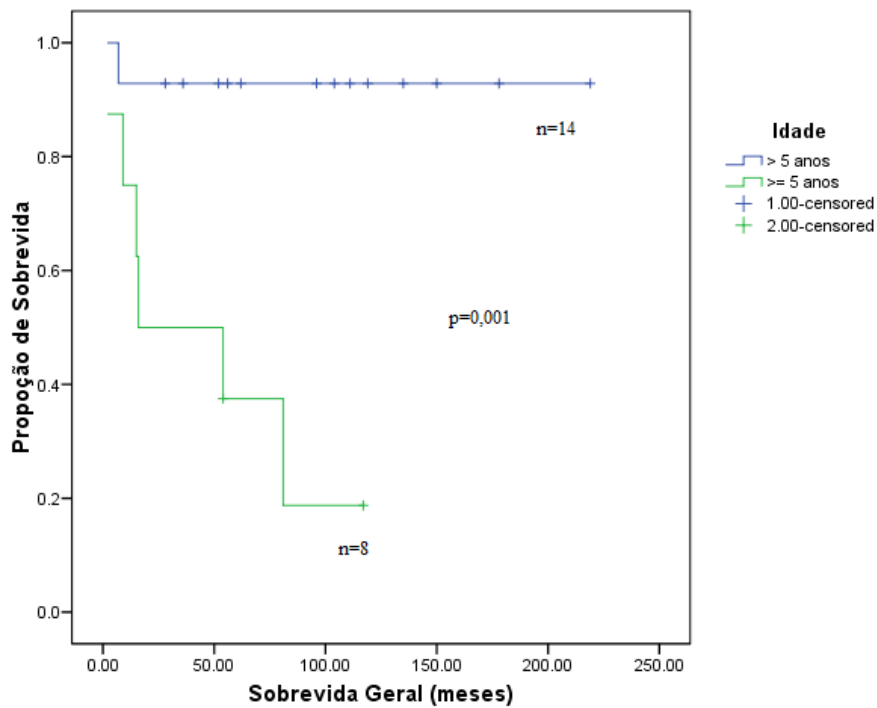


Figura 7. Sobrevida geral x idade do paciente maior ou menor de 5 anos.

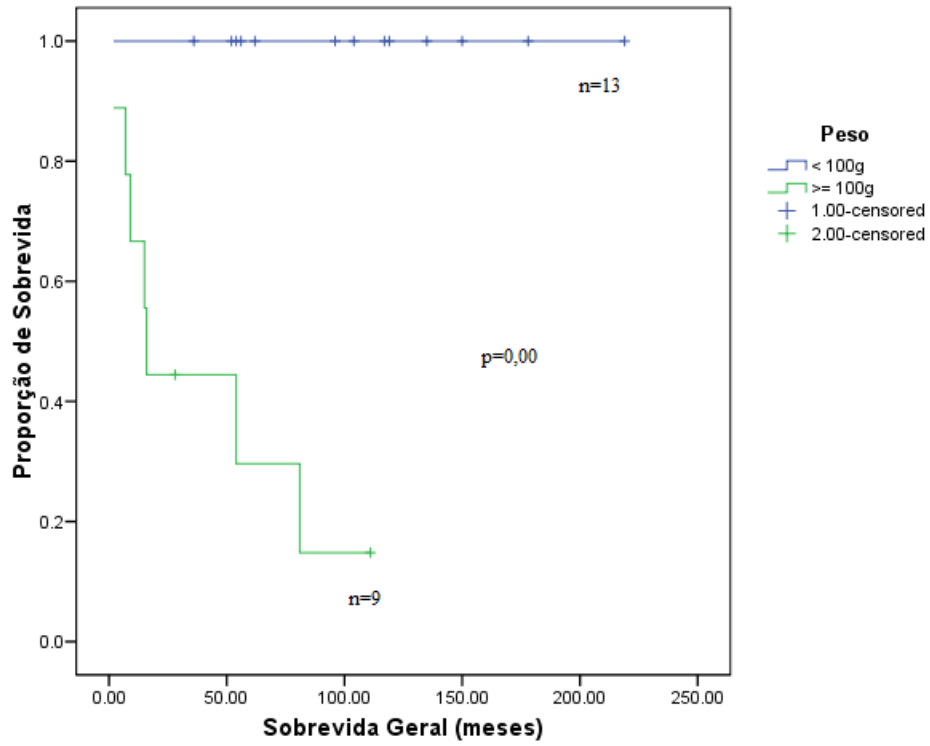


Figura 8. Sobrevida geral x peso do tumor maior ou menor que 100 gramas.

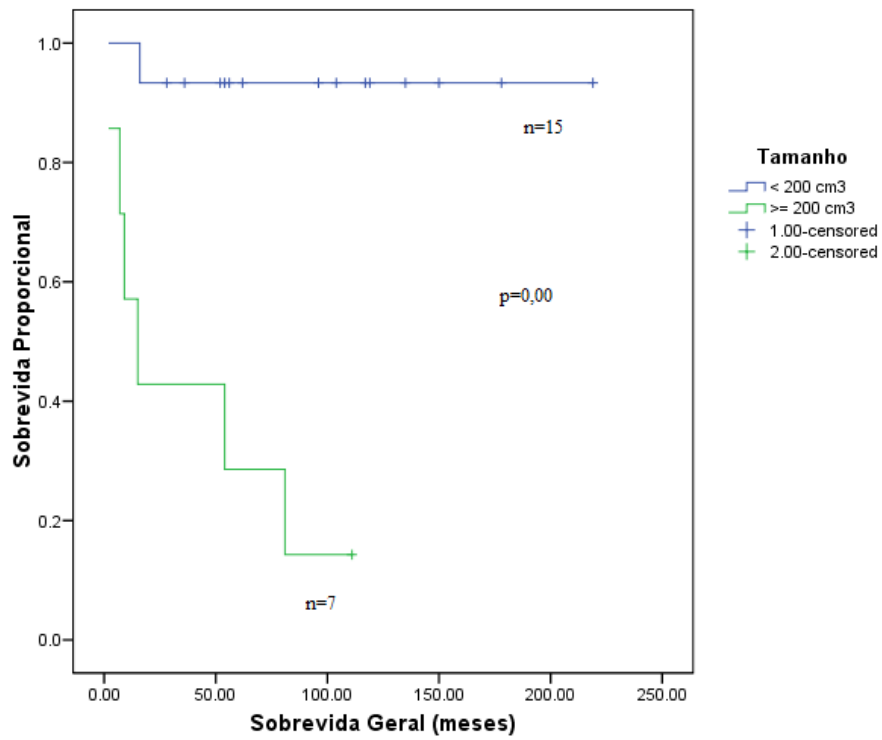


Figura 9. Sobrevida geral x volume do tumor maior ou menor que 200 cm³.

7.2 – Expressão gênica

Os valores relativos de expressão dos genes analisados são mostrados na tabela 5.

TABELA 5 - Valores de expressão relativa dos genes estudados para cada paciente.

<i>Paciente</i>	<i>CASP3</i>	<i>CASP8</i>	<i>CASP9</i>	<i>BAX</i>	<i>APAF1</i>	<i>TNFA</i>	<i>FAS</i>	<i>FADD</i>	<i>BCL2</i>	<i>NFKB</i>
1	0,33	1,16	0,78	1,65	0,44	0,75	0,78	0,33	5,27	1,31
2	2,13	0,58	0,20	1,82	0,32	169,48	26,08	0,47	0,04	3,17
3	0,59	2,09	2,53	2,57	2,25	117,78	30,27	0,71	3,17	1,61
4	0,11	0,04	0,01	0,00	0,00	26,45	0,22	0,00	0,00	0,29
5	0,05	0,22	0,75	0,90	0,27	2,18	0,68	0,48	0,94	1,33
6	1,23	0,00	0,68	1,16	0,31	0,01	0,73	0,80	0,11	1,53
7	0,35	0,01	1,36	0,34	0,52	0,47	0,46	0,18	0,78	1,06
8	0,62	0,15	1,41	1,05	0,24	9,95	0,13	0,21	0,38	4,52
9	0,97	0,53	0,46	1,05	0,18	0,03	0,36	0,27	2,89	0,31
10	0,35	0,51	3,18	0,96	0,23	0,09	1,16	0,07	0,00	4,92
11	1,10	0,60	0,56	0,44	0,00	0,00	5,74	0,03	0,00	2,50
12	0,29	0,52	0,18	0,09	0,06	306,55	0,07	0,01	0,00	0,03
13	0,09	0,28	1,65	0,55	0,35	0,03	2,05	0,33	0,01	1,35
14	11,67	0,03	0,37	0,60	0,28	0,58	2,87	0,47	19,70	0,33
15	0,00	3,78	1,12	0,32	1,51	N/A*	18,19	0,39	0,00	0,26
16	2,86	1,60	0,96	0,27	0,44	0,03	0,83	0,55	1,11	1,13
17	0,64	0,00	1,68	1,08	0,23	7,86	1,45	0,93	14,12	2,96
18	0,29	1,29	1,45	0,55	0,00	724,08	0,22	0,19	0,00	0,91
19	1,07	0,16	2,02	0,20	0,02	0,01	0,30	0,05	0,00	0,12
20	1,25	3,08	2,27	1,99	1,06	0,02	10,89	0,57	1,31	2,25
21	0,69	0,53	0,37	0,31	0,08	0,00	0,73	0,08	0,01	1,35
22	37,01	0,03	0,66	1,42	0,30	1,42	19,09	0,16	107,26	0,62

*N/A – não avaliado

7.2.1 - Genes Pró-Apoptóticos (*CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *BAX*, *FADD*, *FAS*, *TNFA* e *APAF1*)

Usando o teste de Mann-Whitney evidenciamos associação entre valores de expressão menores para o gene *FAS* e idade menor de 5 anos ($p=0,05$)(Figura 10).

