Emilia Modolo Pinto

Presença da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 e mapa de deleção do cromossomo 17 em crianças e adultos com tumores adrenocorticais

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Fisiopatologia Experimental

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latronico

São Paulo

2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de

Hormônios e Genética Molecular LIM-42

Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Aos meus filhos, Julio e Marino,

o que a vida me deu de melhor.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais Manuel e Anna, pela educação e valores que deles recebi. Tanto eu quanto meus irmãos sabemos do esforço e da luta difícil para garantir a formação de todos nós. A maior herança que eles nos deixam, com certeza, é o amor e o respeito ao estudo e ao trabalho. Agradeço aos meus irmãos, Marcio, Nair, Ana Lucia, Alexandre e Edna que contribuem, por valorizar a cada dia, o convívio familiar. Obrigado também pela torcida (seja contra ou a favor).

Uma pessoa que também torceu muito para a realização desta tese e a qual eu agradeço ter tido o privilégio da convivência, por inesquecíveis 16 anos, foi Claudio Varesio. Ele foi uma pessoa de personalidade forte, íntegra, com valores tão marcantes, que mesmo não estando mais conosco, se faz presente no nosso dia-a-dia. Aprendi a ser forte e otimista com ele. Aprendi, sem ele, a viver cada dia como se começasse tudo novamente.

Muito tenho a agradecer também aos meus filhos Julio e Marino. Eles são hoje, a melhor companhia que eu poderia querer. É certo que tive que aprender um pouco de mecânica, eletrônica, futebol, informática, mas eles também aprenderam a ler seqüências, sabem tudo sobre *p53* e me ajudaram muito na realização desta tese. Agradeço aos dois a paciência, a compreensão e o carinho que

tiveram nestes últimos meses, quando tive que dedicar boa parte do meu tempo à tese e bem pouco ficou para eles.

Também foi importante a participação de Varesio Felice, Maria Aparecida Varesio e Heloisa Varesio no apoio e torcida por esta nova etapa.

Agradeço também a participação efetiva e direta da minha orientadora, Dra. Ana Claudia Latronico. Sua experiência e praticidade foram marcantes na estruturação da tese. Seu bom humor e compreensão foram igualmente importantes, principalmente frente às minhas dificuldades e anseios.

Agradeço também a Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pelo exemplo de força e dedicação. Obrigado pela oportunidade de trabalho, que me proporcionou um aprendizado importante. Obrigado por estar sempre presente e por acompanhar o trabalho em todo o tempo. Obrigado por me permitir atuar naquilo que descobri ser uma grande paixão.

A participação da Dra. Sorahia Domenice e Dra. Maria Cândida Villares Fragoso, no levantamento dos dados clínicos e evolutivos dos pacientes foi de fundamental importância. Obrigado pelo tempo e dedicação a este trabalho.

Igualmente importante, foi a participação da Dra. Ana Elisa Correia Billerbeck, minha amiga Ana Elisa. Ela foi minha professora na Universidade e a pessoa responsável por me trazer a este laboratório (na décima tentativa, eu aceitei!). Seus ensinamentos de Biologia Molecular foram fundamentais para a realização desta tese. Na verdade, ela não me ensinou apenas Biologia Molecular. Em 24 anos de convivência, foram tantas conversas, discussões, conselhos, exemplos, participações, doações, que afastou a professora e aproximou a amiga. Obrigado pela sua amizade. Não sei como retribuir.

Também não posso deixar de agradecer ao Dr. Chin Jia Lin, sempre disposto a escutar e esclarecer minhas dúvidas, que várias vezes davam margem a discussões que se estendiam por horas a fio. Suas sugestões e conselhos, principalmente neste final de tese, foram importantíssimos para consolidar meu aprendizado. Da mesma forma quero agradecer a participação da Dra. Regina Matsunaga Martin, pelo diálogo constante, pelo exemplo de dedicação, pela disposição e pela torcida. Você é admirável.

Um agradecimento especial ao Dr. Ivo Jorge Prado Arnhold pelo apoio constante, pelas discussões, sugestões e idéias (sempre excelentes). Também agradeço, de modo especial, a Dra. Tânia Aparecida Sartori Sanchez Bachega, que pode dedicar horas preciosas na leitura desta tese.

Agradeço ao Prof. Paulo Otto pela análise estatística e interpretação dos resultados. E também ao Dr. Marcello Delano Bronstein, Dra. Mirta Knoepfelmacher e Dra. Estela Maria Novak pela amizade e pelo privilégio da participação na minha Banca de Qualificação.

Aos amigos, Karla, Eliana, Angela, Elaine, Suemi, Luciani, Luciano, Vinícius, Rafaela, Alexander e todos os pós-graduandos pelo carinho, incentivo, amizade e pelos momentos de descontração (que não foram poucos).

Aos amigos do LIM 42, funcionários como eu, Alzira, Ana Lucia, Angela, Cássia, Cristiane, Cristina, Dalva, Daniela, Francineide, Francinilda, Francisca, Giselle, Helena, Izabel, Luciana Cristina, Luciana, Luciane, Dr. Luthold, Dr. Marcelo, Márcia, Maria Aparecida, Michele, Mirian, Poline, Valéria e Vanessa pelo convívio diário e pela amizade.

ÍNDICE

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS
LISTA DE TABELAS
RESUMO
ABSTRACT
1 INTRODUÇÃO 1
1.1 Tumorigênese 2
1.2 P53 – Histórico 6
1.3 Gene *p53* 8
1.4 Proteína P53 10
1.5 Proteína P53 – Propriedades 14
1.5.1 Ciclo celular e apoptose 16
1.6 Inativação do gene *p53* 19
1.7 P53 em neoplasias adrenocorticais 22
1.8 Identificação da mutação Arg337His no Brasil 26
2 OBJETIVOS 30
3 CASUÍSTICA 32
4 MÉTODOS 36
4.1 Extração de DNA 37
4.1.1 Sangue periférico 37
4.1.2 Tecido tumoral 38
4.2 Reação de polimerização em cadeia (PCR) 40
4.3 Sequenciamento automático 42
4.4 Digestão enzimática 44
4.5 Estudo de microssatélites 45
4.5.1 Determinação da perda de heterozigose 46
4.6 Análise estatística 47

5 RESULTADOS 49
5.1 Presença da mutação Arg337His 50
5.2 Estudo de microssatélites 53
5.2.1 Análise de efeito fundador 53
5.2.2 Mapa de deleção do cromossomo 17 55
5.2.3 Instabilidade cromossômica 58
6 DISCUSSÃO 59
7 CONCLUSÕES 72
8 ANEXOS 75
Anexo A – Tabelas 76
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 87

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Ala	Alanina
Arg	Arginina
Asn	Asparagina
Asp	Ácido Aspártico
Cdks	Quinases dependentes de ciclina
Cip/kip	Complexo ciclina-quinase
CpG	Dinucleotídeo Citosina-Guanina
DNA	Ácido desoxiribonucleíco
DNAc	DNA complementar
G1	*Gap* 1 – intervalo que antecede o período S
G2	*Gap* 2 – intervalo pós período S
Glu	Glutamina
GTP	Trifosfato de guanosina
His	Histidina
IGF2	Fator de crescimento símile à insulina tipo 2
Ile	Isoleucina
Kb	Quilobase
kDa	Quilodalton
Leu	Leucina
LOH	Perda de heterozigose
Mdm2	Proteína *Mouse double minute* 2

Met	Metionina
p	Braço curto do cromossomo
p53	Gene supressor tumoral *p53*
P53	Proteína supressora tumoral P53
pb	Pares de bases
PCR	Reação de polimerização em cadeia
Phe	Fenilalanina
Rb	Proteína retinoblastoma
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RNA	Ácido ribonucleíco
RNA_m	RNA mensageiro
S	Período interfásico de síntese de DNA
Ser	Serina
SLN	Sinal de localização nuclear
SV40	*Simian virus 40*
Thr	Treonina
VNTR	Número variável de repetições em *tandem*
ρmol	picomol
μL	Microlitro
μmol/L	Micromol por litro

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Critérios de Weiss

TABELA 2: Estadiamento do carcinoma adrenocortical

TABELA 3: Dados clínicos e histopatológicos dos adultos portadores de tumores adrenocorticais

TABELA 4: Dados clínicos e histopatológicos das crianças portadoras de tumores adrenocorticais

TABELA 5: *Primers* para amplificação da região codificadora do gene *p53:* seqüência, temperatura de *annealing* e tamanho do fragmento

TABELA 6: Caracterização dos marcadores polimórficos do cromossomo 17

TABELA 7: Caracterização dos marcadores polimórficos dos cromossomos 2, 9 e 11

TABELA 8: Distribuição e freqüência alélica dos marcadores polimórficos intragênicos VNTRp53 e P53CA em pacientes portadores da mutação Arg337His e em indivíduos controles.

TABELA 9: Instabilidade cromossômica envolvendo os cromossomos 2, 9 e 11 em pacientes com tumores adrenocorticais associados à perda do cromossomo 17.

RESUMO

RESUMO

Pinto EM. *Presença da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 e mapa de deleção do cromossomo 17 em crianças e adultos com tumores adrenocorticais* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 103 p.

A incidência dos tumores adrenocorticais na região sul do Brasil é 10-15 vezes maior que a incidência mundial. Mutações no gene supressor tumoral *p53*, localizado na região 17p13.1 têm sido identificadas em diversos tumores humanos. Uma distinta mutação germinativa, Arg337His, localizada no domínio de tetramerização da proteína supressora tumoral P53 foi identificada em 35 de 36 crianças da região sul do Brasil. No presente trabalho, investigamos a presença da mutação Arg337His em 71 pacientes não relacionados, 41 adultos e 30 crianças, portadores de tumores adrenocorticais benignos e malignos. Adicionalmente, análise de perda de heterozigose do *locus p53*, mapa de deleção do cromossomo 17 e instabilidade cromossômica foram estudados em DNA genômico destes pacientes. Nenhum dos pacientes estudados apresentava histórico familial compatível com a síndrome de Li-Fraumeni. Sequenciamento automático permitiu a identificação da mutação Arg337His, em DNA extraído a partir de sangue periférico e/ou tecido tumoral, em 29 (24 crianças e 5 adultos) dos 71 pacientes. Nas 10 famílias em que foi possível analisar o DNA genômico de ambos os pais verificamos que a mutação Arg337His tem caráter hereditário. Por outro lado, esta mutação não foi encontrada em DNA de 160 indivíduos do grupo controle, não relacionados, analisados por sequenciamento automático e/ou digestão enzimática. A análise pareada de DNA gênomico de sangue periférico e de tecido tumoral revelou perda de heterozigose para o *locus p53* em 18 de 21 (86%) pacientes portadores da mutação Arg337His. Não observamos correlação entre a presença desta mutação e o comportamento maligno dos tumores. O estudo de dois marcadores polimórficos intragênicos do *p53,* pelo programa de análise de tamanho de fragmento *GeneScan*, evidenciou um mesmo haplótipo associado à mutação Arg337His em 91% dos pacientes com tumores adrenocorticais, configurando uma origem comum para esta

mutação. O estudo de 6 marcadores polimórficos ao longo do cromossomo 17 (D17S926, VNTRP53, D17S1856, D17S942, D17S1351 e D17S928) em DNA genômico pareado de 29 pacientes demonstrou uma freqüência elevada (81%) de perda do cromossomo 17 em associação à mutação Arg337His. Não observamos correlação entre a perda do cromossomo 17 e a agressividade tumoral nestes pacientes. Instabilidade cromossômica envolvendo os cromossomos 2, 9 e 11 nos 17 pacientes que perderam o cromossomo 17 foi identificada em 47%, 47% e 71%, respectivamente. Perda dos cromossomos 2 e 11 foi evidenciada em tumores benignos e malignos. A perda do cromossomo 9 foi evidenciada exclusivamente nos tumores malignos, assim como a perda concomitante de 3 ou mais cromossomos. Em conclusão, confirmamos uma freqüência elevada da mutação Arg337His em crianças brasileiras com tumores adrenocorticais benignos e malignos. Esta mutação também foi encontrada no grupo de adultos, embora em menor freqüência. Não houve correlação entre sua presença e o comportamento maligno dos tumores adrenocorticais. Efeito fundador para a mutação Arg337His e inativação bialélica do *p53*, caracterizada pela presença da mutação Arg337His e a perda do cromossomo 17 foram demonstradas na maioria dos casos analisados. Finalmente, a instabilidade cromossômica envolvendo três ou mais cromossomos contribuiu para o diagnóstico de carcinoma adrenocortical.

Descritores: Arg337His, *p53*, Efeito Fundador, mapa de deleção, perda de heterozigose, instabilidade cromossômica, tumores adrenocorticais

ABSTRACT

ABSTRACT

Pinto EM. *Presence of the mutation Arg337His of the tumor suppressor P53 and deletion mapping of chromosome 17 in children and adults with adrenocortical tumors*. [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2005. 103 p.

The incidence of adrenocortical tumors in the South region of Brazil is 10 to 15 times higher than the worldwide one. Mutations in the tumor suppressor *p53* gene, located in chromosome 17p13.1, have been described in different human tumors. A germline mutation, Arg337His, in the tetramerization domain of the tumor suppressor P53 was identified in 35 of 36 children from the South region of Brazil. In the present study we have searched for Arg337His mutation in genomic DNA of 71 non-related patients, 41 adults and 30 children, with benign or malignant adrenocortical tumors. Additionally, we also analyzed the loss of heterozigosity of *p53* locus, deletion mapping of chromosome 17 and chromosome instability, in genomic DNA of these patients. None of the patients had a familial history of Li-Fraumeni syndrome. Automatic sequencing identified the Arg337His mutation in genomic DNA from peripheral leukocytes and/or tumor tissues in 29 (24 children and 5 adults) of these 71 patients. In 10 families in which the study of both parent's DNA was possible, the Arg337His mutation was inherited from one of the parents. Sequencing analysis and/or enzymatic restriction showed that this mutation was not present in DNA of 160 non-related control subjects. Paired analysis of genomic DNA of peripheral leukocytes and tumor tissue revealed loss of heterozigosity of *p53* locus in 18/21 (86%) patients with Arg337His mutation. There was no correlation between the presence of this mutation and the malignant behavior of these tumors. The study of two intragenic polymorphic markers of *p53* through GeneScan software showed the association of the same haplotype with the Arg337His mutation in 91% of patients with adrenocortical tumors, indicating a common origin of this mutation. The study of 6 polymorphic markers along chromosome 17 (D17S926, VNTRP53, D17S1856, D17S942, D17S1351, D17S928) in paired genomic DNA of 29 patients showed an increased frequency (81%) of

chromosome 17 loss in association with the presence of the Arg337His mutation. We did not observe any correlation between the loss of chromosome 17 and aggressive tumor behavior in these patients. In the 17 patients who lost chromosome 17, chromosome instability of chromosomes 2, 9 and 11 was identified in 47%, 47% e 71%, respectively. Loss of chromosomes 2 and 11 was observed in benign and malignant tumors, whereas the loss of chromosome 9 was observed exclusively on malignant tumors. Similarly, the concomitant loss of 3 or more chromosomes was only observed in malignant tumors. In conclusion we confirmed an increased frequency of Arg337His mutation in Brazilian children with benign or malignant adrenocortical tumors. This mutation was also found in the adult group, although at a lower frequency. There was no correlation between the presence of the mutation and the malignant behavior of adrenocortical tumor. We demonstrated a founder effect for this mutation and also a biallelic inactivation of *p53* characterized by the presence of the Arg337His mutation and the loss of chromosome 17 in most of the cases studied. Finally, chromosome instability involving 3 or more chromosomes contributed for the diagnosis of adrenocortical carcinoma in these patients.

Descriptors: Arg337His, *p53*, founder effect, deletion mapping, loss of heterozigosity, chromosomal instability and adrenocortical tumors.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumorigênese

A tumorigênese é um processo constituído de múltiplas etapas que determinam a transformação progressiva de células normais em células malignas (1). Proliferação celular descontrolada e aumento de viabilidade sobre clones normais são características marcantes dos tumores e ocorrem como conseqüência de alterações genotípicas e fenotípicas das células (2). Estudos envolvendo a progressão tumoral em populações humanas indicam que, em média, 4 a 6 eventos, com participação ativa de genes relacionados ao processo de imortalização e outros envolvidos na regulação do ciclo celular atuam na formação do tumor (3).

A imortalização celular pode ser obtida a partir do aumento da expressão da telomerase, proteína responsável pela produção de seqüências repetitivas de nucleotídeos que recobrem os telômeros, extremidades distais dos cromossomos, que normalmente encurtam em cada replicação celular (4). A manutenção do comprimento do telômero

é um mecanismo chave para a imortalidade celular (5) e representa um mecanismo potencial que capacita as células a ultrapassarem pontos críticos durante os estágios da transformação neoplásica (6).

Outro mecanismo capaz de tornar as células imortalizadas envolve agentes virais que podem transformar as células infectadas devido à liberação de proteínas virais que interferem nos mecanismos de multiplicação celular (7). Entre os vírus capazes de transformar células normais em cancerosas estão o papilomavírus humano (HPV) envolvido no câncer cervical (8), os vírus *Epstein-Barr* (EBV) relacionados ao linfoma de Hodgkin (9) e o *Simian virus* 40 (SV40) encontrado em tumores cerebrais, ósseos e linfoma não Hodgkin (10).

