

FLAVIA REZENDE PEREIRA PATRICIO

**E-CADERINA E β -CATENINA: análise da expressão e
relação com a evolução e prognóstico nos tumores do
córtex de adrenal em crianças**

CAMPINAS

UNICAMP

2009

FLAVIA REZENDE PEREIRA PATRICIO

**E-CADERINA E β -CATENINA: análise da expressão e
relação com a evolução e prognóstico nos tumores do
córtex de adrenal em crianças**

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Cirurgia, área de concentração Cirurgia

Orientador: Prof. Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho

CAMPINAS

UNICAMP

2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

P274e Patricio, Flavia Rezende Pereira
E-caderina e beta-catenina: Análise da expressão e relação com a
evolução e prognóstico nos tumores do córtex de adrenal em crianças /
Flavia Rezende Pereira Patricio. Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientador: Antônio Gonçalves de Oliveira Filho
Dissertação (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas.

1. Caderinas. 2. Catenina. 3. Beta catenina. I. Oliveira Filho,
Antônio Gonçalves de. II. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

**Título em inglês: Expression of E-cadherin and beta-catenin in adrenocortical tumors
in children: relationship with outcome**

Keywords: • Cadherins
• Catenin
• Beta catenin

Titulação: Mestre em Cirurgia

Área de concentração: Cirurgia

Banca examinadora:

Prof. Dr. Antônio Gonçalves de Oliveira Filho

Prof. Dr. Antônio Gugliotta

Prof. Dr. Lourenço Sbragia

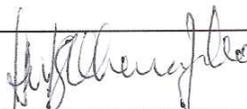
Data da defesa: 27- 02 - 2009

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado
Flavia Rezende Pereira Patricio

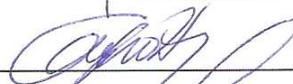
Orientador: Prof. Dr. Antônio Gonçalves Oliveira Filho

Membros:

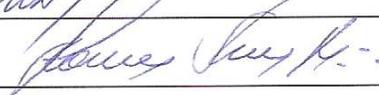
1. Prof. Dr. Antônio Gonçalves Oliveira Filho -



2. Prof. Dr. Antonio Gugliotta -



3. Prof. Dr. Lourenço Sbragia Neto -



Curso de Pós-Graduação em Cirurgia da Faculdade de Ciências Médicas
da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 27/02/2009

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, José Eduardo e Rejani

que, com todo seu amor, carinho e dedicação,
me ajudaram a cumprir minhas tarefas
como ser humano e como profissional.

A meu marido Fabio

que tanto me amou,
apoiou e incentivou
durante esta trajetória.

A nossos filhinhos

Pedro e “bebê”

que sempre foram um
grande incentivo para meu crescimento.

A Deus

que me deu força e coragem
para seguir em frente durante toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Antônio Gonçalves de Oliveira Filho, por ter me orientado neste estudo com tanta dedicação e por me mostrar o melhor caminho para lidar com as crianças portadoras de câncer.

À Prof^a Dra. Izilda Aparecida Cardinali, por sua dedicação e por seu trabalho como excepcional patologista do Centro Infantil Boldrini.

À Prof^a Dra. Maria José Mastellaro que tanto auxiliou contribuindo com dados importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Márcio Lopes Miranda por ter auxiliado e incentivado na realização deste estudo.

Ao Prof. Álvaro Armando Carvalho de Moraes, que considero um grande mestre, por tudo que me ensinou durante minha residência de cirurgia geral como médica e como ser humano.

Tumores do córtex da supra-renal (TCSR) em crianças são raros e correspondem a 0,2% dos tumores da infância. Estes tumores são endocrinologicamente ativos, causando na maioria das vezes, virilização do paciente associada, ou não, a um aumento de cortisol. O tratamento dos TCSR é principalmente cirúrgico, sendo a cirurgia com o procedimento de ressecção completa do tumor e sem ruptura a principal modalidade terapêutica. No entanto, a distinção entre tumores benignos e malignos, baseada exclusivamente na histologia, pode ser difícil de ser realizada. Os fatores prognósticos são baseados quase exclusivamente no estadiamento da doença, o qual leva em conta o peso e volume tumoral e a disseminação metastática do tumor.