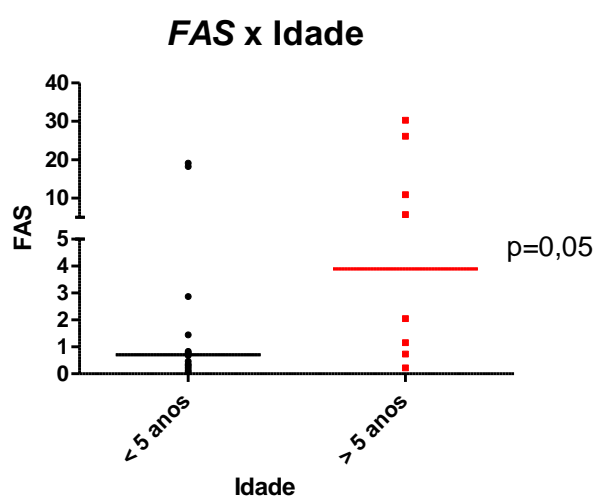


Figura 10. Expressão relativa do gene *FAS* x idade maior ou menor de 5 anos.

Expressão do gene *TNFA* esteve significativamente associada ao estadió clínico. Pacientes classificados como estadios I/II apresentaram valores de expressão significativamente maiores que aqueles classificados como estadios III/IV ($p=0,03$). Pacientes classificados como estadió IV apresentaram valores de expressão gênica significativamente menor do que aqueles classificados como estadios I, II e III ($p=0,008$), o inverso também foi observado com pacientes classificados como estadió I, apresentando valores de expressão significativamente maiores que os pacientes classificados como estadios II, III e IV ($p=0,04$) (Figuras 11 e 12).

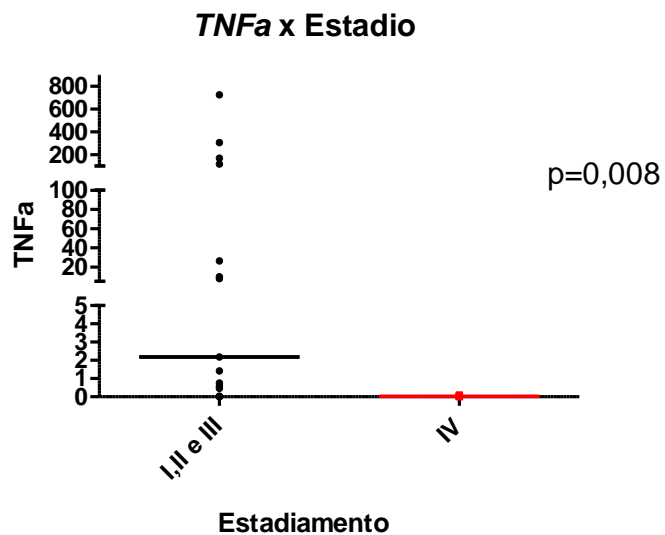


Figura 11. Expressão relativa do gene *TNFA* x estadio IV.

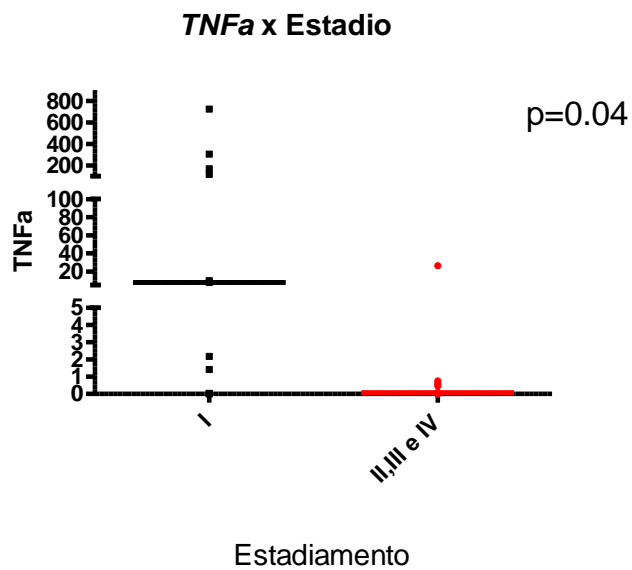


Figura 12. Expressão relativa do gene *TNFA* x estadio I.

Os valores mínimo, máximo e mediano dos genes pró-apoptóticos analisados em associação às diferentes variáveis clínico-laboratoriais estudadas e respectivos valores de significância estatística são apresentados no anexo 1.

7.2.2 - Genes Anti-Apoptóticos (*BCL2* e *NFKB*)

Foi encontrada uma associação significativa entre menores valores de expressão do gene *BCL2* e a ocorrência de óbito ($p=0,03$), além de valores menores de expressão do gene *NFKB* com idade >5 anos ($p=0,02$) e ainda presença da mutação *TP53-R337H* ($p=0,007$) (figuras 13, 14 e 15).

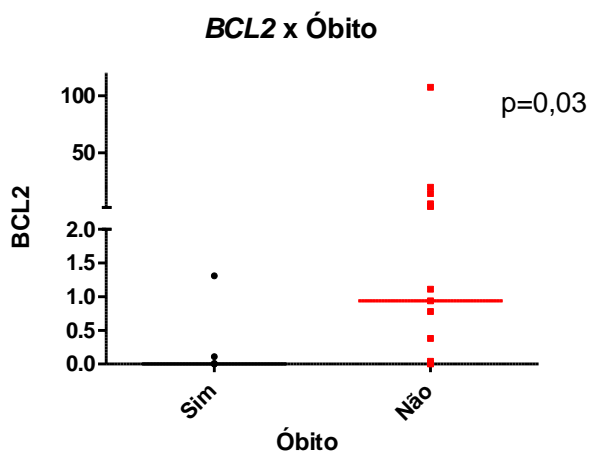
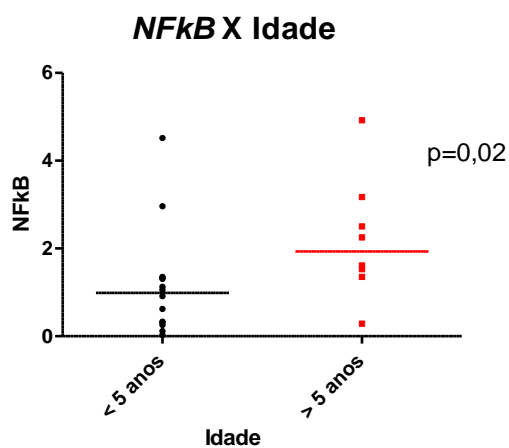


Figura 13. Expressão relativa do gene *BCL2* x ocorrência de óbito.



7.3 – Expressão gênica e sobrevida global

Os níveis de expressão gênica acima ou abaixo do valor mediano de expressão e sua associação com sobrevida global em 5 anos estão apresentados na tabela 6. Os pacientes que apresentaram valores de expressão do *BCL2* acima da mediana apresentaram uma sobrevida global em 5 anos significativamente maior do que aqueles com valores de expressão abaixo da mediana (0,91 versus 0,53, $p=0,03$). (Figura 16)

Tabela 6 - Nível de expressão dos genes e sua associação com sobrevida global em 5 anos.

Gene	Nível de Expressão	Sobrevida Global	P valor
<i>CASP3</i>	< mediana	70,1±14,7%	0,73
	> mediana	72,7±13,4%	
<i>CASP8</i>	< mediana	71,6±14%	0,74
	> mediana	72,7±13,4%	
<i>CASP9</i>	< mediana	81,8±11,6%	0,67
	> mediana	62,3±15%	
<i>BAX</i>	< mediana	72,7±13,4%	0,84
	> mediana	70,1±14,7%	
<i>APAF1</i>	< mediana	79,5±13,1%	0,47
	> mediana	63,6±14,5%	
<i>TNFA</i>	< mediana	53,0±15,5%	0,20
	> mediana	90,9±8,7%	
<i>FAS</i>	< mediana	90,9±8,7%	0,20
	> mediana	54,5±15%	
<i>FADD</i>	< mediana	80,8±12,2%	0,44
	> mediana	63,6±14,5%	
<i>BCL2</i>	< mediana	53,0±15,5%	0,03
	> mediana	90,9±8,7%	
<i>NFKB</i>	< mediana	90,9±8,7%	0,11
	> mediana	50,9±16,3%	

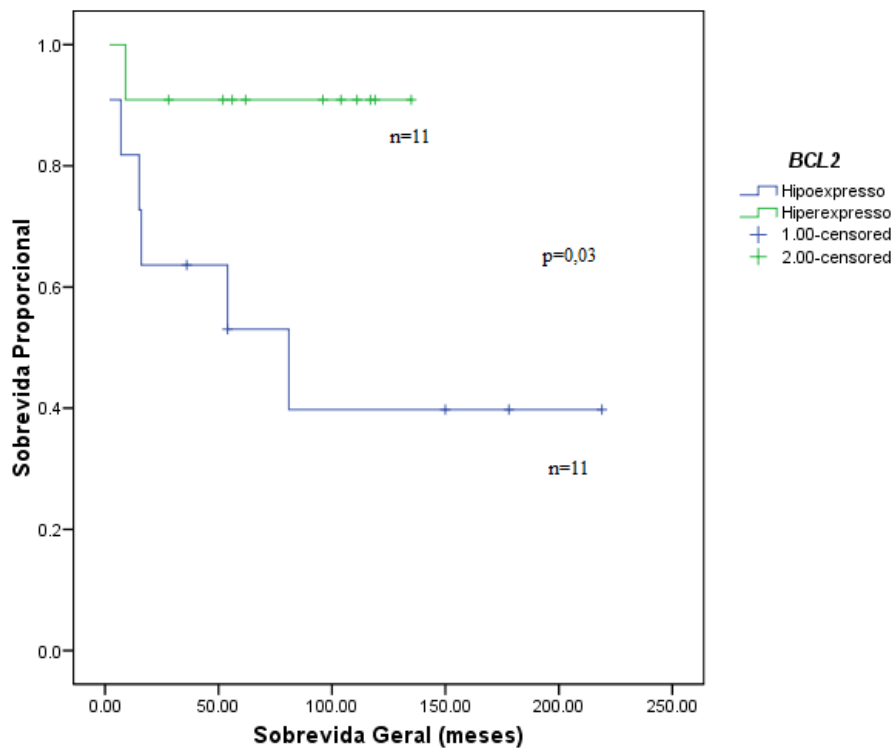


Figura 16. Sobrevida global x expressão do gene *BCL2* abaixo (hipoexpresso) ou acima (hiperexpresso) do valor mediano de expressão.