Também participam da transformação maligna os precursores celulares dos oncogenes, os proto-oncogenes, que codificam proteínas intimamente envolvidas na regulação da proliferação e diferenciação celular (11). Os proto-oncogenes podem ser ativados constitutivamente, seja por rearranjo cromossômico, por amplificação gênica ou por presença de mutações de ponto. Uma vez adquiridas estas alterações os proto-oncogenes passam a ser chamados oncogenes e determinam ganho funcional em células transformadas. Assim, a amplificação do oncogene *myc* tem valor prognóstico para pacientes com neuroblastoma (12) e a amplificação do oncogene *erbB*-2 é marcador de agressividade em tumores mamários e ovarianos (13).

Células tumorais podem gerar seus próprios sinais estimulatórios de proliferação para deixar o estado de quiescência e iniciar o processo proliferativo e desta forma, mostram uma reduzida dependência de fatores estimulatórios exógenos, tais como a produção de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) ou do fator de crescimento tumoral α (TGFα) nos glioblastomas e sarcomas, respectivamente (1). Por outro lado, muitos oncogenes atuam mimetizando sinalização de crescimento normal. A proteína Ras é uma proteína pertencente à superfamília das proteínas G (ligadora de GTP) que ativam ou inibem moléculas seqüenciais de uma cascata de reações, quando ligadas ao GTP. Formas mutadas desta proteína se ligam com eficiência ao GTP, mas são incapazes de hidrolisar essa molécula gerando constantemente sinais estimulatórios, resultando numa proliferação celular descontrolada (14).

Genes supressores tumorais, como os genes do retinoblastoma (*Rb*) e o gene supressor tumoral *p53,* por outro lado, podem inibir o processo de proliferação celular (15). As proteínas codificadas por estes genes estão envolvidas na repressão do crescimento e divisão celular. Alterações nestes genes são freqüentemente observadas em neoplasias humanas e incluem mutações de ponto e perda de heterozigose (LOH). O gene supressor tumoral *p53* tem papel relevante na progressão tumoral, agindo como fator de transcrição de genes que atuam em

resposta a uma variedade de insultos à célula, regulando o ciclo celular ou bloqueando a replicação celular anormal e a transformação maligna.

A partir da observação de famílias portadoras de retinoblastoma, Knudson desenvolveu uma hipótese para explicar a ocorrência de tumores familiares que se tornou um paradigma na compreensão da progressão tumoral (16). Mesmo quando se herda um dos alelos do gene supressor mutado, o alelo normal é capaz de proteger o organismo do desenvolvimento tumoral. O processo tumorigênico só ocorrerá pela perda ou inativação do alelo normal, ocorrência eventual durante a proliferação celular (16). Desta forma, a inativação de um gene supressor tumoral obedece ao modelo de dois eventos ("*two hits*"), ou seja, a presença de uma mutação germinativa e de um segundo evento, caracterizado por uma mutação somática ou perda do alelo normal (16).

A metilação (mecanismo epigenético de silenciamento transcricional) em células tumorais desativa genes que normalmente evitariam divisões celulares impróprias. Desta forma, a metilação pode também explicar a inativação de genes supressores tumorais, ocorrendo, por exemplo, com o gene $p16^{INK4a}$ em tumores de pulmão, mama, próstata e rim (17).

A aquisição de resistência a apoptose, morte celular programada é outra característica inerente a vários tipos de tumores. Os mecanismos

apoptóticos constituem uma barreira para a progressão tumoral e a célula cancerosa deve evadir-se deste processo (1).

Mutações podem ocorrer continuamente durante a divisão celular e os proto-oncogenes e os genes supressores tumorais não são mais sujeitos a elas que os demais genes. Tendo sido estabelecida a alteração genética, seja por ativação de oncogenes ou inativação de genes supressores tumorais e, por conseguinte, a instabilidade genômica, alterações adicionais se acumulam mais facilmente.

1.2 P53

Histórico

A primeira identificação da proteína P53 ocorreu a partir de estudos envolvendo transformação celular induzida pelo vírus SV40. Uma proteína co-precipitada com o antígeno T do vírus foi observada após infecção viral (18, 19). Esta mesma proteína também foi evidenciada em diversas linhagens celulares de carcinomas embrionários não infectados por este vírus (19). Foi então proposto que a infecção por SV40 ou a transformação celular estimulavam a síntese ou estabilidade desta proteína celular. Esta proteína e seu gene correspondente foram então denominados p53 (18).

A partir destes experimentos iniciou-se a pesquisa para clonagem do DNA complementar (DNAc) do gene *p53* (20). Dois clones foram obtidos, de forma independente, por 2 grupos de pesquisadores (20).

A transformação em fibroblastos de ratos requer a participação de dois oncogenes: *myc* e *ras*, ou *E1A* e *ras* (21). A observação de que a co-transfecção de plasmídeos contendo o gene *p53* e o oncogene *ras* também transformavam células embrionárias de ratos, de maneira similar aos oncogenes *myc* ou *E1A* associados ao *ras,* resultou na classificação do gene *p53* como oncogene (22, 23). Entretanto, repetições deste experimento com clones distintos não confirmaram estes resultados. Apenas alguns clones foram capazes de transformar as células quando transfectados juntamente com o oncogene *ras* (24). A análise da seqüência de aminoácidos entre os diferentes clones evidenciou a presença de valina ou alanina na posição 135. Esta diferença foi a base para o melhor entendimento da atividade biológica do P53. Foi então demonstrado que a transformação celular era causada por formas mutantes (valina) do gene (24).

Em contrapartida, a co-transfecção de um plasmídeo contendo *p53* normal reduzia o potencial de transformação de plasmídeos contendo *p53* mutado e o oncogene *ras*. O gene *p53* normal suprimia a transformação mesmo em células co-transfectadas com os oncogenes *E1A* ou *myc* associados ao *ras*. Estes experimentos sugeriram que para

ocorrer transformação tumoral era necessária a inativação do gene *p53*, indicando que este gene não atuava como oncogene e sim como um gene supressor tumoral (25).

Mutações do *p53* em neoplasias humanas foram inicialmente encontradas em pacientes com câncer de cólon (26). Desde então, o gene *p53* foi reconhecido como gene supressor tumoral, mutado ou perdido em aproximadamente 50% de todos os cânceres humanos (27).

1.3 Gene *p53*

O gene *p53* humano está localizado no braço curto do cromossomo 17, região 17p13.1 (28), possui 20 Kb e consiste de 11 exons que variam em tamanho desde 22 até 1278 pares de bases (pb). A representação esquemática da organização do gene *p53* está representada na Figura 1.

O primeiro exon não é traduzido e contém a primeira região promotora. O primeiro íntron possui 10 kb e um segundo promotor está presente nesta região (29). O íntron 1 pode estar envolvido em processos relacionados à transcrição e estabilidade do RNAm (30) do *p53* que contém 2,8 Kb.

O gene *p53* é restrito ao grupo de vertebrados. A organização genômica entre os 3 genes clonados (humano, camundongo e *Xenopus*) revela uma grande similaridade entre eles, com 5 regiões de identidade, os domínios I-V. Embora tendo a mesma identidade, estes domínios não estão situados na mesma posição nos 3 genes. Os domínios I, III, IV e V correspondem aos exons 2, 5, 7 e 8. O domínio II corresponde aos exons 4 e 5. A análise destas regiões em diversas espécies confirmou a elevada conservação destes domínios (30).

No primeiro íntron do gene *p53* está também localizado um marcador polimórfico tipo VNTR, isto é, contendo um número variável de repetições em *tandem*, com um núcleo de repetição de 5 nucleotídeos $(AAAAT)_n$ (31). Este marcador polimórfico, juntamente com outro microssatélite dinucleotídeo $(CA)_n$ (32) presente na região não codificadora do exon 11, são freqüentemente utilizados como marcadores polimórficos intragênicos em estudos de perda de heterozigose (LOH).

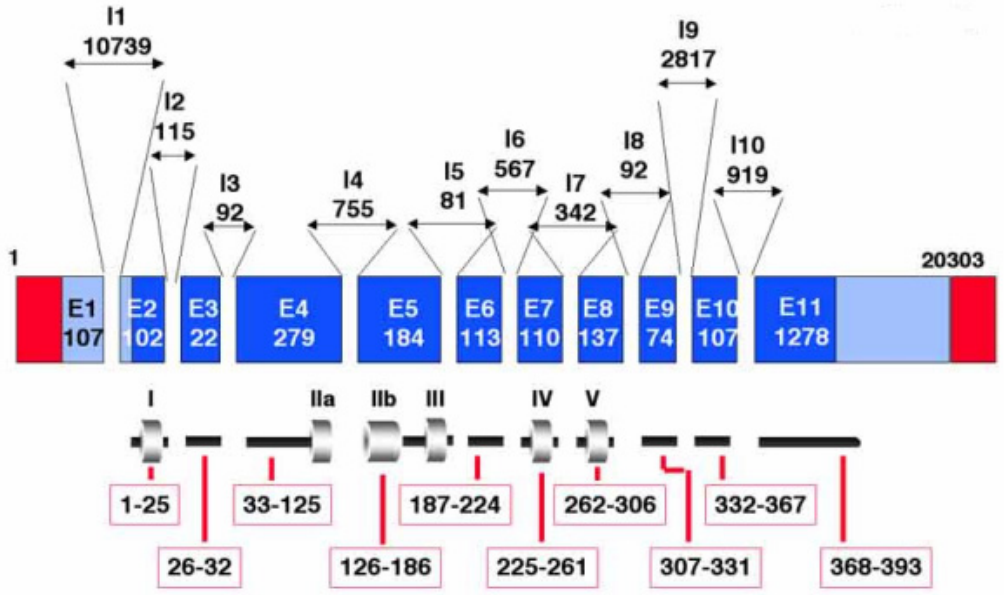

Figura 1 - Organização do gene *p53.*
Os exons (E1-E11) e os íntrons (I1-I10), com o respectivo número de nucleotídeos estão representados. As regiões conservadas (I-V) assim como os códons dos exons 2-11 estão representadas na parte inferior do esquema. As regiões traduzidas do gene estão representadas em azul escuro e as não traduzidas em azul claro e em vermelho (Figura extraída de http://p53.curie.fr)

1.4 Proteína P53

P53 é uma fosfoproteína homotetramérica, de 53 kDa, que atua predominantemente como um fator de transcrição nuclear, desempenhando um papel chave na supressão tumoral (33) e desta

forma tem papel crítico na manutenção da integridade do genoma (34). A proteína supressora tumoral P53, na forma monomérica constituída de 393 aminoácidos, pode ser dividida estrutural e funcionalmente em 4 domínios.

O domínio amino-terminal, importante na regulação da estabilidade do P53 na célula, é responsável pelas propriedades de transativação da proteína (35). Neste domínio também ocorre a interação com a oncoproteína Mdm2, responsável pela exportação nuclear da proteína P53 para sua posterior degradação, desta forma impedindo seu acúmulo em células normais (36). Uma região rica em prolina também está presente nesta região amino-terminal (37). O domínio de ligação ao DNA, central, está localizado entre os aminoácidos 102-292 (38). Cerca de 90% das mutações do gene *p53* ocorrem nesta região (39). A região carboxi-terminal contém o domínio de oligomerização (40) com sinais de localização nuclear (SLN) e envolvido na tetramerização da molécula e o domínio regulatório negativo com papel potencial na inibição da ligação ao DNA (41) (Figura 2).

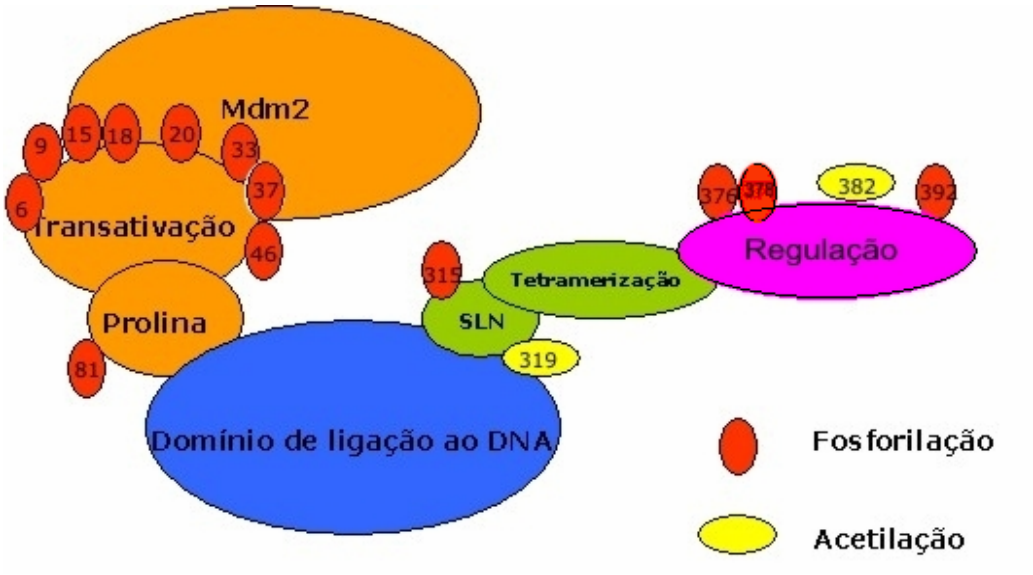

Figura 2 - Estrutura da proteína P53.
O domínio amino-terminal está representado em laranja e o domínio de ligação ao DNA em azul. Na região carboxi-terminal, é representado, em verde, o domínio de oligomerização e em rosa o domínio regulatório. As figuras em vermelho representam sítios de fosforilação e em amarelo, sítios de acetilação da proteína

A proteína P53 existe como um tetrâmero (dímero de dímero) na ausência ou presença de DNA (42). O tetrâmero pode ocorrer em uma conformação latente, inativa para a ligação ao DNA ou numa conformação ativa, onde se liga ao DNA (43). A alteração entre as formas latentes e ativas é mediada via domínio de tetramerização (44).

A estrutura tridimensional tetramérica da proteína P53 (212 kDa) não é conhecida devido às dificuldades tanto de cristalização como de estudos por ressonância magnética nuclear (RMN). Até o momento, há modelos tridimensionais apenas para os domínios de ligação ao DNA (45) e de tetramerização (46).

O modelo tridimensional para o domínio de tetramerização mostra que um monômero da proteína P53 contém uma cadeia β (aminoácidos 326-333) ligada a uma α-hélice (aminoácidos 335 a 355) por um único aminoácido, altamente conservado, a glicina 334, resultando na forma de um "V" (30). Três aminoácidos, Ile332, Phe338 e Phe341 formam um pequeno *cluster* na dobra do "V".

Dois monômeros se associam unindo suas cadeias β e α-hélices de modo anti-paralelo. Uma região hidrofóbica é criada na interface entre os monômeros e envolve os aminoácidos Phe328, Leu330 e Ile332 da cadeia β e Phe338, Phe341 e Asn345 da α-hélice. Uma ponte de sal ocorre entre o aminoácido Arg337 de um monômero e Asp352 do outro monômero.

Dois dímeros interagem via suas α-hélices, mas ângulos diferentes entre os dois pares de α-hélices podem existir (47). As cadeias β estão externas ao tetrâmero e seus aminoácidos não estão diretamente envolvidos na associação entre 2 dímeros (Figura 3). A interface entre as hélices é principalmente hidrofóbica e envolve os aminoácidos Met340, Leu344, Ala347, Leu348 e Leu350 (48).

Figura 3 - Modelo estrutural para o domínio de tetramerização da proteína P53.
A: Dois monômeros associados formando um dímero. Uma ponte de sal ocorre entre os aminoácidos Arg337 de um monômero e Asp352 de outro monômero. B: Dois dímeros interagem via α-hélices formando um tetrâmero. As cadeias β estão dispostas externamente. (Figuras obtidas de (A): DiGiammarino *et al.*, 2001 e (B): www.iarc.fr/p53)

1.5 Proteína P53

Propriedades

A proteína P53 foi denominada guardiã do genoma em função da sua propriedade de monitorar a integridade do DNA e impedir a proliferação de células com material genético danificado (34). Ela é instável, com uma meia vida em torno de 15 a 30 minutos. Sua forma ativa é rapidamente degradada o que torna extremamente difícil a sua detecção (49). Em caso de lesão ao DNA, seja por agentes físicos tais como radiação ultravioleta, raios gama ou ainda por produtos químicos mutagênicos, hipóxia ou ação de oncogenes, o gene *p53* é ativado,

levando a um aumento da expressão de sua proteína nas células. Esta proteína torna-se estável no núcleo, onde se inicia ativação transcricional ou repressão de genes alvos distintos que contêm, em seu promotor, elementos de ligação à proteína P53 e que primariamente funcionam prevenindo a proliferação de células lesadas (50).

As mutações no gene *p53* freqüentemente resultam em acúmulo da proteína, detectado por imunohistoquímica, *Western blot* ou citometria de fluxo (51) em células tumorais, devido a um aumento da sua estabilidade (52). Imunohistoquímica para a proteína P53 pode ser utilizada como marcador de malignidade em diagnóstico citopatológico (53). Embora se considere que 90% das mutações possam ser detectadas por imunohistoquímica, podem ocorrer resultados falso-positivos, na ausência de mutação do gene *p53*, decorrente do aumento da transcrição em células rapidamente proliferativas ou pela inativação de um fator necessário para a degradação da proteína P53. Resultados falso-negativos ocorrem e são decorrentes de mutações que produzem proteínas P53 muito alteradas, que não respondem como receptores nucleares (54).