Estudos clínicos e experimentais sugerem que a propagação metastática em alguns tumores está relacionada aos níveis de E-caderina e β -catenina, que são moléculas presentes no tecido epitelial normal, estando envolvidas diretamente na adesão intercelular. A análise da expressão destas moléculas pode fornecer dados que permite identificar grupos de pacientes mais propensos à evolução tumoral desfavorável, proporcionando, assim, um tratamento mais adequado e individualizado a estes pacientes.

Com o objetivo de analisar a expressão da E-caderina e β -catenina em crianças com TCSR e sua correlação com a evolução da doença, foi realizada uma revisão retrospectiva dos prontuários de 33 crianças com diagnóstico de TCSR tratadas no Centro Infantil Boldrini (Janeiro de 1998 a Janeiro de 2005). Foram coletados e analisados dados referentes ao sexo, idade, manifestações clínicas, estadiamento, tratamento e evolução dos pacientes.

Para a análise imunoistoquímica, foi empregada a técnica de *multitissue array* com anticorpos específicos para E-caderina e β -catenina em 30 tumores de crianças com TCSR e uma adrenal normal.

Houve predominância do sexo feminino na amostra e a apresentação clínica mais freqüente foi a virilização. Nesta série, observou-se que crianças com idade inferior a dois anos apresentaram melhor prognóstico e, também que a ruptura e recidiva tumoral apresentaram influência negativa na sobrevida dos pacientes.

A análise imunoistoquímica mostrou expressão da E-caderina em 73,3% e β -catenina em 83,3% das crianças que apresentavam TCSR. Além disso, não foi verificada sua expressão na glândula adrenal normal. Quando avaliada a relação da expressão da E-caderina e β -catenina com os estádios evolutivos da doença, não foi verificada associação significativa entre as variáveis.

A positividade da E-caderina e β -catenina na membrana celular, citoplasma ou núcleo, verificou-se que a expressão na membrana celular mostrou associação significativa com mau prognóstico.

Adrenal cortical tumor (ACT) in children are rare and they correspond to 0,2% of the tumors of the childhood. They are usually active, causing mainly virilization of patient associate or not with increased levels of corticoids. The treatment of the TCSR is mainly surgical, being the surgery with complete resection of the tumor without spillage the therapeutic mainstay. The distinction between benign and malignant tumors based exclusively on the histology can be difficult and very often uncertain. The prognostic factors are based almost exclusively on the staging of the disease, who takes into account the weight and volume tumoral and the metastatic dissemination. Clinical and experimental studies suggest that metastatic dissemination in some tumors is related with the levels of E-cadherin and β -catenin. These molecules are found in the normal epithelial tissues and are strongly related with intercellular adhesion. The analysis of the expression of these molecules maybe can allow identifying groups of patients with higher risk of presenting unfavorable outcomes and ensuing appropriate and individualized treatment.

With the objective of analyzing the expression of E-cadherin and β -catenin in children with ACT and its correlation with the evolution of the disease, a retrospective chart review of 33 children with diagnosis of ACT treated at Centro Infantil Boldrini (January of 1998 through January of 2005). Data regarding sex, age, clinical presentation, staging, treatment and outcome were collected and analyzed.

Multitissue array technique using specific antibodies for E-cadherin and β -catenin was done in 30 tumors from children with ACT and 1 normal adrenal tissue.

There was predominance of the feminine sex and the most frequent clinical presentation was virilization. In these series children with age bellow two years had a better outcome and tumoral spillage and relapse have had negative influence in the survival of the patients. Immunohistochemical analysis showed expression of E-cadherin in 73,3 % and β -catenin in 83,3 % of the children who had ACT but showed no expression in the normal adrenal tissue.

When the relationship between the expression of E-cadherin and β -catenin with the stages of the disease was analyzed, no significant association was found.

When analyzed the expression of E-cadherin and β -catenin in the cellular membrane, cytoplasm or nucleus, its presence in the membrane of the cell was found as associated with poor outcome.

As far we know, this is the first study to evaluate the expression of E-cadherin and β -catenin in children with ACT and, although with small number of patients due to the rarity of the disease, it apparently shows some relationship with prognosis.