7.4- Correlação entre expressão dos genes estudados

A correlação entre os níveis de expressão dos genes estudados é mostrada na tabela 7.

Interessante salientar uma correlação positiva e estatisticamente significativa entre os genes *BAX*, *FAS*, *NFKB*, *FADD* e *APAF1* nas amostras de tumores adrenais analisadas.

Tabela 7. Correlação entre os genes estudados de acordo com o teste de Spearman

		<i>CASP3</i>	<i>CASP8</i>	<i>CASP9</i>	<i>FAS</i>	<i>BCL2</i>	<i>TNFA</i>	<i>NFKB</i>	<i>BAX</i>	<i>FADD</i>	<i>APAF1</i>
<i>CASP3</i>	CC	1.000	-.126	-.160	.366	.460(*)	-.360	.193	.321	.203	.067
	Sig.	.	.577	.477	.093	.031	.109	.390	.145	.366	.766
<i>CASP8</i>	CC	-.126	1.000	.177	.286	-.189	.001	.007	.073	.086	.271
	Sig.	.577	.	.431	.196	.400	.996	.976	.745	.702	.223
<i>CASP9</i>	CC	-.160	.177	1.000	.189	.097	-.137	.377	.361	.318	.352
	Sig.	.477	.431	.	.400	.668	.554	.084	.099	.149	.108
<i>FAS</i>	CC	.366	.286	.189	1.000	.364	-.174	.358	.545(**)	.465(*)	.592(**)
	Sig.	.093	.196	.400	.	.095	.451	.102	.009	.029	.004
<i>BCL2</i>	CC	.460(*)	-.189	.097	.364	1.000	.073	.135	.631(**)	.600(**)	.482(*)
	Sig.	.031	.400	.668	.095	.	.753	.548	.002	.003	.023
<i>TNFA</i>	CC	-.360	.001	-.137	-.174	.073	1.000	-.094	.147	.025	-.034
	Sig.	.109	.996	.554	.451	.753	.	.687	.525	.915	.884
<i>NFKB</i>	CC	.193	.007	.377	.358	.135	-.094	1.000	.585(**)	.354	.170
	Sig.	.390	.976	.084	.102	.548	.687	.	.004	.106	.449
<i>BAX</i>	CC	.321	.073	.361	.545(**)	.631(**)	.147	.585(**)	1.000	.605(**)	.483(*)
	Sig.	.145	.745	.099	.009	.002	.525	.004	.	.003	.023
<i>FADD</i>	CC	.203	.086	.318	.465(*)	.600(**)	.025	.354	.605(**)	1.000	.661(**)
	Sig.	.366	.702	.149	.029	.003	.915	.106	.003	.	.001
<i>APAF1</i>	CC	.067	.271	.352	.592(**)	.482(*)	-.034	.170	.483(*)	.661(**)	1.000
	Sig.	.766	.223	.108	.004	.023	.884	.449	.023	.001	.

CC – Coeficiente de correlação; *significante a nível de 0,05; ** significante a nível de 0,01

Sig – Significância (bi-caudal)

8 - Discussão

Este estudo se propôs a analisar a presença de correlação entre valores de expressão dos genes relacionados a apoptose *CASP3*, *CASP8*, *CASP9*, *FAS*, *BCL2*, *BAX*, *APAF1*, *TNFA* e *NFKB* e as características clínico-biológicas de tumores adrenocorticais da infância.

Quando verificamos a caracterização da população estudada em relação a dados como idade e sexo, observamos uma idade média de aparecimento da doença de 53 meses, com predomínio em crianças do sexo feminino (2,1:1). Esses achados são semelhantes aos descritos na literatura, na qual se observa uma média de idade entre 27 - 80 meses e o predomínio do sexo feminino (1,5:1) (TEINTURIER et al., 1999; CIFTCI et al., 2001; MICHALKIEWICZ et al., 2004; SANDRINI et al., 2004; SBRAGIA et al., 2005). Em relação ao estadiamento, encontramos em nossa amostra predomínio de pacientes com doença limitada, sendo 14/22 (63,6%) pacientes classificados como estádios I/II. Esses dados são concordantes com aqueles publicados pelo *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPACTR) em que foi descrita presença de doença em estádios I/II em 192/254 (72%) pacientes estudados (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

Encontramos uma associação significativa entre peso maior que 100g e tamanho maior que 200 cm³ com prognóstico desfavorável. De forma semelhante ao encontrado em nosso trabalho, essa associação tem sido descrita em várias séries de casos como fatores prognósticos independentes, e por esse motivo, os parâmetros referidos foram incorporados como critérios de estadiamento. Classificações baseadas nesse tipo de estadiamento têm mostrado um valor prognóstico melhor quando comparadas às classificações histopatológica (SANDRINI et al., 1997; MICHALKIEWICZ et al., 2004; TUCCI JR et al., 2005; DEHNER e HILL, 2009).

Os pacientes avaliados neste estudo apresentaram um predomínio de virilização (77,27% dos casos). Já a síndrome de Cushing e alterações hormonais mistas corresponderam a 13,64% (3/22) e 4,54% (1/22) dos casos respectivamente. Em um dos pacientes não foi possível determinar a forma de apresentação. De forma similar ao encontrado em nossa casuística, presença de virilização tem sido descrita como a forma de apresentação clínica mais frequente em tumores adrenocorticais da infância (MICHALKIEWICZ et al., 2004).

Observamos uma idade média maior (66,7 meses) em pacientes com estadios mais avançados (III/IV) quando comparados aos pacientes classificados como estadios I/II (33,2 meses). Esse fato poderia estar associado a um comportamento biológico mais agressivo em crianças maiores ou estar associado à demora na detecção dos sintomas pela família ou equipe médica, o que poderia levar a um maior desenvolvimento do tumor em tamanho, com posterior invasão e disseminação.

Em nossa série, presença de idade inferior a 5 anos foi um importante fator associado a um bom prognóstico. A associação entre idade e prognóstico tem apresentado resultados controversos até o momento. De forma análoga ao encontrado em nosso trabalho, Michalkiewicz et al., em seu estudo com 254 pacientes encontraram uma maior sobrevida em crianças menores de 3 anos. Ainda, Sabbaga et al. demonstraram que pacientes com idade inferior a 2 anos apresentam sobrevida de 83% comparada com 45% para os maiores de 2 anos de idade (MICHALKIEWICZ et al., 2004; SABBAGA et al., 1993). Resultados discordantes foram descritos por Hanna et al., em sua série com 23 pacientes e Sbragia et al., com 33 casos, que não encontraram diferença prognóstica em relação à idade (SBRAGIA et al., 2005; HANNA et al., 2008).

Quanto à sobrevida geral dos pacientes estudados, encontramos uma sobrevida em 5 anos de 64,6% dos pacientes, sendo melhor em pacientes classificados como estadios I/II (100%) e desfavorável em pacientes com estadios III/IV (25%). Esses resultados são

semelhantes aos descritos em outros serviços no Brasil e no mundo (SANDRINI et al., 1997; MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005; PIANOVSKI et al., 2006; HANNA et al., 2008; DEHNER e HILL, 2009).

Nos casos estudados, encontramos a mutação *TP53-R337H* em 77,3% dos pacientes, fato já esperado uma vez que eram procedentes de uma região do país descrita como tendo uma alta prevalência de tumores adrenais com a presença dessa mutação. Em estados brasileiros como São Paulo (localidade onde se encontra nosso hospital e procedência da maioria de nossos pacientes), Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul a referida mutação é encontrada em uma frequência de aproximadamente 1:300 indivíduos (0,3%), sendo muito maior do que o estimado para outras mutações do *TP53* (ACHATZ et al., 2009). Estudos prévios demonstram uma frequência de 78 - 97% dessa mutação específica nos tumores analisados, o que é compatível com os dados obtidos neste presente estudo, sendo esses valores encontrados somente em casuísticas brasileiras (PINTO et al., 2004; SANDRINI et al., 2005).

Esses resultados clínico-laboratoriais tomados em conjunto demonstram que a amostra estudada se comporta de maneira muito semelhante ao descrito para esse tipo de neoplasia em outras regiões do país.

Regulação de vias que controlam a proliferação e a sobrevivência celular é indispensável para o estabelecimento de todos os tipos de neoplasia. Comparadas a tecidos normais, células neoplásicas são altamente sensíveis a sinais apoptóticos e sobrevivem somente porque adquiriram mecanismos que previnem ou que impedem a morte celular (HANAHAN e WEINBERG, 2000). Em neoplasia de córtex adrenal, o processo de apoptose pode estar intimamente ligado a sua origem, pois na suprarrenal esse processo é inerente à formação embrionária do órgão, o qual sofre apoptose maciça logo após o nascimento do

indivíduo. Ainda, as alterações no mecanismo de sobrevivência celular podem promover carcinogênese.

Em nosso estudo, a análise da expressão de genes relacionados ao processo de apoptose em crianças com tumores adrenocorticais mostrou associação com parâmetros clínico-laboratoriais desses pacientes.

O gene *BCL2*, que codifica uma proteína da membrana externa mitocondrial, a qual bloqueia a morte apoptótica em algumas células, encontrou-se hiperexpresso nos casos que obtiveram maior sobrevivência geral. Resultados contraditórios para expressão de *BCL2* e sobrevivência têm sido descritos para diferentes tipos de neoplasias humanas. Em carcinomas de mama, tumores que apresentam maior expressão de *BCL2* têm sido associados a um melhor prognóstico (VAN SLOOTER et al., 1996; KYMIONIS et al., 2001; CALLAGY et al., 2006; KRÖGER et al., 2006; CALLAGY et al., 2008; NADLER et al., 2008), resultados semelhantes também têm sido descritos em carcinomas esofágicos e cervicais (CHANG et al., 2005; DIMITRAKAKIS et al., 2000; OHBU et al., 1997) e leucemias linfóides agudas da infância (MATA et al., 2010, no prelo). Em outras neoplasias como doença de Hodgkin, carcinomas de próstata e testiculares, a associação é oposta, estando os maiores valores de expressão associados a um prognóstico desfavorável (EID et al., 1998; GARCIA et al., 2003; KESHGEGIAN et al., 1998).