Em resposta à lesão ao DNA, a proteína P53 se acumula como resultado de modificações pós-tradução, por acetilação ou fosforilação. Fosforilação na região amino-terminal, especialmente nos aminoácidos Ser^{15}, Thr^{18}, Ser^{20} e Ser^{37} afetam a interação com a oncoproteína Mdm_2,

o que contribui para a estabilização da proteína P53 (55). Fosforilação na região carboxi-terminal, envolvendo os aminoácidos Ser^{315} e Ser^{392} aumenta a especificidade de ligação ao DNA *in vitro* (56).

A observação de que agentes lesivos ao DNA induzem a expressão da proteína P53 nas células levou à definição do gene *p53* como um sensor universal de lesão ao DNA. Enquanto dispensável para a viabilidade celular a proteína P53 atua protegendo o genoma do acúmulo de mutações. Células que perdem o *p53* são geneticamente instáveis e predispostas a tumores (57).

1.5.1 Ciclo celular e apoptose

O período entre duas divisões mitóticas define o ciclo celular somático. A coordenação precisa das diferentes fases do ciclo celular é essencial a todos os organismos eucariontes. O intervalo entre o final de uma divisão mitótica e início de outra é chamado intérfase. Este período é classicamente dividido em 3 estágios: G1 (*Gap*1), S (*synthesis*) e G2 (G*ap*2). A fase em que as células estão temporariamente ou permanentemente fora do ciclo celular (quiescentes) é denominada G0. Durante o estágio G1, as células aumentam em tamanho, sintetizam RNA e proteínas. Um mecanismo importante de controle do ciclo celular é ativado durante este período (G1 *checkpoint*) para certificar que todo material para a síntese de DNA esteja pronto (58). Nutrientes,

mitógenos e fatores de crescimento extracelulares induzem a transcrição de genes que são necessários para a síntese de DNA e a célula passa para o estágio seguinte onde ocorre a replicação do DNA (fase S). Durante o intervalo entre a síntese de DNA e a mitose (G2), a célula continua a crescer e sintetizar novas proteínas. Ao final deste intervalo outro mecanismo de controle do ciclo celular (G2 *checkpoint*) verifica a necessidade de reparo dos erros da replicação do DNA antes da célula entrar em mitose. A perda do controle *checkpoint* resulta em instabilidade genômica, acúmulo de lesões no DNA e proliferação celular não controlada, fenômenos que têm sido relacionados à progressão tumoral (58).

A proteína P53 não é necessária para a progressão do ciclo celular sendo, no entanto, um importante regulador (*checkpoint)* durante a progressão G1-S. Radiação ultravioleta, oncogenes e substâncias químicas lesivas ao DNA ativam proteínas como ATM, Chk1 e Chk2 que fosforilam P53 em sítios da região amino-terminal. Uma vez ativada, a proteína P53 induz ao aumento da expressão da proteína $p21^{Cip/Kip}$, um inibidor do complexo ciclina-quinase (59) e as células sofrem então um bloqueio nesta fase para que seja efetivado o reparo do DNA (49) (Figura 4).

Células que apresentam o gene *p53* mutado e consequentemente inativação da proteína P53, não sofrem este bloqueio. Desta forma,

estas células, geneticamente instáveis, tendem a acumular mutações e rearranjos cromossômicos adicionais, levando a uma rápida proliferação de clones de células alteradas contribuindo dessa forma para a transformação neoplásica.

Embora a proteína P53 não seja requerida para o bloqueio em G2, muitos dos seus genes alvos têm mostrado capacidade de indução de bloqueio nesta fase, incluindo os genes *GADD45* (60), $p21^{Cip/Kip}$ (61) e *14-3-3* σ (62) sugerindo um papel para o *p53* no bloqueio em G2.

Quando o reparo do DNA é finalizado, a proteína P53 ativa a transcrição de seu próprio inibidor, a proteína Mdm2, de 90 kDa, identificada como produto do oncogene mdm2, que sob ubiquinação, transporta a proteína P53 para o citoplasma, onde é degradada (63). Alguns oncogenes podem estimular a transcrição de proteínas que se ligam a Mdm2 e inibir sua atividade (64).

Se o reparo do DNA não for satisfatório, a proteína P53 dispara o mecanismo de morte celular programada, a apoptose (65), induzindo a expressão da proteína pró-apoptótica Bax (66) e inibindo a expressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2 (67).

A inativação funcional do gene *p53* constitui um mecanismo que garante à célula tumoral evadir-se do processo de apoptose, garantindo a proliferação de células que não sofreram reparo do material genético.

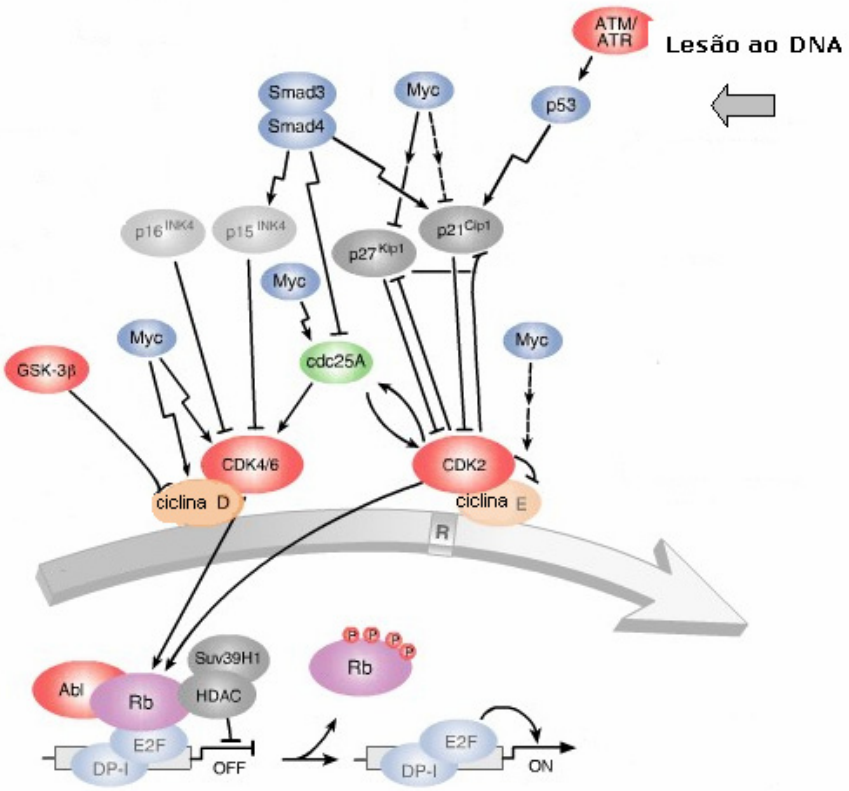

Figura 4 - Genes e proteínas envolvidos na fase G1-S do ciclo celular. A expressão da proteína $p21^{Cip/Kip}$, induzida por P53 bloqueia o complexo ciclinaE/CDK2, necessário para progressão do ciclo celular na fase G1/S. (Adaptado de www.cellsignal.com)

1.6 Inativação da proteína P53

A proteína P53 é distribuída uniformemente em células normais, mas em resposta à lesão ao DNA ou outro tipo de estresse, desloca-se

para o núcleo ativando genes alvo. A localização nuclear da proteína é, portanto, essencial para a sua função como fator de transcrição.

A função normal da proteína P53 pode ser inativada durante a tumorigênese por mutação, inibição por produtos oncogênicos virais e por alteração de localização subcelular, sendo a mutação a forma mais importante e encontrada em metade de todos os cânceres humanos (27).

Muitas das mutações encontradas no gene *p53* estão localizadas no domínio de ligação ao DNA, pericialmente nos códons 175, 245, 248, 273 e 282, ricos em CpG metilados (68). Experimentos demonstram que a relação entre dinucleotídeos CpG metilados associados a fatores mutagênicos exógenos podem representar um alvo preferencial para mutações (69). Mutações no domínio de tetramerização também foram observadas e tem um papel chave na transformação celular (70).

Em particular, tem sido demonstrado que monômeros de P53 mutantes exibem um fenótipo transdominante e são aptos a se associarem com monômeros de P53 normal e induzir a formação de um hetero-oligômero inativo (71). Quando ocorre oligomerização da forma mutante com a normal, a molécula pode não se ligar a seqüências específicas do DNA ou até se ligar com pouca afinidade. Desta forma a proteína sofre redução da função e pode não suprimir a proliferação celular e supressão tumoral como esperado.

Algumas mutações no gene *p53* refletem a ação de substâncias químicas que podem atuar como carcinógenos específicos. Exemplos esclarecedores do papel de carcinógenos na gênese de tais mutações são os casos observados nos cânceres de pulmão (72) e fígado que apresentam alta prevalência das transversões G:C (Guanina:Citosina) para T:A (Timina:Adenina), atribuídas à ação de benzo[*a*]pireno e aflatoxina, respectivamente (73).

A inativação da proteína P53 também pode ocorrer através da formação de complexo com produtos oncogênicos virais tais como o antígeno T do SV40 (18) ou a proteína E1B do adenovírus tipo 5 (74). Adicionalmente, a interação com a proteína E6 do papilomavírus humano resulta em degradação da proteína P53 (75).

A proteína P53 também pode ser funcionalmente inativada por seqüestro citoplasmático anormal em muitos tipos tumorais incluindo carcinoma coloretal (76) e carcinoma de mama (77). A localização citoplasmática constitutiva desta proteína nestes tumores está ligada à metástase e pouca resposta à quimioterapia (77).

A perda da função desta proteína está de acordo com o modelo de 2 eventos proposto por Knudson (16) sendo tipicamente causada por mutação em um alelo e perda do alelo remanescente. Análise molecular de câncer de cólon, por exemplo, revela uma freqüência elevada de perda de heterozigose envolvendo o braço curto do cromossomo 17,

onde se localiza o gene *p53* (78). O seqüenciamento do alelo remanescente mostra freqüentemente a presença de uma mutação de ponto (79). Aproximadamente 50% destas mutações representam transições G→A nas regiões *hot spot* correspondentes aos códons 175, 248 e 273 (80). Resultados semelhantes têm sido observados em câncer de pulmão (81).

1.7 P53 em neoplasias adrenocorticais

Aspectos moleculares envolvidos na tumorigênese do córtex adrenal têm sido amplamente investigados. Dados relativos à análise de clonalidade (82-84), hibridização genômica comparativa (85-90), investigação de alterações genéticas específicas, envolvendo os genes da neoplasia endócrina múltipla (*MEN1)* (91-93), H19 (94, 95), p57KIP2 (96), receptor de ACTH (97, 98), StAR (99), perda de heterozigose envolvendo os cromossomos 2 (92), 11 (92, 100) e 17 (101, 102), assim como a expressão aumentada de IGF2 (100, 103) foram avaliados na tentativa de se encontrar um marcador genético que pudesse estar envolvido no processo de iniciação e/ou progressão tumoral.

Tumores adrenocorticais ocorrem com um considerável aumento de freqüência em pacientes com a síndrome de Beckwith-Wiedemann

(104) e em famílias com a síndrome de Li-Fraumeni (105), uma rara doença familial caracterizada pela alta incidência de sarcomas, carcinomas de mama, tumores do sistema nervoso central, leucemias e carcinomas adrenocorticais, onde a incidência deste tipo de tumor é de 1% (106), (107). Na síndrome de Li-Fraumeni, as famílias são caracterizadas pela identificação de um propósito com o diagnóstico de sarcoma em idade precoce e dois parentes próximos com câncer antes dos 45 anos de idade e onde predisposição a tumores é sempre associada a mutações germinativas do gene *p53* (106). Mutações neste gene também são encontradas em indivíduos portadores de tumores adrenocorticais isolados (108).

Tumores adrenocorticais isolados foram analisados para mutações nos exons 5-8 do gene supressor tumoral *p53.* Mutaç*ões* localizadas nos códons 157, 163 e 273 foram identificadas em 3 de 15 carcinomas (20%). A mutação no códon 157 foi detectada tanto no tumor primário quanto nas metástases. Não foram identificadas mutações nos 18 adenomas analisados. Os autores sugerem que inativação do gene *p53* por mutação ocorre numa minoria dos carcinomas adrenocorticais isolados e que estas mutações constituem um evento tardio no processo de transformação maligna (109).

A análise de DNA de sangue periférico de 6 crianças portadoras de tumores adrenocorticais, sem histórico de câncer familial, identificou

mutações em 3 de 6 (50%) crianças, nos exons 5, 6, e 7 do gene *p53*. Os autores afirmam a importância do estudo do gene *p53* em crianças portadoras de tumores adrenocorticais (108).

Este gene também foi investigado em 16 tumores adrenocorticais isolados (5 adenomas e 11 carcinomas) e em duas linhagens celulares de tumores adrenocorticais. Foram analisados os exons 5 a 8 e identificadas mutações em apenas 3 dos 11 pacientes com carcinomas adrenocorticais (27%) e em ambas as linhagens celulares (110). As mutações identificadas foram localizadas nos códons: 151/152, 193 e 248. Também foram detectados rearranjos envolvendo os exons 7 e 8. Neste estudo a proteína P53 foi detectada por imunohistoquímica apenas nos carcinomas que apresentavam mutação do gene *p53* (110).

Um estudo em 23 pacientes taiwaneses, portadores de tumores adrenocorticais, revelou uma freqüência elevada de mutações no exon 4 do gene *p53,* (9 de 15 pacientes com tumores adrenocorticais benignos) mais freqüentemente detectadas nos códons 100 e 102 (111). Estes resultados diferiram de trabalhos prévios onde as mutações do gene *p53* foram pesquisadas apenas nos exons 5 a 8, sugerindo, então, a inclusão do exon 4 como região *hot spot* (111). No entanto, estudos posteriores realizados em 25 pacientes caucasianos (americanos e europeus) não evidenciaram a presença de mutações no exon 4 sugerindo que fatores

étnicos e ambientais teriam sido responsáveis por estas mutações (112).

A análise de toda a região codificadora do gene *p53* em 14 crianças com tumores adrenocorticais e sem histórico familial compatível com a síndrome de Li-Fraumeni (Manchester Children's Tumor Registry) evidenciou mutações germinativas em 11 pacientes: códons 152 (6 casos), 158 (3 casos), 213 (1 caso) e 251 (1 caso). Um paciente desta série, portador de carcinoma adrenocortical, exibia a mutação Arg337His associada a 2 outras mutações nos íntrons 6 e 10 em tecido tumoral, não tendo sido possível determinar se a mutação era germinativa ou somática (113).

Esta mesma mutação também foi identificada em um único paciente de uma série de 268 casos de tumores adrenocorticais. Entretanto, todos estes casos representavam membros familiares em que pelo menos mais de uma pessoa era afetada por câncer antes dos 45 anos de idade (114).

Um outro estudo envolveu a análise da região codificadora do gene *p53* em 79 pacientes portadores de tumores adrenocorticais isolados. Foram observadas mutações somáticas em 8 de 14 carcinomas (códons 161, 162, 180, 185, 208, 245, P191del e dupla deleção, em hemizigose, 14571delC + 14575 delG no exon 8) associadas à maior

expressão das proteínas P53 e P21, ressaltando o papel do gene *p53* nesta neoplasia (115).

1.8 Identificação da mutação Arg337His no Brasil

O carcinoma adrenocortical em pacientes de grupo pediátrico é uma forma de tumor rara e representa 0,05 – 0,2% de todos os cânceres infantis. Em adultos, embora também raro em relação a outras neoplasias, é 100 vezes mais prevalente do que em crianças (116). Por razões desconhecidas, no grupo pediátrico, a incidência de tumores adrenocorticais nas regiões sul e sudeste do Brasil, é aproximadamente 10-15 vezes maior que a incidência mundial (117).

A investigação de toda a região codificadora do gene *p53* foi realizada em 36 crianças com o intuito de estabelecer uma provável etiologia genética para a elevada incidência de tumores adrenocorticais na região sul do Brasil (117). Neste estudo, uma única mutação, germinativa, foi identificada em 35 de 36 (97%) crianças portadoras de tumores adrenocorticais. Esta mutação caracterizava-se pela substituição do aminoácido arginina por histidina na posição 337, no exon 10, no domínio de tetramerização da proteína P53. Nenhuma destas crianças apresentava histórico familial compatível com a

síndrome de Li-Fraumeni. Um total de 186 membros familiares de 36 pacientes foi testado para a presença da mutação. Ela foi detectada em pelo menos um dos pais em 7 casais analisados e em toda a linha parental portadora da mutação. Foi estudado um grupo controle formado de 22 crianças, sem história familial sugestiva de aumento de incidência de tumores, de mesma localização geográfica dos pacientes portadores de tumores adrenocorticais. Um número adicional de 56 membros familiares do lado parental não portador da mutação também foi testado para a presença da mutação. Tanto este grupo quanto o grupo controle exibiram seqüência normal para o gene *p53* (117).

Perda de heterozigose para o *locus p53* foi demonstrada em 5 de 6 tumores. A análise de 4 marcadores polimórficos, sendo 2 intragênicos: $VNTRp53_n$ e $p53(CA)_n$ e 2 flanqueando o *locus p53*: D17S1832 e D17S786 em 17 pacientes portadores de tumores adrenocorticais e 10 parentes assintomáticos eliminou a possibilidade de efeito fundador (117). Imunohistoquímica em 8 de 11 tumores (incluindo as amostras que sofreram LOH) revelou acúmulo nuclear de P53, comparável ao observado em tumores associados à síndrome de Li-Fraumeni (117).

Além disto, em todos os ensaios funcionais realizados, (transativação, redução de colônia e apoptose) foi observado que a proteína mutante retinha atividade funcional normal quando expressa

em fibroblastos e células de osteosarcoma, e desta forma era indistinguível da proteína normal (117).