LISTA DE ABREVIATURAS

DAB	Diaminobenzidina
DHEA	Dehidroandrostenediona
EUA	Estados Unidos da América
TCSR	Tumor do córtex da supra-renal
IgG	Imunoglobulina
IPACTR	International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry
M	Mol (molaridade)
ml	Mililitros
p	Probabilidade pelo teste exato de Fisher
PBS	Solução tampão fosfato
pKM	Probabilidade pela análise da curva de sobrevivência Kaplan-Meier
QTPO	Quimioterapia pós-operatória
RNM	Ressonância nuclear magnética
RX	Raios-X
S-DHEA	Sulfato de dehidroandrostenediona
TC	Tomografia computadorizada
TMA	Tissue Microarray
USG	Ultra-sonografia
β	Beta

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1 Estadiamento proposto por Sandrini (1993).....	26
Tabela 2 Características clínicas de 33 pacientes com TCSR.....	45
Tabela 3 Sinais clínicos encontrados na população de estudo.....	46
Tabela 4 Tipos de cirurgias realizadas nos pacientes com TCSR.....	47
Tabela 5 Estadiamento TCSR segundo Sandrini et al. (1993).....	48
Tabela 6 Análise da correlação entre presença de invasão estruturas adjacentes e status dos pacientes.....	51
Tabela 7 Análise da correlação entre presença de ruptura e status dos pacientes.....	52
Tabela 8 Análise da correlação entre ruptura tumoral, recidiva e status dos pacientes.....	53
Tabela 9 Análise da correlação entre presença de mitoses atípicas e status dos pacientes.....	54
Tabela 10 Análise da correlação entre presença de necrose e status dos pacientes.....	54
Tabela 11 Análise da correlação entre presença de invasão capsular e status dos pacientes.....	54
Tabela 12 Análise da correlação entre presença de invasão vascular e status dos pacientes.....	55

Tabela 13	Análise da correlação entre presença de invasão sinusoidal e status dos pacientes.....	55
Tabela 14	Análise da correlação entre presença de pseudo-invasão nuclear e status dos pacientes.....	55
Tabela 15	Análise da correlação entre positividade da E-caderina e status dos pacientes.....	56
Tabela 16	Análise da correlação entre presença de E-caderina no citoplasma e status dos pacientes.....	56
Tabela 17	Análise da correlação entre presença de E-caderina na membrana e status dos pacientes.....	57
Tabela 18	Correlação entre positividade da β -catenina e status dos pacientes.....	58
Tabela 19	Análise da correlação entre presença de β -catenina no citoplasma e status dos pacientes.....	58
Tabela 20	Análise da correlação entre presença de β -catenina no núcleo e status dos pacientes.....	59
Tabela 21	Análise da correlação entre presença de β -catenina na membrana e status dos pacientes.....	59
Tabela 22	Expressão da E-caderina e sua correlação com os estádios evolutivos dos TCSR.....	61
Tabela 23	Expressão da β -catenina e sua correlação com os estádios evolutivos dos TCSR.....	61

LISTA DE FIGURAS

		Pág.
Figura 1	Quadro clínico de crianças portadoras de TCSR.....	20
Figura 2	Exames de imagem de crianças portadoras de TCSR.....	22
Figura 3	Imagem de microscopia óptica de TCSR.....	23
Figura 4	Complexo caderina-catenina.....	28
Figura 5	Lâmina do TMA.....	38
Figura 6	Fotos de TCSR corados para E-caderina e β -catenina.....	40
Figura 7	Gráfico da relação idade X sobrevida.....	44
Figura 8	Gráfico da relação entre estadiamento e sobrevida.....	49
Figura 9	Gráfico da relação recidiva tumoral X sobrevida.....	50
Figura 10	Gráfico da relação entre presença de invasão de estruturas adjacentes e status dos pacientes.....	51
Figura 11	Gráfico da relação entre presença de ruptura tumoral e status dos pacientes.....	52
Figura 12	Gráfico da correlação entre ruptura tumoral, recidiva e sobrevida.....	53
Figura 13	Gráfico da relação entre presença da positividade da E-caderina na membrana celular e status dos pacientes.....	57
Figura 14	Gráfico da relação entre positividade da β -catenina na membrana celular e status dos pacientes.....	60
Figura 15	Gráfico da sobrevida global dos pacientes com TCSR.....	62