Alguns mecanismos de ação foram propostos para a presença de *BCL2* em tumores de estágios iniciais e sua associação com melhor prognóstico. Lu et al. sugeriram que o *BCL2* somente seria necessário em estágios iniciais de carcinomas, pois, com acúmulo de alterações, ele perderia a sua ação na progressão tumoral tornando-se negativamente selecionado (LU et al., 1996). Outras teorias apontam que tumores indiferenciados dependem de outros caminhos pró-sobrevivência e que a diminuição da expressão do *BCL2* seria somente um marcador de agressividade, mais do que um mecanismo associado à biologia ou ainda que

a predisposição ao bom prognóstico não está associado a sua função anti-apoptótica, mas sim a sua inibição do crescimento celular ou à sua relação com diferentes fatores transcricionais (CALLAGY et al., 2008; NADLER et al., 2008). DiVito et al. demonstraram que a expressão do BCL2 em melanoma parece ser semelhante ao receptor de estrogênio em câncer de mama, em que o receptor de estrogênio promove o crescimento tumoral, mas está associado a melhor sobrevida geral. Os autores descreveram também que terapêuticas que atingem o receptor de estrogênio nestes casos promovam uma sobrevida ainda melhor, sugerindo o fato que talvez o mesmo acontecer com a proteína BCL2 (DIVITO et al., 2004).

Estudando o gene *TNFA*, encontramos uma associação significativa entre hipoexpressão do gene e classificação como estadio IV ($p=0,008$). Ademais, hiperexpressão e classificação com estadio I ($p=0,04$), fato que provavelmente se explique por meio da função pró-apoptótica desse gene. O *TNFA* tem sido descrito como capaz de exercer efeitos positivos e negativos em neoplasias humanas (BALKWILL, 2009). Mikhaylova et al. demonstraram que os níveis de *TNFA* regulam a esteroidogênese, apoptose e viabilidade celular em uma linhagem de células adrenocorticais (NCI-H295R) e que tal efeito é tempo e dose-dependente na esteroidogênese e na viabilidade celular. Em células de córtex adrenal fetal humano, *TNFA* suprimiria a produção de esteróide induzido por ACTH e a expressão de genes de enzimas esteroidogênicas. Ele atuaria, de forma dose dependente, aumentando apoptose e diminuindo a viabilidade celular (MIKHAYLOVA et al., 2007). A propriedade do *TNFA* de induzir apoptose também foi descrita em outros tipos de câncer humanos (MIKHAYLOVA et al., 2007, BALKWILL, 2009).

As evidências do aumento da expressão do gene *TNFA* está associado a um maior grau de apoptose, poderia explicar o fato de a sua hipoexpressão estar associada a estadios mais avançados, e sua hiperexpressão associada à estadiamento I.

NFKB é uma família de fatores de transcrição que é ativada em muitas neoplasias humanas. A ativação do *NFKB* classicamente tem sido descrita como capaz de induzir a expressão de resposta por intermédio de proteínas anti-apoptóticas, o que resultaria em aumento da proliferação, inibição da apoptose, estimulação da invasão e angiogênese, e resistência a radioterapia e quimioterapia (WATSON et al., 2009). Outros trabalhos, no entanto tem descrito o fato de, em alguns tumores, o gene *NFKB* poder atuar também como gene pró-apoptótico. Esse efeito pró-apoptótico se daria por meio da indução do gene *TP53*, o qual regularia a apoptose celular, ligando-se diretamente aos elementos promotores e ativando a transcrição de um número de genes reguladores da apoptose, incluindo a ativação do gene *NFKB* e o aumento da apoptose via genes pró-apoptóticos *BAX*, *FAS/FASL* e *APAF1* (ROYDS et al., 1998; RYAN et al., 2000; LI et al., 2002; FERRIS et al., 2007; STIEWE, 2007; COTTER, 2009).

TP53 também foi demonstrado inibindo diretamente a ativação da transcrição do *BCL2* pela direta interação do *TP53* com a proteína bloqueadora da apoptose, Brn-3A. Estudo com carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço demonstrou risco aumentado dessa neoplasia associada a polimorfismo do *BAX* entre heterozigotos para *TP53*, indicando que uma menor expressão do gene *BAX* poderia promover risco aumentado de carcinoma de células escamosas (CHEN et al., 2007). Outro estudo em câncer de cólon, também sugere que o *TP53* regularia positivamente o gene *BAX* e possivelmente reprimiria transcricionalmente a proteína anti-apoptótica BCL2. Este estudo evidenciou que as células tratadas com noscarpina obtiveram acúmulo de *TP53* em uma maneira dependente de tempo, acompanhado por aumento nos níveis de *BAX* (ANEJA et al., 2007). Entretanto, outros artigos com tumores de células germinativas em criança e carcinoma de células escamosas do seio maxilar não demonstraram correlação com significância estatística entre expressão do *BAX* e mutação *TP53* (BANDO et al., 2002; ADDEO et al., 2007).

Na nossa série de pacientes encontramos associação positiva significativa em tumores com mutação do *TP53* e hipoexpressão do gene *NFKB* ($p=0,008$), o que com base nos dados de literatura descritos acima, apotam que a ação do *NFKB* em tumores adrenocorticais da criança seja regulada pelo gene *TP53*. Para os genes *BAX*, *FAS* e *APAF1*, que seriam ativados pelo *NFKB*, apesar de apresentarem menores valores de expressão em amostras com mutação do gene *TP53*, estes valores não foram estatisticamente significantes ($p=0,07$, $p=0,14$ e $p=0,71$ respectivamente). Por outro lado, quando analisamos a correlação entre *NFKB* e os genes *BAX*, *FAS* e *APAF1* utilizando o teste de correlação de Spearman, uma correlação estatisticamente significativa entre eles foi encontrada (*NFKB* e *BAX* ($p=0,004$), *FAS* ($p=0,009$) e *APAF1* ($p=0,02$)), o que pode sugerir uma ativação conjunta desses genes, o que reforçaria a associação do gene *TP53* e os genes acima em tumores adrenocorticais da infância. Acreditamos que a discrepância entre os resultados obtidos pelos testes de Mann-Whitney e o de correlação de Spearman possa estar relacionada ao número relativamente pequeno de casos analisados.

Os dados relacionados à expressão de caspases em diferentes neoplasias humanas têm se mostrado controversos. Expressão de *CASP3* foi apontada por alguns estudos como um importante fator prognóstico em leucemia linfóide aguda (LLA) e leucemia mielóide aguda (LMA) de adultos com características opostas. Em LLA de adultos a alta expressão da proteína *CASP3* correlacionou-se com remissão completa (FADERL et al., 1999) em contraste com pacientes adultos com LMA, em que a alta expressão de *CASP3* esteve associada a prejuízo da apoptose e menor sobrevida (OLIVER et al., 2002). Em crianças com LLA, estudos realizados, utilizando-se citometria de fluxo (MEYER et al., 2006; LIU et al., 2002), não encontraram associação entre ativação da proteína *CASP3* isoladamente nem resposta ao tratamento.

Os níveis de expressão de *CASP8* apresentam grande variação entre os vários tipos de câncer. Em câncer de próstata, a proteína *CASP8* encontra-se fortemente expressa (DREWA et al., 2006). Regulação negativa da expressão desta caspase é frequentemente observada em linhagens celulares de câncer de mama (YANG et al., 2007). Ao contrário do que ocorre com células de neuroblastoma que se caracterizam pela deficiência de *PROCASPASE 8* (BORRIELO et al., 2002), a perda da expressão de *CASP8* tem sido reportada apenas em alguns casos de meduloblastomas (16%), em que apresenta correlação significativa com prognóstico desfavorável (FULDA et al., 2006; PINGOUD-MEIER et al., 2003).

Avaliando-se conjuntamente as caspases 3, 8 e 9 por *immunoblotting*, Svingen et al. (2000) verificaram que os níveis de procaspases -3, -8 e -9 mostraram-se altamente variáveis entre as amostras de medula óssea de adultos com LLA e LMA e que os níveis mensurados desses polipetídeos não mostraram correlação com fatores prognósticos ou com resposta à terapia de indução. Não existe, pelo que tomamos conhecimento, nenhum estudo relacionado à expressão das caspases em tumores adrenocorticais da criança.

Nesta presente pesquisa não encontramos nenhuma relação significativa entre a expressão das diferentes caspases e as variáveis estudadas.

Dados demonstram expressão reduzida de receptor *FAS* em carcinomas, apesar de o *FAS* ligante (*FASL*) estar aumentado. Na verdade, a capacidade de sofrer apoptose está diminuída em carcinomas adrenocorticais (WOLKERSDÖRFER et al., 1996). Tumores que expressam *FASL* incluem neoplasias de diversos tipos histológicos como neoplasias hematopoéticas, melanoma, carcinomas e gliomas. A expressão do *FASL* pelas células cancerígenas pode promover uma forma pela qual elas conseguem escapar da triagem imune. Para sobreviverem, a apoptose as células tumorais devem ser resistentes ao seu próprio *FASL*. Isso é alcançado através de mutações no gene receptor do *FAS*, por cancelamento ou por bloqueio da via apoptótica, ou ainda por diminuição da expressão do *FAS*.

Ausência de expressão do gene *FAS* tem sido associada à progressão de alguns tipos de câncer. Diversos estudos têm sugerido que a hipoexpressão do gene *FAS* esta associada à estadios mais avançados de doença em pacientes com leucemia linfóide aguda e carcinomas pulmonar, uroendotelial, e pancreático (KOOMÄGI e VOLM, 1999; BERNSTORFF et al., 2002; MASS et al., 2004;; SUMINOE et al.,2004; YAMANA et al., 2005). Alguns estudos, no entanto, sugerem a associação entre a elevação do *FAS* sérico a adenocarcinomas pancreáticos e neoplasia intraductal papilar mucinosa além de elevação da expressão da proteína *FAS* em focos de lesão precursora do câncer colorretal (KEARNEY et al., 2009; WALTER et al., 2009). Wolkersdorfer et al. descrevem que a imunoreatividade do *FAS* é menor em carcinomas adrenocorticais do que em tecidos corticais normais (WOLKERSDÖRFER et al., 2005).