Comparação entre a estrutura desta proteína P53 mutada e a proteína normal indicaram que, embora não idênticas, eram estruturalmente muito semelhantes (118). Estudos funcionais demonstraram que variações fisiológicas de pH ocasionam perda da estabilidade da proteína P53 mutada em comparação com a forma normal. Na proteína normal, o aminoácido Arg na posição 337 forma uma ponte de sal estável com o aminoácido Asp na posição 352 de um monômero P53 adjacente. A substituição do aminoácido arginina por histidina nesta posição enfraquece a ponte de sal, sugerindo ser esta disfunção pH-dependente que leva ao desenvolvimento do tumor adrenocortical em crianças (118).

Outros experimentos (*in vitro*) demonstraram que a conversão do domínio de tetramerização da proteína P53 normal e da proteína mutante 337His de um estado normal (solúvel) para um estado de fibrilas semelhante à formação amilóide ocorre em determinadas condições de pH e temperatura (119). Tanto a proteína normal quanto a forma mutada, quando incubadas em pH 4, por 1 mês, 22°C, se converteram em complexos amilóides. Apenas a forma mutada formava estes complexos em pH 4, 37°C, em 20 horas, mostrando uma predisposição maior a alterar sua conformação. Entretanto, tanto a

proteína normal quanto a proteína mutada retornavam ao estado de conformação normal quando a solução mudava de pH 4 para 8,5. Os autores propõem que a predisposição da proteína mutante em formar complexos amilóides, comparada à proteína normal, pode ser um possível mecanismo para o acúmulo nuclear da proteína P53 em tumores adrenocorticais (119).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

1. Estabelecer a freqüência da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 em adultos e crianças portadores de tumores adrenocorticais e em uma população controle.
2. Correlacionar a presença da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 com o comportamento dos tumores adrenocorticais.
3. Verificar a existência de ancestral comum (efeito fundador) para a mutação Arg337His nos pacientes brasileiros com tumores adrenocorticais.
4. Analisar a perda de heterozigose para o *locus p53* nos pacientes portadores da mutação Arg337His do supressor tumoral P53.
5. Estabelecer o mapa de deleção do cromossomo 17 em pacientes com tumores adrenocorticais associados ou não à mutação Arg337His do supressor tumoral P53.
6. Verificar a ocorrência de instabilidade cromossômica e correlacioná-la com o comportamento dos tumores adrenocorticais.

CASUÍSTICA

3. CASUÍSTICA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (protocolo de pesquisa No. 720/03).

Foram estudados 71 pacientes (41 adultos e 30 crianças) não relacionados, portadores de tumores adrenocorticais isolados, atendidos no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Nenhum dos pacientes selecionados apresentava histórico familial compatível com a síndrome de Li-Fraumeni.

Entre os adultos a idade cronológica média foi de 33,9 ± 10,7 anos (17 a 55 anos). Trinta e sete indivíduos eram do sexo feminino e 4 do sexo masculino. Entre as crianças a idade cronológica média foi de 3,1 ± 3,3 anos (0,6 a 15 anos). Vinte e três eram do sexo feminino e 7 do sexo masculino.

Tumores adrenocorticais funcionantes foram identificados em 68/71 (95,5%) dos pacientes. No grupo adulto 21 pacientes apresentavam síndrome de Cushing, 11 quadro clínico misto (Cushing e

virilização ou Cushing e feminilização), 5 virilização e 1 feminilização. No grupo pediátrico, 21 pacientes apresentavam virilização, 7 quadro clínico misto (virilização associada à síndrome de Cushing) e 2 com síndrome de Cushing.

Critérios histopatológicos definidos por Weiss (120) foram utilizados para avaliação prognóstica e estão descritos na TABELA 1. A doença foi classificada em estadio I a IV de acordo com os critérios propostos por Sullivan (121), adaptados de Macfarlane (122) (TABELA 2). Um critério preciso de malignidade foi estabelecido pela combinação das seguintes características: estadiamento ≥ 3, escore de Weiss ≥ 4, presença de metástases ou evolução fatal.

Estudos prévios têm claramente demonstrado que o critério de Weiss isolado não é útil na classificação de malignidade dos tumores adrenocorticais no grupo pediátrico (123). Portanto, malignidade neste grupo foi considerado de acordo com o estadiamento tumoral ou evolução desfavorável.

Entre os 71 pacientes estudados, 46 foram considerados como portadores de adenomas e 25 como carcinomas. Os dados clínicos, histológicos e evolutivos relativos aos pacientes encontram-se descritos nas TABELAS 3 e 4.

Foram também estudados 44 parentes assintomáticos, com idade variando entre 4 e 60 anos, de 14 pacientes. Um grupo controle foi

constituído por 160 indivíduos brasileiros (incluindo 30 crianças), caucasóides e não relacionados.

MÉTODOS

4. MÉTODOS

4.1 Extração de DNA

DNA genômico foi obtido de 71 pacientes, 44 familiares e 160 indivíduos controle. Em 38 pacientes, o DNA foi obtido de sangue periférico e de tecido tumoral (21 crianças e 17 adultos). Em 33 casos foi disponível apenas DNA de origem tumoral (24) ou de sangue periférico (9). Um único paciente apresentou tumor adrenocortical bilateral e DNA genômico das duas adrenais foi disponibilizado para estudo.

4.1.1 Sangue periférico

DNA genômico foi obtido a partir de 15 mL de sangue periférico, colhidos com 25 mM de ácido etileno diaminotetracético (EDTA). A técnica utilizada foi a de extração com sal (*salting-out*) (124). Estas amostras de DNA fazem parte do Banco de DNA do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular – LIM 42.

4.1.2 Tecido tumoral

Amostras de tecido tumoral de 46 pacientes foram coletadas durante o procedimento cirúrgico em microtubos secos, sob condições estéreis. As amostras foram derivadas da porção central do tumor de cada paciente, visando minimizar a possibilidade de contaminação com tecido normal. Estas amostras foram então preservadas em nitrogênio líquido até o momento da extração de DNA.

A extração do DNA genômico de tecidos preservados em nitrogênio líquido foi realizada utilizando-se *kit*s comerciais de extração de DNA QIAamp DNA Mini *Kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) e Wizard ® Genomic DNA Purification *Kit* (Promega Madison, USA).

Para os tecidos tumorais preservados em parafina (16 casos) foram obtidas secções equivalentes a 10 µm em microtubos de 1,5 mL. A estes tubos foi adicionado 1 mL de xilol pré-aquecido em estufa a 95°C. Os microtubos foram agitados e colocados em estufa a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram centrifugados por 5 minutos a 15000 x g e o sobrenadante descartado. Para eliminação eficaz da parafina os passos anteriores foram repetidos por mais 2 vezes. As amostras foram então submetidas a duas lavagens com 500 µL de etanol absoluto para a retirada do solvente orgânico. Após cada adição de etanol absoluto os microtubos foram centrifugados 5 minutos, a 13000 x g a 4°C e o

sobrenadante descartado. As amostras foram secas invertendo os microtubos em papel absorvente. Para a extração do DNA, a cada microtubo foi adicionado 20 µL de proteinase K (10 mg/mL) e 480 µL de solução constituída por 2,5 mL de Tris HCl 1M pH 8,0; 500 µL EDTA 0,5M pH 8,0; 250 µL de Tween 20 e 46,75 mL de água deionizada. As amostras foram então incubadas por 18 horas a 37°C.

Foram realizadas duas extrações com 500 µL de fenol-clorofórmio. Os tubos foram invertidos cuidadosamente e centrifugados 2 minutos a 13000 x g a 4°C. O sobrenadante foi transferido para novo microtubo e nova extração (v/v) com fenol-clorofórmio foi realizada. Foram adicionados 40 µL de acetato de sódio 3M e 1 mL de etanol absoluto gelado misturando-se delicadamente. As amostras foram mantidas por 24 horas, a -20°C, para precipitação do DNA. Em seguida os tubos foram centrifugados por 10 minutos, a 13000 x g a 4 °C e o sobrenadante descartado. Os tubos foram invertidos sobre papel absorvente para secagem do material. Depois de seca, cada amostra foi ressuspensa em 50 µL de TE 10:0,1 (Tris-HCl 10mM pH 8,0 ; EDTA 0,1mM pH 8,0) e estocadas a -20°C.

4.2 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A reação de polimerização em cadeia (PCR) foi realizada para amplificação:

- do exon 10 do gene supressor tumoral *p53* em DNA de origem tumoral e/ou de sangue periférico dos 71 pacientes, em DNA de sangue periférico de 44 familiares e 160 indivíduos do grupo controle para pesquisa da mutação Arg337His.
- de toda a região codificadora do gene *p53* em DNA de sangue periférico e tumoral de 4 pacientes.
- de microssatélites para estudo de efeito fundador em DNA de sangue periférico e tumoral de 22 pacientes portadores da mutação, de sangue periférico de 24 parentes de 1º grau e 60 indivíduos controle.
- de microssatélites para estudo do mapa de deleção do cromossomo 17 em DNA de sangue periférico e tumoral de 29 pacientes.
- de microssatélites para análise de instabilidade cromossômica em DNA de sangue periférico e tumoral de 17 pacientes.

As seqüências dos *primers* utilizados, temperatura de *annealing* e tamanho do fragmento amplificado para a região codificadora do gene *p53* estão descritos na TABELA 5.

A localização dos microssatélites no cromossomo, o núcleo de repetição, os *primers* utilizados, temperatura de *annealing* e tamanho dos fragmentos amplificados para os marcadores do cromossomo 17 encontram-se na TABELA 6 e para os marcadores dos cromossomos 2, 9 e 11 na TABELA 7. Os *primers sense*, utilizados na análise de microssatélites, foram marcados com fluorescência (6-FAM™ ou TET™) na sua extremidade 5'.

Em um volume final de 15-50 μL foram utilizados de 100-500 ng de DNA genômico, 200 μM de cada desoxinucleotídeo (dNTP), 10-30 pmol de cada *primer*, 0,8-2,5U de enzima *Taq* DNA polimerase (Amersham, Pharmacia, Upsala, Suécia) e tampão de reação fornecido pelo fabricante. A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O protocolo de amplificação consistiu de um ciclo de 5 minutos a 94°C seguido de 35 ciclos de 94°C por 30 seg, temperatura de *annealing* variando de acordo com os *primers* por 30 seg e 72°C por 30 seg, seguindo-se um ciclo de extensão final de 72°C por 10 minutos (30 minutos na amplificação dos microssatélites).

Os fragmentos amplificados para a pesquisa da mutação Arg337His no gene *p53* foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo (0,5 µg/mL de gel) (Invitrogen™ Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) utilizando-se como marcador de peso molecular ΦX 174/*Hae* III (Invitrogen, Life Technology, Gaithersburg, MD, USA). As amostras foram visualizadas sob transiluminação em luz ultravioleta e fotografadas com filme instantâneo preto e branco (Polaroid 667).

Para análise de microssatélites, 2 µL do produto de PCR, juntamente com 24 µL de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e 1 µL de marcador de peso molecular TAMRA 350 ou ROX 350 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) foram submetidos à eletroforese capilar em seqüenciador automático ABI Prism Genetic Analyzer 310 ou 3100 Automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e analisados pelo programa de análise de fragmentos GeneScan.

4.3 Sequenciamento Automático

Os produtos amplificados do exon 10 em DNA de origem tumoral e/ou de sangue periférico dos 71 pacientes, em DNA de sangue

periférico dos 44 familiares e de 60 indivíduos do grupo controle, para pesquisa da mutação Arg337His, além do produto de amplificação de toda a região codificadora do gene *p53* em DNA de sangue periférico e tumoral de 4 pacientes foram submetidos à purificação enzimática utilizando-se 2 μL de ExoSap-IT (exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão, Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA) para cada 5 μL de produto de PCR, por 15 minutos a 37°C, seguido de 15 minutos a 80°C.

A reação de sequenciamento foi realizada em termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) utilizando-se o *kit* BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante.

O produto da reação de sequenciamento foi purificado em colunas Centri Sep (Princeton Separation, Adelphia, New Jersey, USA) e submetido à eletroforese capilar e analisado em seqüenciador automático ABI Prism 310 ou 3100 Genetic Analyzer Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

4.4 Digestão enzimática

O produto de amplificação para o estudo do exon 10 resulta em um fragmento de 330 pb. A enzima *Hha* I (GIBCO BRL®, Life Technology, MD, USA) reconhece a seqüência 5'GCG↓C 3' que está presente na seqüência normal deste exon. A mutação Arg337His elimina o sítio de restrição da enzima e, portanto pode ser rastreada através de digestão enzimática. O produto de PCR de indivíduos homozigotos normais, após a digestão apresenta 2 fragmentos, 170 e 160 pb, enquanto que produto de PCR de indivíduos portadores da mutação Arg337His, em homozigose, não sofrem digestão e apresentam um único fragmento (330 pb). Produto de PCR de indivíduos heterozigotos apresenta fragmentos de 330, 170 e 160 pb.

Digestão enzimática para pesquisa da mutação Arg337His do P53 foi realizada em DNA genômico de 100 indivíduos controle. O protocolo consistiu na adição de 5 μL de produto de amplificação do exon 10 a 0,3U de enzima *Hha* I e 1 μL do tampão fornecido pelo fabricante (GIBCO BRL®, Life Technology, MD, USA) em um volume final de 10 μL. O produto de PCR foi digerido por 2 horas a 37°C, submetido a eletroforese em gel de agarose 2% com brometo de etídeo utilizando-se como marcador de peso molecular ΦX 174/*Hae* III e fotografado com filme instantâneo preto e branco (Polaroid 667).

4.5 Estudo de microssatélites

Para o estudo de efeito fundador foram analisados 2 marcadores polimórficos intragênicos $(VNTRp53)_n$ e $P53(CA)_n$ em DNA de sangue periférico e/ou tumoral de 22 pacientes portadores de tumores adrenocorticais, 24 parentes de 1º grau e 60 indivíduos do grupo controle.

Além do marcador intragênico $(VNTRp53)_n$ foram selecionados mais 5 (D17S926, D17S1856, D17S942, D17S1351 e D17S928) para o estudo do mapa de deleção do cromossomo 17 em DNA de sangue periférico e tumoral de 29 pacientes portadores de tumores adrenocorticais.

Estes marcadores se estendem em um intervalo de 135.05 cM desde a região 17p13.3 até 17q25.3 e foram selecionados a partir do Généthon Microsatellite Map Database (http://www.genlink.wustl.edu).

Para a análise de instabilidade cromossômica, em 17 pacientes, foram selecionados marcadores localizados nos cromossomos 2, 9 e 11 a partir do *kit* ABI Prism® Linkage Mapping Set (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) que foram submetidos à amplificação de acordo com as especificações do fabricante.

4.5.1 Determinação da perda de heterozigose

O produto de amplificação de cada alelo, analisado através do *software GeneScan*, é visualizado graficamente como um pico de altura correspondente à intensidade da amplificação (fluorescência). Perda de heterozigose foi definida quando um dos alelos (picos) presente no DNA do sangue periférico estava ausente no DNA de origem tumoral. Entretanto, a evidência de um padrão de amplificação menor, mas não ausente de um dos alelos também foi indicativa de perda de heterozigose.

É possível estabelecer uma razão entre o grau de amplificação dos 2 alelos presentes no DNA de sangue periférico. Quando esta razão se mantém semelhante no tumor não há perda de heterozigose (Figura 5A). Por outro lado, uma razão diferente (Figura 5B) é indicativa da perda de heterozigose, que pode ser avaliada aplicando-se a seguinte fórmula:

$$\frac{\text{razão entre amplificação dos alelos no tumor}}{\text{razão entre amplificação dos alelos no sangue}}$$

Valores maiores que 2,0 ou menores que 0,5, indicam a perda de intensidade de amplificação de 1 dos 2 alelos no tecido tumoral, quando

comparado ao sangue periférico, indicando a perda de heterozigose (LOH).

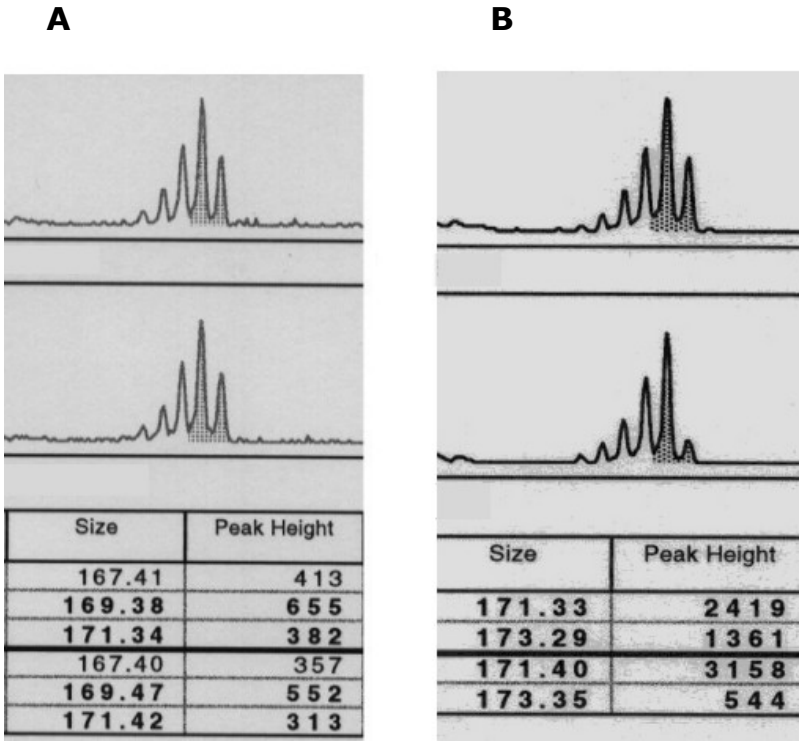

Figura 5 - Exemplo de análise comparativa entre a amplificação de dois alelos presentes em DNA de sangue periférico (painel superior) e em DNA de origem tumoral (painel inferior).
(A) ausência de perda de heterozigose, a razão entre a amplificação dos alelos em ambos os tecidos é mantida. (B) perda de heterozigose, a razão entre a amplificação dos alelos nos 2 tecidos não se mantém

4.6 Análise estatística

Os dados referentes à distribuição por faixa etária foram apresentados em média ± DP e intervalo.