	Pág.
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	ix
1- INTRODUÇÃO.....	17
1.1- Epidemiologia.....	18
1.2- Anatomia.....	18
1.3- Quadro clínico.....	19
1.4- Diagnóstico.....	21
1.5- Histologia.....	23
1.6- Tratamento.....	24
1.7- Sistema de classificação tumoral (estadiamento).....	25
1.8- Prognóstico.....	26
1.9- Complexo caderina-catenina.....	28
2- OBJETIVOS.....	31
3- MÉTODO.....	33
3.1- População de estudo e avaliação dos dados clínicos.....	34
3.2- Avaliação histopatológica.....	34

3.2.1- Avaliação macroscópica.....	35
3.2.2- Avaliação microscópica.....	35
3.2.3- Técnica imunoistoquímica.....	36
3.2.4- Técnica do <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	37
3.2.5- Método de leitura das lâminas de TMA.....	39
3.3- Consentimento livre e esclarecido.....	41
3.4- Análise estatística.....	42
4- RESULTADOS.....	43
5- DISCUSSÃO.....	63
6- CONCLUSÃO.....	67
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
8- APÊNDICES.....	75

1- INTRODUÇÃO

1.1- Epidemiologia

Os tumores do córtex da supra-renal (TCSR) em crianças são raros, correspondendo a 0,2% dos tumores pediátricos (Miller RW et al., 1995; Wooten e King, 1993). Nos Estados Unidos da América (EUA) a incidência é de 25 novos casos ao ano, estimando-se 0,2 a 0,3 casos por 1000000 de habitantes (Sbragia et al, 2005; Galindo et al, 2005). Entretanto, esta incidência pode variar grandemente quando analisadas outras regiões do mundo, sendo esta proporção de 10 a 15 vezes maior no sudeste brasileiro em relação aos EUA (Galindo et al, 2005).

Os TCSR são tumores que apresentam distribuição bimodal, com picos observados na primeira e quarta décadas de vida (Wooten e King, 1993; Galindo et al, 2005). Em crianças, observa-se prevalência nos primeiros cinco anos de vida, com idade média de 3,2 anos, seguindo-se de pequeno pico durante a adolescência (Ribeiro et al, 1990; Sandrini et al, 1997; Wienecke et al, 2003; Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005; Ribeiro et al, 1999).

O sexo predominante encontrado nestes tumores é o feminino com relação de 1,5 para 1,0 casos (Sandrini et al, 1997; Wienecke et al, 2003; Michalkiewicz et al, 2004). Porém estudos baseados no *Surveillance Epidemiology End Results (SEER)* mostram que a distribuição de sexo é idade-dependente, ocorrendo predominância do sexo feminino em pacientes menores que três anos de idade e adolescentes, e observando-se mesma incidência dos quatro aos doze anos (Michalkiewicz et al, 2004; Bernstein e Gurney, 1995, respectivamente).

1.2- Anatomia

As glândulas supra-renais têm forma piramidal, situando-se bilateralmente acima dos rins; podem pesar de 4 a 6 gramas, apresentando superfície rugosa e/ou nodular. Cada glândula possui cápsula fibrosa e encontra-se envolta por tecido gorduroso de sustentação (Dichtchekian, 2002).

O córtex da glândula supra-renal é dividido em três zonas baseadas em sua estrutura vascular e do tecido conjuntivo. A zona mais externa localizada na região subcapsular é a glomerulosa a qual constitui cerca de 15% do córtex, sendo responsável pela produção de mineralocorticóides, cujo principal representante é a aldosterona. Logo abaixo da glomerulosa, encontra-se a fasciculada, que ocupa cerca de 75% do córtex e produz preferencialmente os glicocorticóides (especificamente o cortisol). A terceira zona, a mais interna e justaposta à medular, é a reticular, cuja função principal é produzir andrógenos, representados em condições normais pela deidroepiandrosterona (DHEA) (Dichtchekian, 2002; Keegan e Hammer, 2002).