Neste presente estudo encontramos uma associação entre maior expressão do gene *FAS* e pacientes com idade maior que 5 anos ($p=0,05$) e também um maior valor de expressão deste gene em pacientes classificados como grau IV, porém sem significância estatística ($p=0.09$).

Em suma, a análise de um número maior de casos é necessária para confirmação dos nossos achados e para uma melhor definição do papel desses genes na gênese e prognóstico dos tumores adrenocorticais da infância.

9 - Conclusões

- Os padrões de expressão de alguns dos genes envolvidos no processo apoptótico avaliados pelo presente estudo estiveram associados significativamente a características clínicas e/ou laboratoriais em crianças e adolescente com tumores adrenocorticais, especialmente hipoexpressão do gene *TNFA* com estadio IV e hipoexpressão do gene *NFKB* com presença de mutação *TP53-R337H*.
- Valores de expressão acima da mediana para o gene *BLC2* estiveram associados significativamente a maior sobrevida global em 5 anos nos pacientes participantes do estudo.

10. Referências

ADDEO R, CRISCE S, D'ANGELO V, VINCENZI B, CASALE F, PETTINATO G, DONOFRIO V, BOLDRINI R, ALAGGIO R, COLLINI P, BERTORELLE R, DI TULLIO MET, CARAGLIA M, TEREZIANI M, LO CURTO M, INDOLFI P. Bax mutation and overexpression inversely correlate with immature phenotype and prognosis of childhood germ cell tumors. **Oncology Reports**, v.17, p. 1155-1161, 2007.

ACHATZ MIW, HAINAUT P, ACHTON-PROLLA P. Highly prevalent *TP53* mutation predisposing to many cancers in Brazilian population: a case for newborn screening? **The Lancet**, v. 10, p.920-925, Set 2009 (in press).

ACHATZ MI, OLIVIER M, LE CF, MARTEL-PLANCHE G, LOPES A, ROSSI BM, ASHTON-PROLLA P, GIUGLIANI R, PALMERO EI, VARGAS FR, DA ROCHA JC, VETTORE AL, HAINAUT P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Lett.**, v. 245, n. 1-2, p. 96-102, 2007.

ANEJA R, GHALEB AM, ZHOU J, YANG VW, JOSHI HC. p53 and p21 Determine the Sensitivity of Nocapine-Induced Apoptosis in Colon Cancer Cells. **Cancer Res**, v.67, n.8, p.3862-3870, 2007.

BALKWILL F. Tumour necrosis factor and cancer. **Nat Rev Cancer**, v.9, p.361-71, 2009.

BANDO N, HAYASHI T, KISHIBE K, TAKAHARA M, IMADA M, NONAKA S, HARABUCHI Y. Prognostic Value of *p53* Mutations, Bax, and Spontaneous Apoptosis in Maxillary Sinus Squamous Cell Carcinoma. **Cancer**, v.94, n.7, p.1968, 1980, 2002.

BATISTA J, MARTINS AS, MORO L, VASCONCELOS AC. Expressão gênica de caspases 3 e 8 em timo e baço de ratas recém-desmamadas e imunossuprimidas por glicocorticoide. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.57, n.4, p.457-464, 2005.

BERNSTORFF WV, GLICKMAN JN, ODZE RD, FARRAYE FA, JOO HG, GOEDEGEBUURE PS, EBERLEIN TJ. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. **Cancer**, v. 94, p. 2552 – 2560, 2002.

BORRIELLO A, ROBERTO R, DELLA RAGIONE F, IOLASCON A. Proliferate and survive: cell division cycle and apoptosis in human neuroblastoma. **Haematologica**, v.82, v.2, p.196-214, 2002.

CALLAGY GM, PHAROAH PD, PINDER SE, HSU FD, NIELSEN TO, RAGAZ J, ELLIS IO, HUNTSMAN D, CALDAS C. Bcl-2 Is a Prognostic Marker in Breast Cancer Independently of the Nottingham Prognostic Index. **Clin Cancer Res**, v.12, n. 8, p. 2468 – 2475, abril 2006.

CALLAGY GM, WEBER MJ, PHAROAH PD, CALDAS C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. **BMC Cancer**, v.8, n. 153, p. 1 – 10, maio 2008.

CHANG M, LEE H, LEE B, KIM Y, LEE J, KIM W. Differential protein expression between esophageal squamous cell carcinoma and dysplasia, and prognostic significance of protein markers. **Pathol Res Pract**, v. 201, n. 6, p. 417 – 425, 2005.

CHEN K, HU Z, WANG L, SURGIS EM, EL-NAGGAR AK, ZHANG W, WEI Q. Single-nucleotide polymorphisms at the TP53-binding or responsive promoter regions of *BAX* and *BCL2* genes and risk of squamous cell carcinoma of head and neck. **Carcinogenesis**, v.28, n.9, p. 2008-2012, 2007.

CIFTCI AO, SENOCAK ME, TANYEL FC, BÜYÜKPAMUKÇU N. Adrenocortical Tumors. **J Ped Surg**, v. 36, n. 4, p. 549-554, abril 2001.

COTTER TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer**, v.9, p.501-507, 2009.

COULTER CL. Functional biology of the primate fetal adrenal gland: advances in technology provide new insight. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 31, n. 8, p. 475-484, ago. 2004.

COULTER CL. Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 5, p. 235-242, jul. 2005.

DEHNER LP, HILL DA. Adrenal cortical neoplasms in children: why so many carcinomas and yet so many survivors? **Pediatr dev Pathol**, v. 12, n. 4, p. 284 – 291, 2009.

DIGIAMMARINO E,L, LEE AS, CADWELL C, ZHANG W, BOTHNER B, RIBEIRO RC, ZAMBETTI G, KRIWACKI RW. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-

dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nature Structural Biology**, v. 9, n. 1, p. 12 – 16, jan 2002.

DIMITRAKAKIS C, KYMIONIS G, DIAKOMANOLIS E, PAPASPYROU I, RODOLAKIS A, ARZIMANOGLOU I, LEANDROS E, MICHALAS S. The possible role of p53 and *bcl-2* expression in cervical carcinomas and their premalignant lesions. **Gynecol Oncol**, v. 77, p. 129 - 136, 2000.

DIVITO KA, BEGER AJ, CAMP RL, DOLLED-FILHART M, RIMM DL, KLUGER HA. Automated quantitative analysis of tissue microarrays reveals an association between high Bcl-2 expression and improved outcome in melanoma. **Cancer Research**, v. 64, p. 8773-8777, 2004.

DREWA T, WOLSKI Z, SKOK Z, CZAJKOWSKI R, WIŚNIEWSKA H. The FAS-related apoptosis signaling pathway in the prostate intraepithelial neoplasia and cancer lesions. **Acta Pol Pharm**, v.63, n.4, p.311-315, 2006.

EID H, GULYAS M, GECZI L, BODROGI I, INSTITUTE E, BAK M. Expression of *bcl-2* in testicular carcinoma: Correlation with tumor progression and MDR1/Pgp. **Cancer**, v. 83, p. 331 - 336, jul 1998.

FADERL S, THALL PF, KANTARJIAN HM, TALPAZ M, HARRIS D, VAN Q, BERAN M, KORNBLAU SM, PIERCE S, ESTROV Z. Caspase 2 and caspase 3 as predictors of complete remission and survival in adults with acute lymphoblastic leukemia. **Clin Cancer Res.**, v.5, n.12, p.4041-4047, 1999.

FERRIS RL, GRANDIS JR. NF-kappaB gene signatures and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v.13, p.5663-5664, 2007.

FIGUEIREDO BC, SANDRINIR, ZAMBETI GP, PEREIRA RM, CHENG C, LIU W, LACERDA L, PIANOVSKI MA, MICHALKIEWICZ E; JENKINS J, RODRIGUEZ-GALINDO C, MASTELLARO MJ, VIANNA S, WATANABE F, SANDRINI F, ARRAM SBI, BOFFETTA P, RIBEIRO RC. Penetrance of adrenocortical tumors associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, n. 43, p. 91-96, 2006.

FULDA S, POREMBA C, BERWANGER B, HÄCKER S, EILERS M, CHRISTIANSEN H, HERO B, DEBATIN KM. Loss of caspase-8 expression does not correlate with MYCN amplification, aggressive disease, or prognosis in neuroblastoma. **Cancer Res**, v.66, n.20, p.1016-1023, 2006.

GARCIA JF, CAMACHO FI, MORENTE M, FAGA M, MONTALBÁN C, ALVARO T, BELLAS C, CASTAÑO A, DIEZ A, FLORES T, MARTÍN C, MARTINEZ MA, MAZORRA F, MENARGUES J, MESTRE MJ, MOLEJO MANUELA, SAEZ AI, SÁMCHÉZ L, PIRIS MA. Hodgkin and Reed-Sternberg cells harbor alterations in the major tumor suppressor pathways and cell-cycle checkpoints: analyses using tissue microarrays. **Blood**, v.101, n. 2, p. 681 – 689, 2003.

GARRITANO S, GEMIGNANI F, PALMERO EL, OLIVIER M, MARTEL-PLANCHE G, CALVEZ-KELM FL, BRUGIÈRES L, VARGAS FR, RENZO RB, ASHTON-PROLLA P, TAVTIGIAN SV, HAINAUT P, ACHATZ MIW. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat**, 2009 (em vias de publicação).

HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. **Cell**,v.100, n.1, p.57-70, 2000.

HANNA AM, PHAM TH, ASKEGARD-GIESMANN JR, GRAMS JM, IQBAL CW, STAVLO P, MOIR CR. Outcome of adrenocortical tumors in children. **J Ped Surg**, v. 43, p. 843 – 849, 2008.

HAJRA KM, LIU JR. Apoptosis dysfunction in Human Cancer. **Apoptosis**, v. 9, p. 691-704, 2004.

HOUGH AJ, HOLLIFIELD JW, PAGE DL, HARTMANN WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors: a mathematical analysis of clinical morphologic data. **Am J Clin Pathol** v. 72, p. 390-399, 1979.

JOHNSON DE. Regulation of survival pathways by IL-3 and induction of apoptosis following IL-3 withdrawal. **Front Biosci**, v. 15, n. 3, p. 313-324, mar. 1998.