Os dados referentes à associação entre os alelos dos marcadores intragênicos com a mutação Arg337His (variáveis independentes) foram analisados em tabela de contingência pelo teste de qui-quadrado seguidas por teste de Haberman para localizar categorias responsáveis por valores estatisticamente significativos.

A análise dos dados referentes à instabilidade cromossômica foi realizada em tabela de contingência aplicando o teste de qui-quadrado com correção de Yates ou teste exato de Fisher.

Em todas as comparações foi considerado significativo $P < 0,05$.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 Presença da mutação Arg337His

a. Pacientes com tumores adrenocorticais

O sequenciamento automático do exon 10 do gene *p53* em DNA de sangue periférico e/ou tecido tumoral de 71 pacientes portadores de tumores adrenocorticais demonstrou a substituição do nucleotídeo G (guanina) por A (adenina), resultando na substituição do aminoácido Arginina por Histidina na posição 337 da proteína supressora tumoral P53 em 29 pacientes com tumores adrenocorticais (2, 6, 24, 25, 31, 42-54, 56-60, 62, 65-68 e 71, TABELAS 3 e 4).

A mutação Arg337His foi evidenciada em 24 de 30 (80%) pacientes do grupo pediátrico, sendo 20 portadores de adenomas e 4 de carcinomas. No grupo adulto, esta mutação estava presente em 5/41 (12%) pacientes sendo 4 portadores de carcinomas e 1 de adenoma.

Em 38 de 71 pacientes foi possível o estudo tanto de DNA de sangue periférico quanto DNA de tecido tumoral. A mutação Arg337His

foi evidenciada, em DNA de sangue periférico, em 21 destes 38 casos. Perda de heterozigose para este *locus* estava presente em 18 dos 21 casos (pacientes 24, 42, 43, 46-48, 50-54, 57, 58, 60, 65, 67, 68 e 71, TABELAS 3 e 4). Os pacientes 2 e 25 não sofreram LOH e o paciente 44 apresentou a mutação em homozigose em DNA de sangue periférico. Nos demais pacientes (33/71 casos) a mutação Arg337His foi observada em hemizigose em DNA de tecido tumoral (1/24 casos) e em heterozigose no DNA de sangue periférico (7/9 casos).

b. Familiares Assintomáticos e Controles

O estudo do exon 10 do gene *p53* foi realizado em DNA de sangue periférico de 44 parentes assintomáticos pertencentes a 14 famílias não relacionadas. Em 10 famílias foi possível obter DNA de ambos os pais e demonstrou-se que a mutação foi herdada de pelo menos um deles. Em 4 famílias só houve disponibilidade de DNA de apenas 1 dos pais sendo que estes não eram portadores da mutação.

Todos os familiares portadores da mutação Arg337His, em heterozigose, não desenvolveram quadro tumoral até o momento, exceto o pai do paciente 67 que desenvolveu um adenocarcinoma de pulmão com evolução fatal. O DNA tumoral deste caso não foi disponível.

A mutação Arg337His não foi encontrada em DNA de sangue periférico de 160 indivíduos do grupo controle, analisado por sequenciamento automático (60 indivíduos) ou digestão enzimática (100 indivíduos) (Figuras 6 e 7).

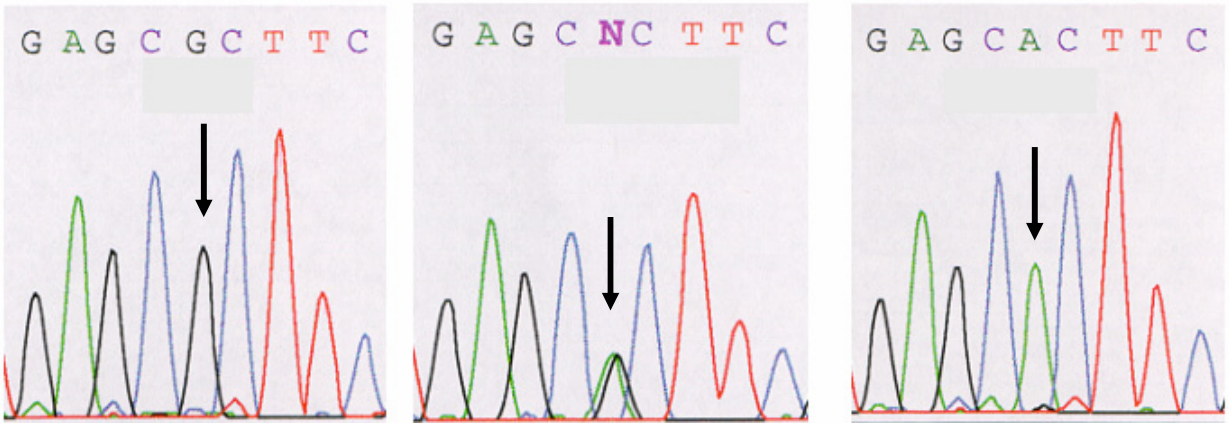

Figura 6 - Sequenciamento automático da região do exon 10 que contém a mutação Arg337His, revelando a troca de G>A. As setas indicam em A: Seqüência normal; B: Mutação em heterozigose; C. Mutação em homozigose

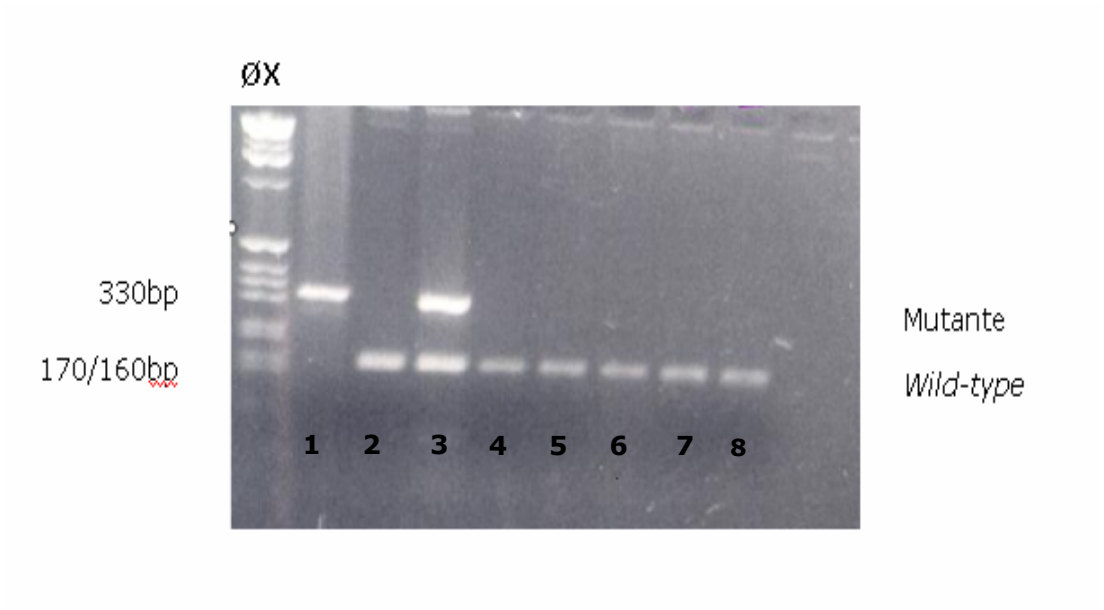

Figura 7 - Digestão com a enzima *Hha* I
1: indivíduo homozigoto para a mutação Arg337His, que perde o sítio de restrição e exibe um único fragmento de 330 pb; 2, 4-8: indivíduos controle que exibem o padrão normal de restrição, com 2 fragmentos (170 pb e 160 pb); 3: indivíduo portador da mutação em heterozigose, que perde o sítio de restrição em 1 alelo e exibe o fragmento de 330 pb além dos 2 fragmentos normais

5.2 Estudo de microssatélites

5.2.1 Análise de efeito fundador

Para o estudo de efeito fundador foram analisados 2 marcadores polimórficos intragênicos $(VNTRp53)_n$ e $P53(CA)_n$ em DNA de sangue periférico e tumoral de 22 pacientes portadores de tumores adrenocorticais e em 24 parentes de 1º grau, além de 60 indivíduos do grupo controle.

Identificamos seis alelos diferentes para o marcador VNTRp53, variando de 112 a 127 pb. A distribuição e a freqüência destes alelos encontram-se na TABELA 8. Cinco deles (117-137 pb) já haviam sido previamente descritos (31). Um novo alelo, correspondendo a 112 pb foi identificado na nossa população (125). O alelo correspondente a 122 pb, contendo 7 unidades de repetição, foi identificado em 25 dos 44 alelos (56,8%) dos pacientes com tumores adrenocorticais associados à mutação Arg337His. Análise familial demonstrou associação deste alelo com a mutação Arg337His. Diferentemente, este mesmo alelo foi encontrado em apenas 22 dos 120 alelos (18,3%) dos indivíduos controle (125).

No estudo do marcador P53$(CA)_n$, identificamos dezesseis alelos diferentes variando de 102 a 134 pb (TABELA 8). O alelo de 122 pb foi encontrado em 24 dos 44 alelos (54,5%) dos pacientes com tumores adrenocorticais associados à mutação Arg337His. Este mesmo alelo foi encontrado em apenas 17 dos 120 alelos (14,2%) dos indivíduos controles (125).

A comparação da distribuição dos alelos nos 2 grupos (pacientes e controle) seguida por teste de Haberman indica que os alelos com 122 pb dos dois marcadores VNTRp53 e P53CA foram as categorias responsáveis pelos valores estatisticamente significativos (P=0,004).

Análise destes 2 marcadores evidenciou um mesmo haplótipo, associado à mutação Arg337His, para o *locus p53* em 20 de 22 (91%) dos pacientes brasileiros com tumores adrenocorticais (125).

5.2.2 Mapa de deleção do cromossomo 17

O estudo de 6 marcadores (D17S926, VNTRp53, D17S1856, D17S942, D17S1351 e D17S928) ao longo do cromossomo 17 foi realizado em DNA genômico pareado de 29 pacientes (10 portadores de carcinomas e 19 de adenomas), dos quais 16 eram portadores da mutação Arg337His. Um único paciente (67) desenvolveu tumor bilateral e foi analisado DNA de ambos os tumores.

Perda total do cromossomo 17 foi evidenciada em 17 dos 29 (59%) pacientes (12, 24, 37, 40, 42, 43, 46-48, 50, 51, 53, 54, 64, 67, 68 e 71). O paciente 67 exibiu perda da mesma cópia do cromossomo 17 em ambos os tumores.

Entre os 16 pacientes portadores da mutação Arg337His, a perda do cromossomo 17 foi identificada em 13 (81%), sendo 12 do grupo pediátrico e 1 adulto (Figura 8A). Entre os 13 pacientes que não apresentavam a mutação, 4 (31%) exibiram a perda do cromossomo 17 sendo 3 adultos e 1 criança (pacientes 12, 37, 40 e 64) (Figura 8B). Toda a região codificadora do gene *p53* foi amplificada e submetida a sequenciamento nestes 4 pacientes e nenhuma mutação foi encontrada

(126). A perda do cromossomo 17 foi identificada em tumores benignos (11 de 19 casos) e malignos (6 de 10 casos), sendo mais prevalente nos adenomas.

O paciente 44, portador da mutação Arg337His em homozigose, não exibiu perda de heterozigose para 4 marcadores estudados, sendo os marcadores VNTRp53 e D17S1856 não informativos. O paciente 41 mostrou perda alélica para o *locus* VNTRp53 e foi não-informativo para os outros cinco marcadores (126).

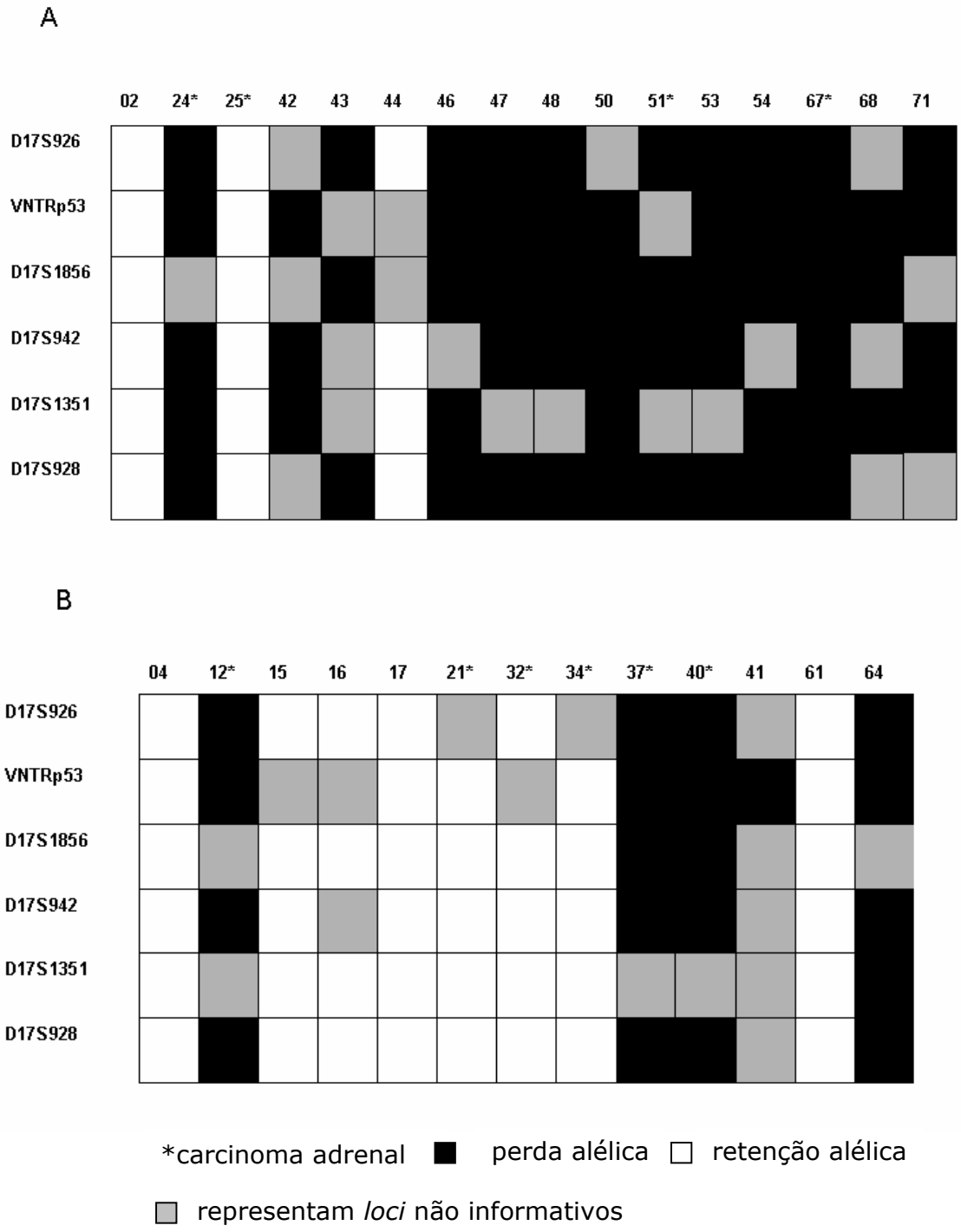

Figura 8 - Mapa de deleção do cromossomo 17 utilizando 6 marcadores polimórficos. A: 16 pacientes com tumores adrenocorticais associados à mutação Arg337His do gene supressor tumoral *p53*. B: 13 pacientes com tumores adrenocorticais não portadores da mutação. Os pacientes 12, 24, 37, 40, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 64, 67, 68 e 71 exibiram perda total do cromossomo 17

5.2.3 Instabilidade cromossômica

A análise de instabilidade cromossômica foi realizada através do estudo de 4 marcadores ao longo dos cromossomos 2, 9 e 11 no DNA dos 17 pacientes (12, 24, 37, 40, 42, 43, 46, 47, 48, 50, 51, 53, 54, 64, 67, 68 e 71) que sofreram perda do cromossomo 17. (126)

Instabilidade cromossômica para estes 3 cromossomos foi demonstrada em DNA tumoral de 12 pacientes. Perda cromossômica total ou parcial envolveu o cromossomo 2 em 8 casos (12, 24, 40, 42, 46, 64, 67 e 68) sendo 5 carcinomas e 3 adenomas, o cromossomo 11 em 12 casos (12, 24, 37, 40, 42, 46, 50, 51, 53, 64, 67 e 68) sendo 7 carcinomas e 5 adenomas. A perda completa do cromossomo 9 foi exclusivamente observada em carcinomas (12, 24, 37, 40, 51, 53, 64, 67) (TABELA 9) (126), sendo esta associação estatisticamente significante ($P < 0,001$). Instabilidade de microssatélite para qualquer dos marcadores analisados não foi observada em nenhum dos DNAs tumorais em todos os casos analisados.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A proteína P53 é um fator de transcrição cuja principal função é a manutenção da integridade do genoma. Mutações no gene *p53* são encontradas em aproximadamente 50% de todos os tumores humanos, envolvendo mais de 50 tipos celulares ou tecidos, indicando que há uma poderosa força seletiva atuando no sentido de perda de função deste gene durante a progressão tumoral. A grande maioria das mutações do gene *p53* descritas em tumores ocorre em quatro áreas, correspondendo aos exons 5 a 8, região bastante conservada, o domínio de ligação ao DNA (27, 110, 127).

Neste trabalho estudamos o exon 10 do gene *p53* em 71 pacientes portadores de tumores adrenocorticais. Identificamos uma única mutação, Arg337His, em 29 (41%) destes pacientes. Esta mutação foi detectada em 24 de 30 (80%) crianças confirmando sua elevada incidência em crianças brasileiras com tumores adrenocorticais previamente reportada (117). Entretanto, esta mutação não está

restrita ao grupo pediátrico, uma vez que 5 de 41 (12%) adultos com tumores adrenocorticais apresentaram a mesma mutação.

Mutações no mesmo códon foram identificadas em diversas formas tumorais, como osteosarcoma (128), cólon (129), pulmão (130), gliomas (131), mama (132) e esôfago (133). Entretanto, a mutação específica Arg337His foi somente identificada em tumores adrenocorticais isolados (113, 117) e em 1 caso associado à síndrome de Li-Fraumeni (114).

Transições G-C para A-T nos dinucleotídeos CpG são consideradas fonte importante de mutações espontâneas em diversas neoplasias humanas (134). Este mecanismo ocorre em aproximadamente um quarto de todas as mutações somáticas no gene *p53* em tumores humanos (135). Deaminação espontânea ou induzida de 5-metilcitosina no sítio CpG do códon 337 pode ter resultado em transição G→A, ocasionando a substituição de arginina (C**G**C) por histidina (C**A**C) na proteína.

Esta mutação não foi identificada nos 160 indivíduos controle (320 alelos) de nossa série indicando que esta mutação não está difundida na população brasileira, sugerindo sua participação no processo de tumorigênese adrenocortical. Resultado semelhante foi encontrado em estudo prévio envolvendo crianças da região sul do Brasil (117).

A mutação Arg337His foi transmitida por pelo menos 1 dos pais em 10 de 14 famílias indicando, claramente seu caráter hereditário. Entre os familiares portadores da mutação, não houve evidência de surgimento de tumores até os 40 anos de idade. Aparentemente, esta mutação confere baixa penetrância para o desenvolvimento de tumores adrenocorticais. Um único indivíduo masculino, 48 anos, pai do paciente 67, heterozigoto para a mutação, apresentou adenocarcinoma de pulmão.

Apenas 3 das 24 crianças portadoras de tumores adrenocorticais associados à mutação Arg337His (51, 57 e 67 TABELA 2) desenvolveram metástases e/ou óbito. Entre os 41 adultos, 19 desenvolveram carcinoma, sendo que apenas 3 (24, 25 e 31, TABELA 1) exibiram a mutação Arg337His. Estes dados sugerem que esta mutação não está relacionada a prognóstico desfavorável na maioria dos pacientes com tumores adrenocorticais. Contrariamente, a maioria dos estudos envolvendo outras mutações do gene *p53* demonstram uma relação positiva entre a presença de *p53* mutado e pior prognóstico (http://www.iarc.fr/p53).

Nos seres humanos, após 10-15 semanas de gestação, a glândula adrenal fetal é desproporcionalmente aumentada e exibe extraordinário crescimento e atividade estereidogênica em um compartimento cortical especializado conhecido como zona fetal. A zona fetal representa 85%

do córtex adrenal durante o desenvolvimento fetal e suas células exibem características típicas de células secretoras de esteróides, principalmente sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) (136). Após o nascimento ocorre remodelação significativa do córtex adrenal, incluindo apoptose da zona fetal pós-natal e zonação do córtex definitivo na puberdade (137).

Nas crianças portadoras de tumores adrenocorticais, a manifestação precoce da doença, a predominância do quadro clínico de virilização e as feições histopatológicas do tumor sugerem que estes tumores se originam a partir do córtex adrenal fetal (137).

Podemos destacar que a grande maioria (83%) das crianças desta série foi diagnosticada antes dos 3 anos de idade. Alguns destes pacientes exibiram história de virilização desde o nascimento ou durante o primeiro ano de vida. É plausível que a presença de uma mutação constitutiva do gene *p53* aumente a penetrância dos tumores adrenocorticais no córtex adrenal fetal, mas não no córtex adrenal definitivo. Em indivíduos com mutações constitutivas no gene *p53*, membros de família com predisposição a câncer (Li-Fraumeni), tumores adrenocorticais usualmente ocorrem somente durante a primeira década de vida (138).

A mutação Arg337His está contida no domínio de tetramerização da molécula P53 e fora da área considerada *hot spot,* freqüentemente

estudada. Mutações neste domínio têm um papel chave na transformação celular (70) e provavelmente deve acarretar em perda de função por ausência de estabilidade do tetrâmero P53. Estudos funcionais envolvendo o domínio de tetramerização da proteína P53 com a mutação Arg337His demonstraram que variações fisiológicas de pH ocasionam perda da estabilidade da proteína mutada em comparação com a forma normal, sugerindo ser esta disfunção pH-dependente que leva ao desenvolvimento do tumor adrenocortical em crianças (118).

Em função da forte associação entre mutações no gene *p53* e diagnóstico de tumores adrenocorticais o estudo deste gene deve ser considerado. Entretanto, apenas as regiões consideradas *hot spot* têm sido estudadas na busca de alterações somáticas ou germinativas deste gene em pacientes portadores de tumores adrenocorticais de outros países (139). Novos estudos moleculares envolvendo o exon 10 do gene *p53* em pacientes com tumores adrenocorticais poderão elucidar se a mutação Arg337His do P53 representa um defeito genético de ampla prevalência.

Demonstramos a co-segregação entre dois alelos distintos, intragênicos e a mutação Arg337His em pacientes brasileiros com tumores adrenocorticais. As freqüências alélicas foram significativamente diferentes entre os pacientes portadores da mutação e indivíduos controle. Estes dados sugerem que a mutação Arg337His

originou-se de um ancestral comum. Contrariamente, um estudo brasileiro, prévio, estudando 2 marcadores flanqueando o *locus p53* (D17S1832 e D17S786) e 2 marcadores intragênicos, em 17 crianças portadoras de tumores adrenocorticais não evidenciou uma origem comum da mutação Arg337His (117).

A análise do DNA de sangue periférico e de origem tumoral de nossos pacientes demonstrou elevada incidência (86%) de perda de heterozigose envolvendo o gene *p53.* Este resultado está de acordo com o modelo clássico de atuação do gene supressor tumoral, onde para sua inativação, um alelo mutado é herdado e o alelo remanescente é perdido, seja por um mecanismo de deleção ou por sofrer um segundo evento mutacional (140).

Perda de heterozigose é uma das alterações genéticas mais comumente observadas em tumores humanos. Muitos mecanismos básicos têm sido considerados para explicar a perda de heterozigose: não disjunção mitótica, perda de um segmento cromossômico resultante de um evento de deleção, recombinação mitótica entre dois cromossomos homólogos, recombinação entre 2 cromossomos não homólogos (translocação) e conversão gênica (141). Sabe-se que estas alterações cromossômicas são requeridas para a transformação maligna. Muitas investigações têm se concentrado em definir regiões mínimas de

perdas de cromossomos específicos em vários tumores num esforço de identificar envolvimento de possíveis genes supressores tumorais (141).

Perda de alelos na região 17p foi primeiramente demonstrada em tumores adrenocorticais malignos e suas metástases, mas não em tumores benignos do córtex adrenal (101). A presença de aberrações cromossômicas detectadas por hibridização genômica comparativa revelou perdas envolvendo o cromossomo 17p em aproximadamente 50% dos carcinomas adrenocorticais, sugerindo que esta região pode conter genes com papel relevante no desenvolvimento destes tumores (85, 90). Resultados semelhantes foram obtidos em estudos envolvendo tumores de mama, cólon, pulmão, glioblastomas e carcinomas adrenocorticais (142-144).

Alterações genéticas como perda de heterozigose envolvendo os cromossomos 17p13 e 11p15 associadas à expressão aumentada de IGF2 foram associadas à malignidade em tumores adrenocorticais isolados (145) sendo a perda de heterozigose para 17p13 o melhor preditor de sobrevida curta livre de doença com um significado prognóstico independente (145).

No presente estudo analisamos a perda do cromossomo 17 em DNA de tecido tumoral de 29 pacientes brasileiros com tumores adrenocorticais benignos e malignos incluindo 16 pacientes com a mutação Arg337His. Uma freqüência elevada (81%) de perda completa

do cromossomo 17 foi evidenciada nos pacientes com a mutação Arg337His.

Em tumores de cólon, é freqüentemente observada mutação em um alelo do gene *p53* e perda do alelo remanescente em função da perda do braço curto do cromossomo 17. Dados semelhantes foram observados em tumores de pulmão, mama e cérebro (26). Estes dados suportam a hipótese de que o alelo normal do *p53* inibe a progressão tumoral e a sua remoção seria a pressão seletiva que leva à perda do cromossomo 17 nestes tumores (146). De maneira semelhante, esta hipótese poderia explicar a incidência elevada de perda do cromossomo 17 associada à mutação Arg337His nos tumores adrenocorticais desta série.

Em quatro pacientes deste estudo, sem a mutação Arg337His e com perda do cromossomo 17, nenhuma mutação foi encontrada após sequenciamento de toda a região codificadora do gene *p53.* Estes dados são semelhantes a um estudo em que a perda do cromossomo 17p, sem evidência de inativação de P53, foi encontrada em metade dos pacientes portadores de leucemia mielóide crônica, sugerindo que a perda do braço curto do cromossomo 17 precedeu a inativação de P53 (147).

Em nosso estudo, a perda total do cromossomo 17 ocorreu tanto em tumores benignos quanto malignos, sendo mais prevalente em

adenomas, mostrando que não há correlação entre perda do cromossomo 17 e agressividade tumoral nestes pacientes (126).

Hibridização genômica comparativa (CGH) tem sido usada em citogenética molecular e permite identificar ganhos ou perdas de material cromossômico em DNA de origem tumoral. Em 22 tumores adrenocorticais de indivíduos adultos foi observado que carcinomas adrenais freqüentemente exibiam perdas envolvendo os cromossomos 2, 11q e 17p assim como ganho nos cromossomos 4 e 5 (85). Utilizando a mesma metodologia, ganho de material cromossômico, principalmente da região 9q34 foi observado em 8 de 9 tumores adrenocorticais isolados (3 adenomas e 6 carcinomas) de crianças brasileiras (87). Amplificação desta mesma região foi confirmada em tumores adrenocorticais de crianças inglesas (88). Estes resultados não foram observados em estudos prévios envolvendo tumores de pacientes adultos (85), sugerindo diferenças genéticas na formação dos tumores entre adultos e crianças (87). Entretanto, instabilidade cromossômica tem sido observada tanto em tumores adrenocorticais benignos quanto malignos, indicando defeitos no controle do ciclo celular (89).

Anormalidades envolvendo o braço curto do cromossomo 11 têm sido implicadas na progressão dos tumores adrenocorticais. Dados publicados indicam o envolvimento desta região em etapas tardias da tumorigênese adrenocortical, associada à transição de estágio benigno

para maligno e pode com isso ser utilizada como marcador para uma melhor avaliação diagnóstica e prognostica dos tumores adrenocorticais (103). Neste cromossomo está localizado o gene IGF2 (*locus* 11p15) que é sujeito a *imprinting* materno. Perda do alelo materno com duplicação do alelo paterno deste *locus* foi freqüentemente encontrada em tumores adrenocorticais, particularmente em tumores malignos (100, 116).

Baseado nestes estudos, investigamos LOH para os cromossomos 2, 9 e 11 entre os pacientes que exibiram perda do cromossomo 17 utilizando marcadores polimórficos ao longo destes 3 cromossomos. Observamos que entre os 17 pacientes, 5 (29%) perderam apenas o cromossomo 17. Os 12 pacientes restantes perderam mais de um cromossomo. Perda dos cromossomos 2 e 11 foi evidenciada tanto em tumores benignos quanto malignos. A perda do cromossomo 9 ocorreu exclusivamente nos carcinomas, embora a perda do braço curto deste cromossomo tenha ocorrido em um paciente com adenoma (53). A concomitante perda dos cromossomos 2, 9, 11 e 17 foi encontrada nos carcinomas adrenocorticais, assim, instabilidade cromossômica envolvendo 3 ou mais cromossomos pode contribuir para definir tumores adrenocorticais malignos.

Estudos envolvendo tumores adrenocorticais em adultos e crianças tem mostrado uma ampla variedade de alterações cromossômicas

(148). Entretanto, certas regiões do genoma mostram alterações consistentes e entre elas, a região 9q34. Muito próxima a esta região (9q33.3) se encontra o gene SF-1, pertencente a família dos receptores nucleares, atuando como fator de transcrição de genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual, participação em todos os setores do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal-gonadal, regulando a produção dos hormônios esteroidais (149). Um recente trabalho, utilizando a metodologia de FISH, evidenciou aumento no número de cópias desta região em 8 de 9 tumores analisados (147). Entre os tumores que evidenciaram ganho de material, 6 deles exibiram 4 ou mais cópias do gene SF1 em até 30% das células. Estes resultados estavam de acordo com resultados prévios, onde estes mesmos tumores exibiram ganhos envolvendo a região 9q (87). Os autores relatam, entretanto, que o gene SF1 pode não ser o único gene amplificado desta região. Outros genes, incluindo VAV2, TGFβR1, TNF, podem também estar envolvidos na tumorigênese adrenocortical (147).

Em nosso trabalho encontramos uma forte associação de perda do cromossomo 9 exclusivamente nos tumores malignos. Estes resultados, fortemente indicam a presença de genes envolvidos no processo de tumorigênese adrenocortical nesta região cromossômica.

A instabilidade cromossômica é essencial para o desenvolvimento de muitos tipos de neoplasias humanas. Isto ocorre em função da

inativação de genes e proteínas que protegem o genoma por detectar e reparar lesão ao DNA. Mecanismos celulares, em especial a apoptose, que usualmente eliminam células com DNA alterado estão freqüentemente comprometidas em células tumorais; como resultado, temos a sobrevivência de uma célula mutante e possível multiplicação de descendentes similarmente mutados (1).

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

1. Confirmamos a elevada freqüência (80%) da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 em crianças com tumores adrenocorticais. Esta mutação também foi evidenciada em pacientes adultos, porém em menor freqüência (12%).

2. A ausência da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 na população controle sugere que esta alteração genética não representa um polimorfismo comum na população brasileira.

3. A presença da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 não foi associada ao comportamento maligno dos tumores adrenocorticais.

4. A presença da mutação Arg337His do supressor tumoral P53 nos parentes assintomáticos dos pacientes com tumores adrenocorticais indica o caráter hereditário desta alteração genética, porém com baixa penetrância.

5. A co-segregação de marcadores polimórficos localizados no gene *p53* com a mutação Arg337His evidenciaram um mesmo haplótipo indicando uma origem comum para esta mutação (efeito fundador).6.

Perda de heterozigose para o locus *p53* foi verificada em 86% dos pacientes com tumores adrenocorticais portadores da mutação Arg337His, indicando a inativação bialélica do gene *p53*.

7. Perda do cromossomo 17 associado à mutação Arg337His foi freqüentemente observada (81%) em pacientes com tumores adrenocorticais e não foi útil como marcador de malignidade.

8. A perda do cromossomo 17 foi freqüentemente associada à instabilidade cromossômica envolvendo os cromossomos 2, 9 e 11. A perda concomitante de 3 ou mais cromossomos correlacionou-se com o comportamento maligno dos tumores adrenocorticais.

ANEXOS

8. ANEXO A - TABELAS

TABELA 1 - CRITÉRIOS DE WEISS

1	Grau nuclear III ou IV
2	> 5 mitoses/50HPF (objetiva 40x) analisando 10 campos ao acaso em uma área de maior número de mitoses em 5 lâminas com maior número de mitoses.
3	Presença de figuras de mitose atípicas (distribuição anormal de cromossomos ou número excessivo de fuso mitótico).
4	Células claras ou vacuoladas em 25% ou menos da área tumoral.
5	Arquitetura difusa (mais do que 1/3 do tumor formando camadas de células sem padrão). Arquitetura trabecular, em cordão, coluna ou alvéolar não é considerada difusa.
6	Necrose microscópica.
7	Invasão venosa (veias devem ter musculatura lisa na parede; células tumorais formam projeções polipóides, em grupos ou camadas, na luz do vaso ou trombos tumorais polipóides cobertos por camada endotelial).
8	Invasão sinusoidal (sinusoide é um vaso endotelial alinhado na glândula adrenal com pouco tecido de sustentação; considere sómente sinusoides dentro do tumor).
9	Invasão capsular (redes ou cordões de tumor se estendendo para dentro ou através da cápsula com uma reação estromal), completa ou incompleta.