KEARNEY KE, PRETLOW TG, PRETLOW TP. Increased expression of fatty acid synthase in human aberrant crypt foci: Possible target for colorectal cancer prevention. **Int J Cancer**, v. 125, n. 1, p. 249 – 252, fev 2009.

KESHGEGIAN AA, JOHNSTON E, CNAAN A. *bcl-2* oncoprotein positivity and high MIB-1 (Ki-67) proliferative rate are independent predictive markers for recurrence in prostate carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v. 110, p. 443, 1998.

KIRSCHNER LS. Review: Emerging Treatment Strategies for Adrenocortical Carcinoma: A New Hope. **J Clin Endocrinol Metabol**, v. 91,n. 1, p. 14-21, 2006.

KOOMÄGI R e VOLM M. Expression of Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand in lung cancer, its prognostic and predictive relevance. **Int J Cancer**, v.84, n. 3, p. 239-243, Jun 1999.

KRÖGER N, MILDE-LANGOSCH K, RIETHDORF S, SCHMOOR C, SCHUMACHER M, ZANDER AR, LÖNING T. Prognostic and Predictive Effects of Immunohistochemical Factors in High-Risk Primary Breast Cancer Patients. **Clin Cancer Res**, v.12, n. 1, p. 159-168, jan. 2006.

KUSHLINSKII NE, BRITVIN TA, POLYAKOVA GA, ABBASOVA SG, BARONINI AA, TISHENINA RS, MOLCHANOVA GS, SEL'CHUK VYu, PIROGOV DA, BOTAGATYREV OP, LIPKIN VM, KALININ AP. Plasma Content of Soluble Fas Antigen in Patients with Adrenal Tumors and Tumor-Like Pathologies. **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**, v. 134, n. 2, p. 171-174, ago. 2002.

KYMIONIS GD, DIMITRAKAKIS CE, KONSTADOULAKIS MM, ARZIMANOUGLOU I, LEANDROS E, CHALKIADAKIS G, KERAMOPOULOS A, MICHALAS S. Can Expression of Apoptosis Genes, *bcl-2* and *bax*, Predict Survival and Responsiveness to Chemotherapy in Node-Negative Breast Cancer Patients? **J Surg Res**, v.99, p. 161–168, 2001

LI HL, CHEN DD, LI XH, ZHANG HW, LU YQ, YE CL, REN XD. Changes of NF-kB, p53, Bcl-2 and caspase in apoptosis induced by JTE-522 in human gastric adenocarcinoma cell line AGS cells: role of reactive oxygen species. **World J Gastroenterol**, v.8, p.431-435, 2002.

LIU T, RAETZ E, MOOS PJ, PERKINS SL, BRUGGERS CS, SMITH F, CARROLL WL. Diversity of the apoptotic response to chemotherapy in childhood leukemia. **Leukemia**, v.16, n.2, p.223-232, 2002.

LIVAK KS, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and 2^{-DDCT} method. **Methods**, v.45, p 402-408, 2001.

LU QL, ABEL P, FOSTER CS, LALANI EM. *BCL2*: role in epithelial differentiation and oncogenesis. **Hum Pathol** v. 27, p. 102-110, 1996.

MASS S, WARSKULAT U, STEINHOFF C, MUELLER W, GRIMM MO, SCHULZ WA, SEIFERT HH. Decreased Fas expression in advanced-stage bladder cancer is not related to p53 status. **Urology**, v. 63, p. 392 – 397, 2004.

MATA JF, SILVEIRA VS, MATEO EC, CORTEZ MAA, QUEIRÓZ RP, YUNES A, LEE MLM, TOLEDO S, PETRILLI AS, BRANDALISE SR, TONE LG, SCRIDELI CA. Low

mRNA Expression of the Apoptosis-Related Genes *CASP3*, *CASP8* and *FAS* Is Associated with Low Induction Treatment Response in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia (ALL). **Ped Blood Cancer** (*in press*)

MEYER LH, KARAWAJEW L, SCHRAPPE M, LUDWIG WD, DEBATIN KM, STAHNKE K. Cytochrome c-related caspase-3 activation determines treatment response and relapse in childhood precursor B-cell ALL. **Blood**, v.107, n.11, p.4524-4531, 2006.

MESIANO S and JAFFE RB. Role of growth factors in the developmental regulation of the human fetal adrenal cortex. **Steroids**, v. 62, n. 1, p. 62-72, jan. 1997.

MICHALKIEWICZ E, SANDRINI R, FIGUEIREDO B, MIRANDA ECM, CARAN E, OLIVEIRA-FILHO AG, MARQUES E, PIANOVSKI MAD, LACERDA L, CRISTOFANI LM, JENKINS J, RODRIGUEZ-GALINDO C, RIBEIRO R. 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, mar. 2004.

MIKHAYLOVA IV, KUULASMAA T, JÄÄSKELÄINEN J, VOUTILAINEN R. Tumor necrosis factor- α regulates steroidogenesis, apoptosis, and cell viability in human adrenocortical cell line NCI-H295R. **Endocr V**. 148, n. 1, p. 386-392, 2007.

MOORE & PERSAUD. **Embriologia Clínica**. 5. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1998.

NADLER Y, CAMP RL, GILTNANE JM, MOEDER C, RIMM DC, KLUGER HM, KLUGER Y. Expression patterns and prognostic value of Bag-1 and Bcl-2 in breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 10, n. 2, p. 1 – 12, abril 2008.

OHBU M, SAEGUSA M, KOBAYASHI N, TSUKAMOTO H, MIENO H, KAKITA A, OKAYASU I. Expression of *bcl-2* protein in esophageal squamous cell carcinomas and its association with lymph node metastasis. **Cancer**, v. 79,n. 1, p. 1287 - 1293, abril 1997.

OLIVER L, VAVASSEUR F, MAHÉ B, PERRIN P, HAROUSSEAU JL, MEFLAH K, VALLETTE FM. Assessment of caspase activity as a possible prognostic factor in acute myeloid leukaemia. **Br J Haematol.**, v.118, n.2, p. 434-437, ago 2002.

PALMERO EI, SCHULER-FACCINI L, CALEFFI M, ACHATZ MI, OLIVIER M, MARTEL-PLANCHE G, MARCEL V, AGUIAR E, GIACOMAZZI J, EWALD IP, GIUGLIANI R, HAINAUT P, ASHTON-PROLLA P. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett.**, v.261, n.1, p.21-25, 2008.

PIANOVSKI MAD, MALUF EMCP, CARVALHO DS, RIBEIRO R, RODRIGUES-GALLINDO C, BOFFETTA P, ZANCANELLA P, FIGUEIREDO BC. Mortality Rate of adrenocortical Tumors in Children Under 15 Years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer** v. 47, p. 56-60, 2006.

PINGOUD-MEIER C, LANG D, JANSS AJ, RORKE LB, PHILLIPS PC, SHALABY T, GROTZER MA. Loss of caspase-8 protein expression correlates with unfavorable survival outcome in childhood medulloblastoma. **Clin Cancer Res**, v.9, n.17, p.6401-6409, 2003.

PINTO E, BILLERBECK AEC, VILLARES MCBF, DOMENICE S, MENDONÇA BB, LATRONICO AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metab** v. 48, n. 5, p. 647-650, out. 2004.

RATCLIFFE J, NAKANISHI M, JAFFE RB. Identification of definitive and fetal zone markers in human fetal adrenal gland reveals putative development genes. **J Clin Endocrinol Metab** v. 88, n. 7, p. 3272-3277, jul. 2003.

RIBEIRO RC, SANDRINI F, FIGUEIREDO B, ZAMBETTI GP, MICHALKIEWICZ E, LAFFERLY AR, DELACERDA L, RABIN M, CADWELL C, SAMPAIO G, CAT I, STRATAKIS CA, SANDRINI R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 98, p. 9330-9335, 2001.

REED JC. Mechanisms of Apoptosis. **AJP** v. 157, n. 5, p. 1415-1429, nov. 2000.

RODRIGUEZ-GALINDO C, FIGUEIREDO BC, ZAMBETTI GP, RIBEIRO R. Biology, Clinical Characteristics, and Management of Adrenocortical Tumors in Children. **Pediatr Blood Cancer** v. 45, p. 265-273, 2005.

ROSATI R, CERRATO F, DOGHMAN M, PIANOVSKI MAD, PARISE GA, CUSTODIO G, ZAMBETTI GP, RIBEIRO RC, RICCIO A, FIGUEIREDO BC, LALLI E. High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and *IGF2* overexpression is not associated with clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H *TP53* mutation. **Cancer Genet Cytogenet**, v. 186, n. 1, p. 19 – 24, out 2008.

ROYDS JA, DOWER SK, QWARNSTROM EE, LEWIS CE. Response of tumour cells to hypoxia: role of p53 and NFκB. **Mol Pathol**, v.51, p.55-61,1998.

RYAN KM, ERNST MK, RICE NR, VOUSDEN KH. Role of NF-kappaB in p53-mediated programmed cell death. **Nature**, v.404,p.892-897, 2000.

SABBAGA C, AVILLA SG, SCHULZ C, GARBERS JC, BLUCHER D. Adrenocortical carcinoma in children: clinical aspects and prognosis. **J Ped Surg**, V. 28, n. 6, p. 841 – 843, Jun 1993.

SADLER TW. **Langman: Embriologia Médica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005

SANDRINI R, RIBEIRO RC, DELACERDA L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metabol** v. 7, p. 2027-2031, 1997.

SANDRINI F, VILLANI DP, TUCCI S, MOREIRA AC, de CASTRO M, ELIAS LLK. Inheritance of R337H *p53* Gene Mutation in Children with sporadic Adrenocortical Tumor. **Horm Metab Res** v 37, p. 231-235, 2005.

SBRAGIA L, OLIVEIRA-FILHO AG, VASSALLO J, PINTO GA, GUERRA-JUNIOR G, BUSTORFF-SILVA J. Adrenocortical Tumors in Brazilian Children Immunohistochemical Markers and Prognostic Factors. **Arch Pathol Lab Med** v. 129, p. 1127-1131, set. 2005.