O critério de Weiss é utilizado da seguinte forma: 1 para o critério presente e 0 para o critério ausente. Escore de 4 ou mais sugere malignidade (Weiss *et al*., 1984)

TABELA 2 - ESTADIAMENTO DO CARCINOMA ADRENOCORTICAL

ESTADIO	T,N,M	DESCRIÇÃO
I	T1,N0,MO	Tumor < 5cm, restrito à glândula adrenal
II	T2,N0,M0	Tumor > 5cm, restrito à glândula adrenal
III	T1 ou T2, N1,MO T3,NO,MO	Tumor restrito à glândula adrenal com envolvimento de linfonodos locais, ou tumor se estendendo a partir da glândula adrenal, mas não invadindo órgãos adjacentes
IV	T3 OU T4,N1,M0 ou qualquer T,M1	Tumor se estendendo a partir da glândula adrenal, invadindo órgãos adjacentes e envolvendo linfonodos locais ou qualquer tumor com metástase.

T, Tumor; N, linfonodo; M, metástases; 0, negativo (Sullivan *et al*., 1978 adaptado de MacFarlane, 1958)

TABELA 3 - DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DOS ADULTOS PORTADORES DE TUMORES ADRENOCORTICAIS

PACIENTE	IDADE (Anos)	SEXO	S.E.	ESTADIO	TUMOR (g)	WEISS	SEGUIMENTO (Anos)	TERAPÊUTICA	DIAGNÓSTICO
1	29	M	C	IV	665	8	Óbito 0,4	adrenalectomia + nefrectomia	Carcinoma
2*	36	F	C	II	15	1	5	adrenalectomia	Adenoma
3	18	F	C	I	20	2	5,4	adrenalectomia	Adenoma
4	52	F	C	II	15	2	4	adrenalectomia	Adenoma
5	37	F	C	I	20	0	0,5	adrenalectomia	Adenoma
6*	34	F	V	III	1350	6	20	adrenalectomia + nefrectomia	Carcinoma
7	52	F	NF	IV	-	-	Óbito 0,9	adrenalectomia + nefrectomia + esplenectomia + ectoposide	Carcinoma
8	17	M	Fe/C	III	165	7	0,75	adrenalectomia	Carcinoma
9	33	F	C	II	15	0	NC	adrenalectomia	Adenoma
10	22	F	C	I	15	2	14	adrenalectomia	Adenoma
11	35	F	V/C	I	40	3	3	adrenalectomia	Adenoma
12	30	M	Fe	III	330	4	Óbito 1	adrenalectomia + nefrectomia + mitotane	Carcinoma
13	29	F	C	I	20	-	8,8	adrenalectomia	Adenoma
14	26	F	C	I	30	1	3,25	adrenalectomia	Adenoma
15	38	F	C	II	45	1	11	adrenalectomia	Adenoma
16	50	F	V/C	I	35	3	4	adrenalectomia	Adenoma
17	37	F	C	I	15	*1*	4,1	adrenalectomia	Adenoma
18	49	F	C	I	35	1	2,5	adrenalectomia	Adenoma
19	19	F	C	III	360	6	9	adrenalectomia + nefrectomia	Carcinoma
20	48	F	C	I	25	0	NC	Adrenalectomia	Adenoma
21	45	F	C	III	280	7	5	adrenalectomia + mitotane	Carcinoma

continua

PACIENTE	IDADE (Anos)	SEXO	S.E.	ESTADIO	TUMOR (g)	WEISS	SEGUIMENTO (Anos)	TERAPÊUTICA	DIAGNÓSTICO
22	34	M	C	I	25	1	2,75	adrenalectomia	Adenoma
23	40	F	NF	I	10	1	9,5	adrenalectomia	Adenoma
24*	18	F	V/C	IV	1000	6	Óbito 0,8	adrenalectomia + nefrectomia	Carcinoma
25*	23	F	V/C	IV	555	6	Óbito 1	adrenalectomia + cirurgia metástase pulmonar + mitotane, cisplatina e ectoposideo	Carcinoma
26	32	F	V	IV	190	4	8	adrenalectomia + nefrectomia + mitotane + pancre + ganglio	Carcinoma
27	29	F	V/C	III	550	-	Meta pul 1	Adrenalectomia + nefrectomia + esplenectomia	Carcinoma
28	55	F	C	I	23	2	3	adrenalectomia	Adenoma
29	45	F	NF	III	18 1380	4	1	adrenalectomia bilateral + esplenectomia + mitotane	Carcinoma
30	37	F	C	I	20	-	NC	adrenalectomia	Adenoma
31*	26	F	V/C	-	960	8	Óbito 0,6	Adrenalectomia + nefrectomia + gânglio + mitotane	Carcinoma
32	17	F	*V/C*	IV	825	4	7	adrenalectomia	Carcinoma
33	18	F	V/C	IV	350	7	Meta fíg 14	adrenalectomia + nefrectomia + ganglios + lisodren	Carcinoma
34	35	F	V/C *IV*		2600	-	Óbito 1,1	adrenalectomia + nefrectomia + mitotane	Carcinoma
35	34	F	V/C	III	320	6	Óbito 1,75	adrenalectomia + nefrectomia	Carcinoma
36	24	F	C	I	15	1	8,4	adrenalectomia	Adenoma
37	22	F	*V*	III	-	7	Óbito 0,8	adrenalectomia	Carcinoma
38	39	F	C	I	17	1	14	adrenalectomia	Adenoma
39	42	F	C	I	15	1	12,5	adrenalectomia	Adenoma
40	44	F	V	IV	120	8	Meta pul 0,25	adrenalectomia +nefrectomia + mitotane	Carcinoma
41	40	F	V	II	478	-	3	Adrenalectomia	Adenoma

mutação Arg337His; M, masculino; F, feminino; C, síndrome de Cushing; V, virilização; Fe, feminilização; NF, não funcionante

TABELA 4 - DADOS CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS DAS CRIANÇAS PORTADORAS DE TUMORES ADRENOCORTICAIS

PACIENTE	IDADE (Anos)	SEXO	SE	ESTADIO	TUMOR (g)	WEISS	SEGUIMENTO (Anos)	TERAPÊUTICA	DIAGNÓSTICO
42*	1,2	M	V	I	30	4	10	adrenalectomia	adenoma
43*	2,3	F	V	I	5	5	1,25	adrenalectomia	adenoma
44*	0,9	F	V/C	II	60	3	2,6	adrenalectomia	adenoma
45*	1	F	V/C	I	40	1	2,6	adrenalectomia	adenoma
46*	2,1	M	V	II	90	4	4	adrenalectomia	adenoma
47*	*2*	M	V	II	135	5	6	adrenalectomia	adenoma
48*	*2*	F	V	I	5	2	7	adrenalectomia	adenoma
49*	0,6	F	V	I	40	1	25	adrenalectomia	adenoma
50*	1,3	M	V/C	I	40	1	6	adrenalectomia	adenoma
51*	15	F	V/C	IV	1230	7	Óbito *2*	adrenalectomia + mitotane, cisplatin e ectoposide	carcinoma
52*	1,6	F	V	III	10	5	2	adrenalectomia	carcinoma
53*	*2,5*	F	V	II	55	7	4	adrenalectomia	adenoma
54*	1,6	F	V	I	-	-	4	adrenalectomia	adenoma
55	1,7	F	V	I	-	4	9	adrenalectomia	adenoma
56*	1,3	F	V	I	-	-	11,75	adrenalectomia + nefrectomia	adenoma
57*	1,6	F	V	IV	135	7	Metapul 1,25	adrenalectomia + margem do diafragma + nódulo pulmonar + lisodren	carcinoma
58*	2	F	V	II	145	1	2,6	adrenalectomia	adenoma
59*	2	F	V	I	40	6	16	adrenalectomia	adenoma
60*	1,6	F	V	II	388	5	7,6	adrenalectomia	adenoma
61	9	M	C	I	20	2	4	adrenalectomia	adenoma
62*	1,3	F	V	I	11,8	2	8	adrenalectomia	adenoma
63	1,8	F	V	I	45	2	6	adrenalectomia	adenoma

continua

continuação

PACIENTE	IDADE (Anos)	SEXO	SE	ESTADIO	TUMOR (g)	WEISS	SEGUIMENTO (Anos)	TERAPÊUTICA	DIAGNÓSTICO
64	*6*	F	V/C	III	55	7	Óbito 2	adrenalectomia + nefrectomia	carcinoma
65*	1	M	V	I	40	5	13,3	adrenalectomia	adenoma
66*	2,5	F	V	I	20	4	18	adrenalectomia	adenoma
67*	2,7	M	V	IV	2,5 8,5	4 6	3 recor 8 6	Adrenalectomia bilateral. Cirurgia para metástase pulmonar. Mitotane	carcinoma
68*	2,2	F	V/C	II	55	2	2	adrenalectomia	adenoma
69	2,2	F	V/C	II	55	2	2,2	adrenalectomia	adenoma
70	9	F	C	IV	478	7	1,6	adrenalectomia + nefrectomia + mitotane	carcinoma
71*	2,3	F	V	I	10	1	1	adrenalectomia	adenoma

* mutação Arg337His; M, masculino; F, feminino; C, síndrome de Cushing; V, virilização

TABELA 5 - P*RIMERS* PARA AMPLIFICAÇÃO DA REGIÃO CODIFICADORA DO GENE *P53:* SEQÜÊNCIA, TEMPERATURA DE *ANNEALING* E TAMANHO DO FRAGMENTOS

PRIMERS	**EXON**	**°C *ANNEALING***	**TAMANHO DO FRAGMENTO (pb)**
5′ TGACCCAGGGTTGGAAGTGTCTCAT 3′ 5′ GGACAGGAGTCAGAGATCACACATT 3′	2-4	52	650
5′ ATCTGTTCACTTGTGCCCTGACTTTC 3′ 5′ CAGTTGCAAACCAGACCTCA 3′	5-6	57	420
5′ CTCCTAGGTTGGCTCTGACT 3′ 5′ CCTGCTTGCTTACCTCGCT 3′	7-8	57	640
5′ CTCCTAGGTTGGCTCTGACT 3′ 5′ CAACCAGGAGCCATTGTCTTT 3′	7-9	55	760
5′ GCTGTATAGGTACTTGAAGTGCAG 3′ 5′ GATGAGAATGGAATCCTATG 3′	10	52	330
5′ GCCTTAGGCCCTTCAAAGCATT 3′ 5′ TGACCCCAGTAGCCTGCACTGGCGT 3′	11	55	1200

TABELA 6 - CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES POLIMÓRFICOS DO CROMOSSOMO 17

MARCADOR	*LOCUS*	UNIDADE DE REPETIÇÃO	TAMANHO (pb)	*°C ANNEALING*	*PRIMERS*
D17S926	17p13.3	$(CA)_n$	243-260	65	5' GCAGTGGGCCATCATCA 3' 5' CCGCAGAAGGCTGTTGT 3'
VNTRP53	17p13.1	$(AAAAT)_n$	112-137	62	5' CTCCAGCCTGGGCAATAAGAGCT 3' 5' CAAAACATCCCCTACCAAACAGC 3'
P53CA	17P13.1	$(CA)_n$	102-134	62	5' AGGGATACTATTCAGCCCGAGGTG 3' 5' ACTGCCACTCCTTGCCCCATTC 3'
D17S1856	17p12	$(CA)_n$	105-123	60	5' GCTGAGATGGTGCCACTG 3' 5' CATGGAAGACAATTTTGCG 3'
D17S942	17q23.3	$(CA)_n$	168-176	60	5' TGATGCCAAGATTTTTTAC 3' 5' GATTCTATTTCCCTAATATACTG 3'
D17S1351	17q24.3	$(CA)_n$	171-181	60	5' CAAAGTCCTAAAGGTGGG 3' 5' TTTCAGGCAAATAAGGCAG 3'
D17S928	17q25.3	$(CA)_n$	135-165	60	5' TAAAACGGCTACAACACATACA 3' 5' ATTTCCCCACTGGCTG 3'

TABELA 7 - CARACTERIZAÇÃO DOS MARCADORES POLIMÓRFICOS DOS CROMOSSOMOS 2, 9 E 11

MARCADOR	*LOCUS*	UNIDADE DE REPETIÇÃO	TAMANHO (pb)
D2S2211	2p25.1	$(CA)_n$	236-258
D2S367	2p22.3	$(CA)_n$	306-340
D2S364	2q32.1	$(CA)_n$	230-256
D2S206	2q37.1	$(CA)_n$	125-163
D9S288	9p24.2	$(CA)_n$	132-154
D9S161	9p21.2	$(CA)_n$	122-139
D9S273	9q21.11	$(CA)_n$	202-222
D9S164	9q34.2	$(CA)_n$	84-102
D11S4046	11p15.5	$(CA)_n$	101-125
D11S905	11p12	$(CA)_n$	269-297
D11S4175	11q14.3	$(CA)_n$	288-340
D11S925	11q23.3	$(CA)_n$	260-290

ABI PRISM® Linkage Mapping Set, version 2.5
(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

TABELA 8 - DISTRIBUIÇÃO E FREQUÊNCIA ALÉLICA DOS MARCADORES POLIMÓRFICOS INTRAGÊNICOS VNTRP53 E P53CA EM PACIENTES PORTADORES DA MUTAÇÃO ARG337HIS E EM INDIVÍDUOS CONTROLES

ALELOS (pb)	PACIENTES (44 alelos)		CONTROLES (120 alelos)	
VNTRP53	**NÚMERO**	**(%)**	**NÚMERO**	**(%)**
112	0	0	1	0,8
117	0	0	7	5,8
122	**25**	**56,8***	**22**	**18,3***
127	11	25	60	50
132	7	15,9	28	23,3
137	1	2,3	2	1,7
P53CA				
102	0	0	5	4,2
104	0	0	3	2,5
106	0	0	0	0
108	0	0	3	2,5
110	0	0	2	1,7
112	1	2,3	5	4,2
114	1	2,3	8	6,7
116	2	4,5	11	9,2
118	2	4,5	14	11,7
120	5	11,4	16	13,3
122	**24**	**54,5***	**17**	**14,2***
124	3	6,8	15	12,5
126	1	2,3	4	3,3
128	4	9	9	7,5
130	1	2,3	8	6,7
132	0	0	2	1,7
134	0	0	2	1,7

* P=0,004

TABELA 9 - INSTABILIDADE CROMOSSÔMICA ENVOLVENDO OS CROMOSSOMOS 2, 9, 11 EM PACIENTES COM TUMORES ADRENOCORTICAIS ASSOCIADOS A PERDA DO CROMOSSOMO 17

PACIENTES	CROMOSSOMOS		
	2	**9**	**11**
12*	●	●	●
24*	●	●	●
37*	□	●	●
40*	●	●	●
42	●	□	●
43	□	□	□
46	●	□	●
47	□	□	□
48	□	□	□
50	□	□	●
51*	□	●	●p
53	□	●p	●
54	□	□	□
64*	●	●	●
67*	●	●	●
68	●	□	●
71	□	□	□
Total (%)	47	47	70

* pacientes com carcinoma adrenocortical
□ = ausência de LOH (perda de heterozigose)
● = perda total do cromossomo
●p = perda parcial (braço curto) do cromossomo

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Hanahan D, Weinberg RA** 2000 The hallmarks of cancer. Cell 100:57-70
2. **Cairns J** 1981 The origin of human cancers. Nature 289:353-7
3. **Renan MJ** 1993 How many mutations are required for tumorigenesis? Implications from human cancer data. Mol Carcinog 7:139-46
4. **Harley CB, Futcher AB, Greider CW** 1990 Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. Nature 345:458-60
5. **Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al.** 1998 Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. Science 279:349-52
6. **Maser RS, DePinho RA** 2002 Connecting chromosomes, crisis, and cancer. Science 297:565-9
7. **Bishop JM** 1985 Viral oncogenes. Cell 42:23-38
8. **Munoz N, Bosch FX, de Sanjose S, et al.** 2003 Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. N Engl J Med 348:518-27
9. **Jarrett RF** 2003 Risk factors for Hodgkin's lymphoma by EBV status and significance of detection of EBV genomes in serum of patients with EBV-associated Hodgkin's lymphoma. Leuk Lymphoma 44 Suppl 3:S27-32

10. **Gazdar AF, Butel JS, Carbone M** 2002 SV40 and human tumours: myth, association or causality? Nat Rev Cancer 2:957-64
11. **Bishop JM** 1991 Molecular themes in oncogenesis. Cell 64:235-48
12. **Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM** 1984 Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. Science 224:1121-4
13. **Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ** 2000 The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. Cancer Treat Res 103:57-75
14. **Medema RH, Bos JL** 1993 The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. Crit Rev Oncog 4:615-61
15. **Marshall CJ** 1991 Tumor suppressor genes. Cell 64:313-26
16. **Knudson AG** 1996 Hereditary cancer: two hits revisited. J Cancer Res Clin Oncol 122:135-40
17. **Herman JG, Merlo A, Mao L, et al.** 1995 Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. Cancer Res 55:4525-30
18. **Lane DP, Crawford LV** 1979 T antigen is bound to a host protein in SV40-transformed cells. Nature 278:261-3
19. **Linzer DI, Levine AJ** 1979 Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. Cell 17:43-52
20. **Oren M, Levine AJ** 1983 Molecular cloning of a cDNA specific for the murine p53 cellular tumor antigen. Proc Natl Acad Sci U S A 80:56-9
21. **Land H, Parada LF, Weinberg RA** 1983 Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. Nature 304:596-602

22. **Eliyahu D, Raz A, Gruss P, Givol D, Oren M** 1984 Participation of p53 cellular tumour antigen in transformation of normal embryonic cells. Nature 312:646-9
23. **Jenkins JR, Rudge K, Currie GA** 1984 Cellular immortalization by a cDNA clone encoding the transformation-associated phosphoprotein p53. Nature 312:651-4
24. **Finlay CA, Hinds PW, Tan TH, Eliyahu D, Oren M, Levine AJ** 1988 Activating mutations for transformation by p53 produce a gene product that forms an hsc70-p53 complex with an altered half-life. Mol Cell Biol 8:531-9
25. **Eliyahu D, Michalovitz D, Eliyahu S, Pinhasi-Kimhi O, Oren M** 1989 Wild-type p53 can inhibit oncogene-mediated focus formation. Proc Natl Acad Sci U S A 86:8763-7
26. **Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, et al.** 1989 Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. Nature 342:705-8
27. **Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC** 1991 p53 mutations in human cancers. Science 253:49-53
28. **Isobe M, Emanuel BS, Givol D, Oren M, Croce CM** 1986 Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature 320:84-5
29. **Reisman D, Greenberg M, Rotter V** 1988 Human p53 oncogene contains one promoter upstream of exon 1 and a second, stronger promoter within intron 1. Proc Natl Acad Sci U S A 85:5146-50
30. **Soussi T, Caron de Fromentel C, May P** 1990 Structural aspects of the p53 protein in relation to gene evolution. Oncogene 5:945-52
31. **Hahn M, Fislage R, Pingoud A** 1995 Polymorphism of the pentanucleotide repeat d(AAAAT) within intron 1 of the human tumor suppressor gene p53 (17p13.1). Hum Genet 95:471-2

32. **Jones MH, Nakamura Y** 1992 Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism. Genes Chromosomes Cancer 5:89-90
33. **Zambetti GP, Levine AJ** 1993 A comparison of the biological activities of wild-type and mutant p53. Faseb J 7:855-65
34. **Lane DP** 1992 Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 358:15-6
35. **Unger T, Nau MM, Segal S, Minna JD** 1992 p53: a transdominant regulator of transcription whose function is ablated by mutations occurring in human cancer. Embo J 11:1383-90
36. **Kussie PH, Gorina S, Marechal V, et al.** 1996 Structure of the MDM2 oncoprotein bound to the p53 tumor suppressor transactivation domain. Science 274:948-53
37. **Sakamuro D, Sabbatini P, White E, Prendergast GC** 1997 The polyproline region of p53 is required to activate apoptosis but not growth arrest. Oncogene 15:887-98
38. **Pavletich NP, Chambers KA, Pabo CO** 1993 The DNA-binding domain of p53 contains the four conserved regions and the major mutation hot spots. Genes Dev 7:2556-64
39. **Levine AJ** 1997 p53, the cellular gatekeeper for growth and division. Cell 88:323-31
40. **Sturzbecher HW, Brain R, Addison C, et al.** 1992 A C-terminal alpha-helix plus basic region motif is the major structural determinant of p53 tetramerization. Oncogene 7:1513-23
41. **Wang Y, Reed M, Wang P, et al.** 1993 p53 domains: identification and characterization of two autonomous DNA-binding regions. Genes Dev 7:2575-86
42. **Friedman PN, Chen X, Bargonetti J, Prives C** 1993 The p53 protein is an unusually shaped tetramer that binds directly to DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 90:3319-23

43. **Hupp TR, Meek DW, Midgley CA, Lane DP** 1992 Regulation of the specific DNA binding function of p53. Cell 71:875-86
44. **Halazonetis TD, Davis LJ, Kandil AN** 1993 Wild-type p53 adopts a 'mutant'-like conformation when bound to DNA. Embo J 12:1021-8
45. **Cho Y, Gorina S, Jeffrey PD, Pavletich NP** 1994 Crystal structure of a p53 tumor suppressor-DNA complex: understanding tumorigenic mutations. Science 265:346-55
46. **Jeffrey PD, Gorina S, Pavletich NP** 1995 Crystal structure of the tetramerization domain of the p53 tumor suppressor at 1.7 angstroms. Science 267:1498-502
47. **Clore GM, Omichinski JG, Sakaguchi K, et al.** 1995 Interhelical angles in the solution structure of the oligomerization domain of p53: correction. Science 267:1515-6
48. **Chene P** 2001 The role of tetramerization in p53 function. Oncogene 20:2611-7
49. **Kastan MB, Onyekwere O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig RW** 1991 Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. Cancer Res 51:6304-11
50. **Selivanova G, Wiman KG** 1995 p53: a cell cycle regulator activated by DNA damage. Adv Cancer Res 66:143-80
51. **Milner J** 1997 Structures and functions of the tumor suppressor p53. Pathol Biol (Paris) 45:797-803
52. **Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D, Harris AL** 1990 Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. Lancet 335:675-9
53. **Hall PA, Ray A, Lemoine NR, Midgley CA, Krausz T, Lane DP** 1991 p53 immunostaining as a marker of malignant disease in diagnostic cytopathology. Lancet 338:513

54. **Gao JP, Uchida T, Wang C, et al.** 2000 Relationship between p53 gene mutation and protein expression: clinical significance in transitional cell carcinoma of the bladder. Int J Oncol 16:469-75
55. **Shieh SY, Ikeda M, Taya Y, Prives C** 1997 DNA damage-induced phosphorylation of p53 alleviates inhibition by MDM2. Cell 91:325-34
56. **Wang Y, Prives C** 1995 Increased and altered DNA binding of human p53 by S and G2/M but not G1 cyclin-dependent kinases. Nature 376:88-91
57. **Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, et al.** 1992 Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous tumours. Nature 356:215-21
58. **Elledge SJ, Winston J, Harper JW** 1996 A question of balance: the role of cyclin-kinase inhibitors in development and tumorigenesis. Trends Cell Biol 6:388-92
59. **el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, et al.** 1993 WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. Cell 75:817-25
60. **Zhan Q, Chen IT, Antinore MJ, Fornace AJ, Jr.** 1998 Tumor suppressor p53 can participate in transcriptional induction of the GADD45 promoter in the absence of direct DNA binding. Mol Cell Biol 18:2768-78
61. **Bunz F, Dutriaux A, Lengauer C, et al.** 1998 Requirement for p53 and p21 to sustain G2 arrest after DNA damage. Science 282:1497-501
62. **Hermeking H, Lengauer C, Polyak K, et al.** 1997 14-3-3 sigma is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. Mol Cell 1:3-11
63. **Meng RD, Shih H, Prabhu NS, George DL, el-Deiry WS** 1998 Bypass of abnormal MDM2 inhibition of p53-dependent growth suppression. Clin Cancer Res 4:251-9

64. **Vogelstein B, Lane D, Levine AJ** 2000 Surfing the p53 network. Nature 408:307-10
65. **Morgan SE, Kastan MB** 1997 p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. Adv Cancer Res 71:1-25
66. **Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, et al.** 1994 Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. Oncogene 9:1799-805
67. **Janus F, Albrechtsen N, Dornreiter I, Wiesmuller L, Grosse F, Deppert W** 1999 The dual role model for p53 in maintaining genomic integrity. Cell Mol Life Sci 55:12-27
68. **Tornaletti S, Pfeifer GP** 1995 Complete and tissue-independent methylation of CpG sites in the p53 gene: implications for mutations in human cancers. Oncogene 10:1493-9
69. **Denissenko MF, Chen JX, Tang MS, Pfeifer GP** 1997 Cytosine methylation determines hot spots of DNA damage in the human P53 gene. Proc Natl Acad Sci U S A 94:3893-8
70. **Kern SE, Pietenpol JA, Thiagalingam S, Seymour A, Kinzler KW, Vogelstein B** 1992 Oncogenic forms of p53 inhibit p53-regulated gene expression. Science 256:827-30
71. **Milner J, Medcalf EA** 1991 Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. Cell 65:765-74
72. **Hainaut P, Hollstein M** 2000 p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Adv Cancer Res 77:81-137
73. **Hainaut P, Olivier M, Pfeifer GP** 2001 TP53 mutation spectrum in lung cancers and mutagenic signature of components of tobacco smoke: lessons from the IARC TP53 mutation database. Mutagenesis 16:551-3; author reply 555-6
74. **Sarnow P, Sullivan CA, Levine AJ** 1982 A monoclonal antibody detecting the adenovirus type 5-E1b-58Kd tumor antigen:

characterization of the E1b-58Kd tumor antigen in adenovirus-infected and -transformed cells. Virology 120:510-7

75. **Werness BA, Levine AJ, Howley PM** 1990 Association of human papillomavirus types 16 and 18 E6 proteins with p53. Science 248:76-9
76. **Rodrigues NR, Rowan A, Smith ME, et al.** 1990 p53 mutations in colorectal cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 87:7555-9
77. **Moll UM, Riou G, Levine AJ** 1992 Two distinct mechanisms alter p53 in breast cancer: mutation and nuclear exclusion. Proc Natl Acad Sci U S A 89:7262-6
78. **Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al.** 1988 Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319:525-32
79. **Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al.** 1989 Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. Science 244:217-21
80. **Hollstein M, Shomer B, Greenblatt M, et al.** 1996 Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. Nucleic Acids Res 24:141-6
81. **Takahashi T, Nau MM, Chiba I, et al.** 1989 p53: a frequent target for genetic abnormalities in lung cancer. Science 246:491-4
82. **Beuschlein F, Reincke M, Karl M, et al.** 1994 Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. Cancer Res 54:4927-32
83. **Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, et al.** 1994 Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. Clin Endocrinol (Oxf) 40:465-77
84. **Diaz-Cano SJ, de Miguel M, Blanes A, Tashjian R, Galera H, Wolfe HJ** 2000 Clonality as expression of distinctive cell kinetics

patterns in nodular hyperplasias and adenomas of the adrenal cortex. Am J Pathol 156:311-9

85. **Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, et al.** 1996 Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. Cancer Res 56:4219-23

86. **Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, et al.** 1999 Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. Am J Pathol 155:1039-45

87. **Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, et al.** 1999 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. J Clin Endocrinol Metab 84:1116-21

88. **James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM** 1999 Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. Br J Cancer 81:300-4

89. **Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P** 2000 Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. Genes Chromosomes Cancer 28:145-52

90. **Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, et al.** 2002 Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 87:3467-74

91. **Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, et al.** 1999 MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 84:216-9

92. **Kjellman M, Roshani L, Teh BT, et al.** 1999 Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus

in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. J Clin Endocrinol Metab 84:730-5

93. **Schulte KM, Heinze M, Mengel M, Scheuring S, Kohrer K, Roher HD** 2000 Complete sequencing and mRNA expression analysis of the MEN-I gene in adrenal myelolipoma. Horm Metab Res 32:169-73

94. **Hao Y, Crenshaw T, Moulton T, Newcomb E, Tycko B** 1993 Tumour-suppressor activity of H19 RNA. Nature 365:764-7

95. **Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkila P, Janne J, Voutilainen R** 2002 Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 87:1170-6

96. **Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Voutilainen R** 1997 Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. J Clin Endocrinol Metab 82:1766-71

97. **Latronico AC, Reincke M, Mendonca BB, et al.** 1995 No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 80:875-7

98. **Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B** 1997 Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. J Clin Endocrinol Metab 82:3054-8

99. **Stigliano A, Caiola S, Siniscalchi E, et al.** 2002 Mutational analysis of StAR gene in adrenal tumors. Int J Cancer 97:357-60

100. **Gicquel C, Le Bouc Y** 1997 Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. Horm Res 47:269-72

101. **Yano T, Linehan M, Anglard P, et al.** 1989 Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. J Natl Cancer Inst 81:518-23

102. **Gicquel C, Bertagna X, Le Bouc Y** 1995 Recent advances in the pathogenesis of adrenocortical tumours. Eur J Endocrinol 133:133-44
103. **Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al.** 1994 Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 78:1444-53
104. **Kunze J, Wiedemann HR** 1993 [Wiedemann-Beckwith syndrome]. Ergeb Inn Med Kinderheilkd 61:303-38
105. **Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, et al.** 1988 A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. Cancer Res 48:5358-62
106. **Malkin D, Li FP, Strong LC, et al.** 1990 Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. Science 250:1233-8
107. **Srivastava S, Zou ZQ, Pirollo K, Blattner W, Chang EH** 1990 Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. Nature 348:747-9
108. **Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D** 1994 High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. J Natl Cancer Inst 86:1707-10
109. **Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU** 1993 p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. Int J Cancer 54:408-10
110. **Reincke M, Karl M, Travis WH, et al.** 1994 p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. J Clin Endocrinol Metab 78:790-4
111. **Lin SR, Lee YJ, Tsai JH** 1994 Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. J Clin Endocrinol Metab 78:483-91

112. **Reincke M, Wachenfeld C, Mora P, et al.** 1996 p53 mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan. J Clin Endocrinol Metab 81:3636-8
113. **Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al.** 1999 Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. Am J Hum Genet 65:995-1006
114. **Chompret A, Brugieres L, Ronsin M, et al.** 2000 P53 germline mutations in childhood cancers and cancer risk for carrier individuals. Br J Cancer 82:1932-7
115. **Barzon L, Chilosi M, Fallo F, et al.** 2001 Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. Eur J Endocrinol 145:207-12
116. **Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oligny LL, Deal C** 2000 Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. J Clin Endocrinol Metab 85:2048-56
117. **Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al.** 2001 An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. Proc Natl Acad Sci U S A 98:9330-5
118. **DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al.** 2002 A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. Nat Struct Biol 9:12-6
119. **Lee AS, Galea C, DiGiammarino EL, et al.** 2003 Reversible amyloid formation by the p53 tetramerization domain and a cancer-associated mutant. J Mol Biol 327:699-709
120. **Weiss LM** 1984 Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. Am J Surg Pathol 8:163-9

121. **Sullivan M, Boileau M, Hodges CV** 1978 Adrenal cortical carcinoma. J Urol 120:660-5
122. **Macfarlane DA** 1958 Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. Ann R Coll Surg Engl 23:155-86
123. **Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS** 2003 Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. Am J Surg Pathol 27:867-81
124. **Miller SA, Dykes DD, Polesky HF** 1988 A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids Res 16:1215
125. **Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca BB, Latronico AC** 2004 Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. Arq Bras Endocrinol Metabol 48:647-50
126. **Pinto EM, Billerbeck AE, Villares Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC** 2005 Deletion-Mapping of Chromosome 17 in Benign and Malignant Adrenocortical Tumors Associated with the Arg337His Mutation of the p53 Tumor Suppressor Protein. J Clin Endocrinol Metab 90(5):2976-2981
127. **Harris CC, Hollstein M** 1993 Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. N Engl J Med 329:1318-27
128. **Luca JW, Strong LC, Hansen MF** 1998 A germline missense mutation R337C in exon 10 of the human p53 gene. Hum Mutat Suppl 1:S58-61
129. **Simms LA, Radford-Smith G, Biden KG, et al.** 1998 Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. Oncogene 17:2003-8

130. **Tomizawa Y, Kohno T, Fujita T, et al.** 1999 Correlation between the status of the p53 gene and survival in patients with stage I non-small cell lung carcinoma. Oncogene 18:1007-14
131. **Kato H, Kato S, Kumabe T, et al.** 2000 Functional evaluation of p53 and PTEN gene mutations in gliomas. Clin Cancer Res 6:3937-43
132. **Smardova J, Nemajerova A, Trbusek M, Vagunda V, Kovarik J** 2001 Rare somatic p53 mutation identified in breast cancer: a case report. Tumour Biol 22:59-66
133. **Okuda E, Osugi H, Morimura K, et al.** 2001 Detection of p53 gene mutations in human esophageal squamous cell carcinomas using a p53 yeast functional assay: possible difference in esophageal carcinogenesis between the young and the elderly group. Clin Cancer Res 7:600-6
134. **Rideout WM, 3rd, Coetzee GA, Olumi AF, Jones PA** 1990 5-Methylcytosine as an endogenous mutagen in the human LDL receptor and p53 genes. Science 249:1288-90
135. **Yang AS, Gonzalgo ML, Zingg JM, Millar RP, Buckley JD, Jones PA** 1996 The rate of CpG mutation in Alu repetitive elements within the p53 tumor suppressor gene in the primate germline. J Mol Biol 258:240-50
136. **Mesiano S, Jaffe RB** 1997 Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. Endocr Rev 18:378-403
137. **Keegan CE, Hammer GD** 2002 Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. Trends Endocrinol Metab 13:200-8
138. **Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H** 1997 Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. Am J Pathol 150:1-13

139. **Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al.** 2004 Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. J Clin Oncol 22:838-45
140. **Ponder B** 1988 Cancer. Gene losses in human tumours. Nature 335:400-2
141. **Thiagalingam S, Laken S, Willson JK, et al.** 2001 Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers. Proc Natl Acad Sci U S A 98:2698-702
142. **Chen LC, Neubauer A, Kurisu W, et al.** 1991 Loss of heterozygosity on the short arm of chromosome 17 is associated with high proliferative capacity and DNA aneuploidy in primary human breast cancer. Proc Natl Acad Sci U S A 88:3847-51
143. **Farrand K, Delahunt B, Wang XL, et al.** 2002 High resolution loss of heterozygosity mapping of 17p13 in thyroid cancer: Hurthle cell carcinomas exhibit a small 411-kilobase common region of allelic imbalance, probably containing a novel tumor suppressor gene. J Clin Endocrinol Metab 87:4715-21
144. **Zhao X, He M, Wan D, et al.** 2003 The minimum LOH region defined on chromosome 17p13.3 in human hepatocellular carcinoma with gene content analysis. Cancer Lett 190:221-32
145. **Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al.** 2001 Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. Cancer Res 61:6762-7
146. **Fearon ER, Vogelstein B** 1990 A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61:759-67
147. **Nakai H, Misawa S** 1995 Chromosome 17 abnormalities and inactivation of the p53 gene in chronic myeloid leukemia and their prognostic significance. Leuk Lymphoma 19:213-21

148. **Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, et al.** 2005 Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 90:615-9
149. **Zhao L, Bakke M, Krimkevich Y, et al.** 2001 Steroidogenic factor 1 (SF1) is essential for pituitary gonadotrope function. Development 128:147-54