SPENCER SJ, MESIANO S, LEE JY, JAFFE RB. Proliferation and apoptosis in human adrenal cortex during fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 84, n. 3, p. 1110-1115, mar. 1999.

STIEWE T. The p53 family in differentiation and tumorigenesis. **Nat Rev Cancer**, v.7, p.165-168, 2007.

SUMINOE A, MATSUZAKI A, HATTORI H, KOGA Y, KINUKAWA N, ISHII E, HARA T. mRNA expression of apoptosis-associated genes in infant acute lymphoblastic leukemia: low Fas expression is an independent predictor for poor prognosis. **Leukemia**, V. 18, p. 365 – 368, 2004.

SUTTER JA, GRIMBERG A. Adrenocortical Tumors and Hyperplasias in Childhood – Etiology, Genetics, Clinical Presentation and Therapy. **Pediatr Endocrinol Rev**. v. 4, n.1, p. 32–39, September, 2006.

SVINGEN PA, KARP JE, KRAJEWSKI S, MESNER PW JR, GORE SD, BURKE PJ, REED JC, LAZEBNIK YA, KAUFMANN SH. Evaluation of Apaf-1 and procaspases-2, -3, -7, -8, and -9 as potential prognostic markers in acute leukemia. **Blood**, v.96, n.12, p.3922-3931, 2000.

TEINTURIER C, PAUCHARD MS, BRUGIÈRES L, LANDAIS P, CHUSSAIN JL, BOUGNÈRES PF. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. **Med Pediatr Oncol**, v. 32, n. 2, p. 106-111, fev. 1999.

TUCCI JR S, MARTINS ACP, SUAID HJ, COLOGNA AJ, REIS RB. The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. **J Urol**, v. 174, n. 6, p. 2338-2342, dez. 2005.

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

VAN SLOOTEN HJ, CLAHSSEN PC, VAN DIERENDONCKJH. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. **Br J Cancer**, v. 74, p. 78-85, 1996.

VERMEULEN K, BOCKSTAELE DRV, BERNEMAN ZN. Apoptosis: Mechanisms and Relevance in Cancer. **Ann Hematol** v. 84, p. 627-639, 2005.

WALTER K, HONGS M, NYHAN S, CANTO M, FEDARKO N, KLEIN A, GRIFFITH M, OMURA N, MEDGHALCHI S, KUHAJDA F, GOGGINS M. Serum fatty acid synthase as a marker of pancreatic neoplasia. **Cancer Epid Biomarkers Prev**, v. 18, n. 9, p. 2380 – 2385, sep 2009.

WATSON C, MILLER DA, CHIN-SINEX H, LOSCH A, HUGHES W, SWEENEY C, MENDONÇA MS. Suppression of NF- κ B activity by parthenolide induces X-ray sensitivity through inhibition of split-dose repair in TP53 null prostate cancer cells. **Rad Res**, v.171, p.389-396, 2009.

WEISS LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and non metastasizing adrenal cortical tumors. **Am J Surg Pathol** v. 8, p. 163-169, 1984.

WEST AN, NEALE GA, POUNDS S, FIGUEREDO BC, RODRIGUEZ-GALLINDO C, PIANOVSKI MAD, OLIVEIRA FILHO AG, MALKIN D, LALI ENZO, RIBEIRO R, ZAMBETTI GP. Gene Expression Profiling of Childhood Adrenocortical Tumors. **Cancer Res** v. 67, n. 2, p. 600-608, jan. 2007.

WHITE MK, MCCUBREY JA. Suppression of Apoptosis: role in cell growth and neoplasia. **Leukemia** v. 15, p. 1011-1021, fev. 2001.

WOLKERDÖRFER GW, MARX C, BROWN JW, SCHERBAUM WA, BORNSTEIN SR. Evaluation of apoptotic parameters in normal and neoplastic human adrenal. **Endocr Res**, v. 22, p. 411 – 419, 1996.

WOLKERSDÖRFER GW, MARX C, BROWN J, SCHRÖDER S, FÜSSEL M, RIEBER EP, KUHLISCH E, EHNINGER G, BORNTSTEIN SR. Prevalence of HLA-DRB1 genotype and altered Fas/Fas ligand expression in adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 90, n. 3, p. 1768 – 1774, mar 2005.

YAMANA K, BILIM V, KASAHARA T, ITOI T, MARUYAMA R, NISHIYAMA T, TAKAHASHI K, TOMITA Y. Prognostic impact of FAS/CD95/APO-1 in urothelial cancers: decreased expression of Fas is associated with disease progression. **British J Cancer**, v. 93, p. 544 – 551, 2005.

YANG S, LIU J, THOR AD, YANG X. Caspase expression profile and functional activity in a panel of breast cancer cell lines. **Oncol Rep**, v.17, n.5, p.1229-1235, 2007.

ANEXO 1

	CASP3		CASP8		CASP9		BAX		
	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	
Idade	< 5 anos	0,62 (0,00-37,01)	0,78	0,37 (0,00-3,78)	0,53	1,03 (0,18-2,02)	0,58	0,57 (0,09-1,65)	0,17
	≥ 5 anos	0,84 (0,09-2,13)		0,54 (0,00-3,08)		1,16 (0,01-3,18)		1,05 (0,00-2,57)	
Peso	< 100g	0,69 (0,05-37,01)	0,17	0,51 (0,00-2,09)	0,76	0,75 (0,18-2,53)	0,36	0,89 (0,09-2,57)	0,92
	≥ 100g	0,34 (0,00-1,25)		0,51 (0,00-3,78)		1,36 (0,01-3,18)		0,55 (0,00-1,99)	
Tamanho	< 200cm ³	0,69 (0,05-37,01)	0,14	0,52 (0,00-2,09)	0,69	0,75 (0,18-2,53)	0,34	0,89 (0,09-2,57)	0,69
	≥ 200cm ³	0,34 (0,00-1,25)		0,27 (0,00-3,78)		1,36 (0,01-3,18)		0,55 (0,00-1,99)	
Mutação TP53 R337H	Ausente	0,66 (0,35-2,13)	0,41	0,51 (0,00-2,09)	0,60	1,17 (0,20-3,18)	0,53	1,12 (1,35-4,92)	0,07
	Presente	0,48 (0,00-37,01)		0,39 (0,01-3,78)		1,03 (0,01-2,27)		0,54 (0,00-1,99)	
Estadio	I e II	0,62 (0,05-37,01)	0,78	0,37 (0,00-2,09)	0,30	1,05 (0,18-2,53)	0,63	0,97 (0,09-2,57)	0,41
	III e IV	0,72 (0,00-2,86)		0,55 (0,00-3,78)		1,03 (0,01-3,18)		0,49 (0,00-1,99)	
Óbito	Sim	0,35 (0,00-1,25)	0,37	0,51 (0,00-3,78)	0,59	1,11 (0,01-3,18)	0,59	0,55 (0,00-1,99)	0,75
	Não	0,63 (0,05-37,01)		0,51 (0,00-2,09)		0,96 (0,18-2,53)		0,89 (0,09-2,57)	

	<i>APAF-1</i>		<i>TNFA</i>		<i>FAS</i>		<i>FADD</i>		
	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	Mediana (min-máx)	p - valor	
Idade	< 5 anos	0,25 (0,00-1,51)	0,63	1,08 (0,00-724,08)	0,51	0,70 (0,07-19,09)	0,05	0,23 (0,01-0,93)	0,73
	≥ 5 anos	0,31 (0,00-2,25)		0,05 (0,00-169,48)		3,89 (0,22-30,27)		0,39 (0,00-0,80)	
Peso	< 100g	0,24 (0,00-2,25)	0,30	2,18 (0,00-724,08)	0,08	0,72 (0,07-30,27)	0,48	0,26 (0,01-0,93)	0,61
	≥ 100g	0,35 (0,00-1,51)		0,05 (0,00-26,45)		1,16 (0,22-18,19)		0,32 (0,00-0,80)	
Tamanho	< 200cm³	0,24 (0,00-2,25)	0,16	1,41 90,00-724,08)	0,24	0,77 (0,07-30,27)	0,69	0,26 (0,01-0,93)	0,97
	≥ 200cm³	0,35 (0,00-1,51)		0,05 (0,01-26,45)		1,16 (0,22-18,19)		0,32 (0,00-0,80)	
Mutação TP53 R337H	Ausente	0,26 (0,08-2,25)	0,71	3,97 (0,00-169,48)	0,93	1,30 (0,73-30,27)	0,14	0,58 (0,07-0,93)	0,14
	Presente	0,27 (0,00-1,51)		0,58 (0,00-724,08)		0,73 (0,07-19,09)		0,23 (0,00-0,57)	
Estadio	I e II	0,25 (0,00-2,25)	0,53	1,80 (0,00-724,08)	0,03	0,70 (0,07-30,27)	0,27	0,23 (0,00-2,25)	0,89
	III e IV	0,33 (0,00-1,51)		0,02 (0,00-26,45)		1,60 (0,22-18,19)		0,35 (0,00-0,80)	
Óbito	Sim	0,30 (0,00-1,51)	0,86	0,02 (0,00-26,45)	0,06	2,04 (0,22-18,19)	0,27	0,32 (0,00-0,80)	0,75
	Não	0,27 (0,00-2,25)		1,41 (0,00-724,08)		0,72 90,07-30,27)		0,26 90,01-0,93)	

ANEXO 2

Análise dos genes anti- apoptóticos por Mann-Whitney

		<i>BCL2</i>		<i>NFκB</i>	
		Mediana (Min- Máx)	p - valor	Mediana (Min- Máx)	p - valor
Idade	< 5 anos	0,86 (0,00-107,26)	0,23	0,98 (0,03-4,52)	0,02
	≥ 5 anos	0,02 (0,00-3,17)		1,92 (0,29-4,92)	
Peso	< 100g	0,94 (0,00-107,26)	0,16	1,13 (0,03-4,52)	0,54
	≥ 100g	0,00 (0,00-5,27)		1,34 (0,26-4,92)	
Tamanho	< 200 cm ³	0,94 (0,00-107,26)	0,14	1,31 (0,03-4,52)	0,83
	≥ 200 cm ³	0,00 (0,00-1,31)		1,34 (0,26-4,92)	
Recidiva / Metástases	Sim	0,00 (0,00-1,31)	0,18	1,53 (0,26-4,92)	0,20
	Não	0,77 (0,00-107,26)		1,06 (0,03-4,52)	
Mutação <i>TP53-R337H</i>	Sim	0,07 (0,00-14,12)	0,82	2,28 (1,35-4,92)	0,007
	Não	0,58 (0,00-107,26)		0,98 (0,03-4,52)	
Estádio	I e II	0,86 (0,00-107,26)	0,07	1,18 (0,03-4,52)	0,47
	III e IV	0,00 (0,00-1,31)		1,43 (0,26-4,92)	
Óbito	Sim	0,00 (0,00-1,31)	0,03	1,53 (0,26-4,92)	0,39
	Não	0,94 (0,00-107,26)		1,13 (0,03-4,52)	

ANEXO 3

Protocolos Utilizados no Laboratório de Oncologia Pediátrica do HC-FMRP-USP

1- PBS (Phosphate-buffered saline)

Dissolver 8 g de NaCl, 0,2 g de KCl, 1,44 g de Na₂HPO₄ em 800 ml de água destilada.

Ajustar o pH para 7,4 com HCl.

Acrescentar água q.s.p. 1 litro.

Aliquotar a solução e esterilizar em autoclave por 20 minutos.

Armazenar em geladeira.

2- Água tratada com DEPC

Acrescentar DEPC (*diethyl pyrocarbonate*) ao volume de água desejado em concentração final de 0,1%.

Deixar em solução *overnight* e autoclavar por 20 minutos.

3- TBE

108 g de Tris.

55 g de ácido bórico.

40 ml de EDTA 0,5 M pH 8,0.

Água q.s.p. 1 litro.

4- Gel de Agarose a 1% para RNA

Lavar a cuba e pentes a serem utilizados com solução contendo removedores de RNase.

Enxaguar com água destilada.

Acrescentar 1 g de Agarose a 100 ml de solução tampão (TBE) preparada com água tratada com DEPC e aquecer até dissolução da agarose.

Acrescentar 3 µl de brometo de etídio em concentração 10 mg/ml.

Verter gentilmente o gel para polimerização.

5- Gel de Agarose a 2% para DNA

Acrescentar 2g de Agarose a 100 ml de solução tampão (TBE) e aquecer até dissolução completa da agarose.

Acrescentar 3 µl de brometo de etídio em concentração 10 mg/ml.

Verter gentilmente o gel e aguardar polimerização.

6- Transcrição cDNA

Buffer – 2,5µL

dNTP – 1µL

Random – 2,5 µL

Multiscrib – 1,25 µL

RNase out – 0,63 µL

RNA – 1 µg

Água DEPC – volume para completar 25µL total

Colocar todos reagentes em um tubo de PCR e programar para 10 minutos à 20°C, mais 110 minutos à 37°C.

7- PCR em Tempo Real (SYBR Green)

cDNA diluído 1:49 – 5µL

SYBR Green PCR Master Mix – 6µL

Primer Sense – 0,5µL

Primer Antisense – 0,5µL

8- PCR em Tempo Real (TaqMan)

cDNA diluído 1:49 – 5,4µL

TaqMan Master Mix – 6µL

Sonda – 0,6µL



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

NOME DA PESQUISA: Expressão dos Genes Relacionados a apoptose Celular em Tumores Adrenocorticais de Crianças

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cecilia Fernandes Lorea

Prezado paciente,

O senhor(a) está sendo **convidado** para participar de um estudo clínico conduzido pela Doutora Cecilia Fernandes Lorea.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto.

Por favor, faça perguntas se tiver qualquer dúvida.

Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste estudo é ver se existe alguma alteração genética que diga qual tumor é maligno e qual é benigno.

O gene é uma parte muito pequena da célula que fica dentro do DNA, parte responsável pelas informações e funções do nosso corpo. O DNA funciona como um conjunto de documentos que onde estão escritos como somos e como cada célula vai funcionar.

Este trabalho que ver se no gene existe algum erro que faça as células do câncer que deveriam morrer continuarem vivas e se reproduzindo.

O tumor que iremos estudar é o da adrenal. A adrenal é um órgão localizado em cima do rim que é responsável pela produção de várias substâncias importantes para o nosso corpo, que quando está alterada pelo tumor produz hormônios sexuais que causa aumento de alterações de pêlos, de peso, crescimento mais rápido, irritabilidade, aumento peniano/clitóris, entre outros.

O tratamento do tumor de adrenal é sua retirada total junto com o tumor. Esta peça é usada para determinarmos qual o tipo de tumor, se realmente era de adrenal. Uma grande parte dela após os testes fica guardada como arquivo no laboratório. Esta é a parte que gostaríamos de usar para realizar o estudo.

Como é o estudo?

O estudo é feito com a adrenal retirada na hora da cirurgia de tratamento do tumor. Neste pedaço iremos estudar as alterações genéticas que possivelmente levaram ao desenvolvimento do câncer.

Preciso participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do senhor(a). Se decidir participar, o senhor deve assinar este documento chamado Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, o senhor(a) poderá desistir a qualquer momento. Gostaríamos que informasse ao seu médico os motivos que o levaram a retirar-se do estudo. Se o senhor(a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o atendimento neste hospital e o senhor(a) receberá do seu médico o melhor tratamento que ele pode oferecer.

O que devo fazer?

Você não deverá fazer nada o estudo será realizado com a adrenal que será retirada devido ao tratamento de sua doença.

Quais são os possíveis benefícios?

Os benefícios serão os de entender melhor este câncer, o de adrenal. Que é um tipo raro de câncer que precisa ainda de estudos para melhorar o tratamento e a sobrevivência. Determinando quais devem receber tratamentos mais ou menos agressivos.

A informação obtida será confidencial?

As informações sobre sua condição de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. O senhor(a) receberá um número de paciente e a informação será relacionada com este número. Somente seus médicos saberão que as informações estão relacionadas com o senhor(a). O resultado deste estudo será publicado em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

E se eu tiver dúvidas?

Se o senhor tiver algum problema de saúde no período de estudo, ou sempre que tiver dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato com:

Cecília – telefones (16) 91549442 / 36022472 ou (53) 81263085



Eu, _____li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no estudo "**Expressão dos Genes Relacionados a Apoptose Celular em Tumores Adrenocorticais de Crianças**" e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames em revista médicas nacionais e/ou internacionais. Entendi que toda informação que eu fornecer será processada e analisada de maneira confidencial.

Nome do Paciente _____

Nome do Responsável _____

Assinatura _____ Data _____

Médico _____

Assinatura _____ Data _____



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

NOME DA PESQUISA: Expressão dos Genes Relacionados a apoptose Celular em Tumores Adrenocorticais de Crianças

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Cecilia Fernandes Lorea

Prezado paciente,

O senhor(a) está sendo **convidado** para participar de um estudo clínico conduzido pela Doutora Cecilia Fernandes Lorea.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o senhor(a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconfortos.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto.

Por favor, faça perguntas se tiver qualquer dúvida.

Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste estudo é ver se existe alguma alteração genética que diga qual tumor é maligno e qual é benigno.

O gene é uma parte muito pequena da célula que fica dentro do DNA, parte responsável pelas informações e funções do nosso corpo. O DNA funciona como um conjunto de documentos que onde estão escritos como somos e como cada célula vai funcionar.

Este trabalho que ver se no gene existe algum erro que faça as células do câncer que deveriam morrer continuarem vivas e se reproduzindo.

O tumor que iremos estudar é o da adrenal. A adrenal é um órgão localizado em cima do rim que é responsável pela produção de várias substâncias importantes para o nosso corpo, que quando está alterada pelo tumor produz hormônios sexuais que causa aumento de alterações de pêlos, de peso, crescimento mais rápido, irritabilidade, aumento peniano/clitóris, entre outros.

Seu filho/a irá retirar a adrenal para o tratamento do tumor de rim que ele possui e esta parte será desprezada, não será utilizada para fazer o diagnóstico ou tratamento de seu filho/a. Para este estudo esta adrenal normal será útil para sabermos como se comporta o órgão normal para assim estudarmos o que está errado na adrenal com tumor.

Como é o estudo?

O estudo é feito com a adrenal retirada na hora da cirurgia de tratamento do tumor de rim e que será desprezada. Neste pedaço iremos estudar o comportamento do gene normal.

Preciso participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do senhor(a). Se decidir participar, o senhor deve assinar este documento chamado Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, o senhor(a) poderá desistir a qualquer momento. Gostaríamos que informasse ao seu médico os motivos que o levaram a retirar-se do estudo. Se o senhor(a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o atendimento neste hospital e o senhor(a) receberá do seu médico o melhor tratamento que ele pode oferecer.

O que devo fazer?

Você não deverá fazer nada o estudo será realizado com a adrenal que será retirada devido ao tratamento de sua doença.

Quais são os possíveis benefícios?

Os benefícios serão os de entender melhor este câncer, o de adrenal. Que é um tipo raro de câncer que precisa ainda de estudos para melhorar o tratamento e a sobrevivência. Determinando quais devem receber tratamentos mais ou menos agressivos.

A informação obtida será confidencial?

As informações sobre sua condição de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. O senhor(a) receberá um número de paciente e a informação será relacionada com este número. Somente seus médicos saberão que as informações estão relacionadas com o senhor(a). O resultado deste estudo será publicado em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

E se eu tiver dúvidas?

Se o senhor tiver algum problema de saúde no período de estudo, ou sempre que tiver dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato com:

Cecília – telefones (16) 91549442 / 36022472 ou (53) 81263085



Eu, _____ li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre minha participação no estudo "**Expressão dos Genes Relacionados a Apoptose Celular em Tumores Adrenocorticais de Crianças**" e tive a oportunidade de discutir e tirar dúvidas. Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo voluntariamente em participar do presente estudo. Entendo que receberei uma cópia desse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido assinado.

Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames em revista médicas nacionais e/ou internacionais. Entendi que toda informação que eu fornecer será processada e analisada de maneira confidencial.

Nome do Paciente _____

Nome do Responsável _____

Assinatura _____ Data _____

Médico _____

Assinatura _____ Data _____

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](#)