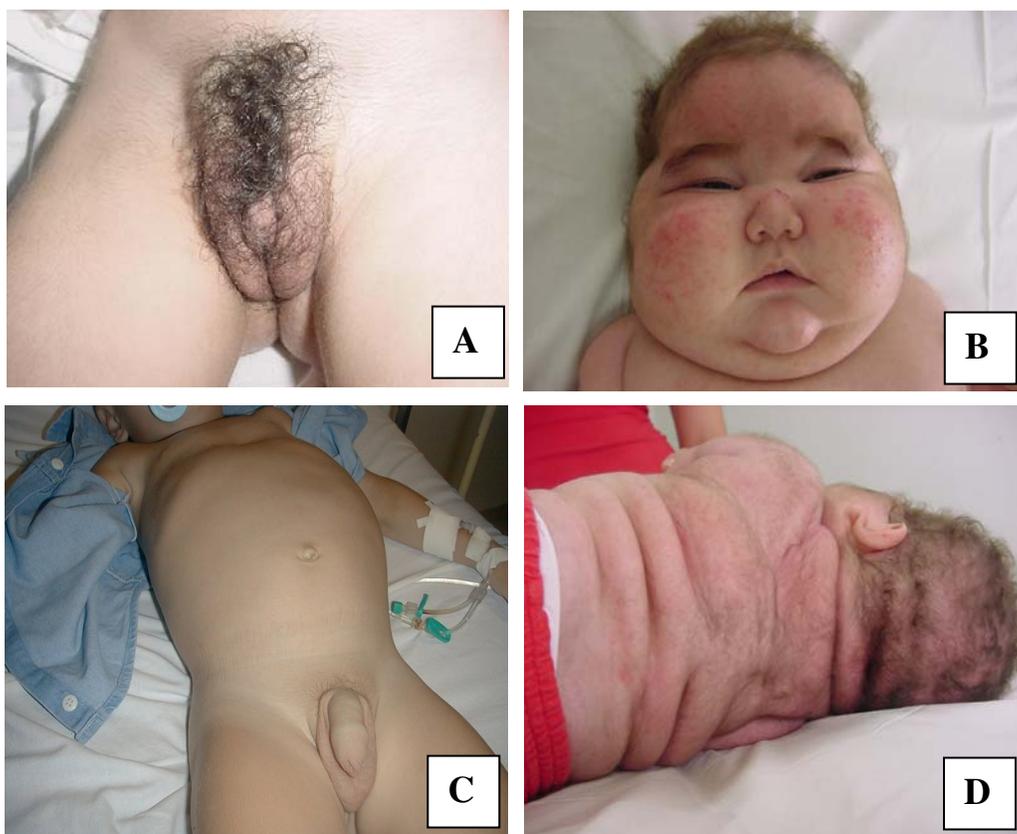
1.3- Quadro clínico

Os TCSR são tumores funcionais causadores de distúrbios endócrinos característicos na maioria dos casos (Vassilopoulou e Schultz, 2001; Ciftci et al, 2001; Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005; Allolio e Fassnacht, 2006; Libé et al, 2007). O sintoma de virilização é observado, isoladamente ou em associação ao hipercortisolismo, em cerca de 90% dos pacientes (Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005; Driver et al, 1998). Nas meninas observa-se pilificação pubiana como sinal mais precoce juntamente com a clitoromegalia. Nos meninos observa-se macrogenitossomia e puberdade precoce com discrepância entre o estágio puberal e o volume testicular (Galindo et al, 2005) (Figura 1). Raramente o hiperestrogenismo (feminização) ou aldosteronismo (Síndrome de Conn) são encontradas como manifestação clínica inicial (Galindo et al, 2005). As apresentações clínicas podem diferir de acordo com a faixa etária: crianças jovens tendem a apresentar tumores funcionais, com manifestações virilizantes em mais de 90% dos casos (Michalkiewicz et al, 2004), enquanto adultos apresentam síndrome de Cushing ou tumores não funcionais (Ribeiro et al, 1990; Wajchemberg et al, 2000; Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005).

A hipertensão arterial é encontrada ao diagnóstico em 43% dos pacientes, devido à produção de glicocorticóides e/ou mineralocorticóides. A hipertensão é mais comum nos pacientes com síndrome de Cushing. No entanto, 27 % dos pacientes com

virilização ou tumor não funcionante também são hipertensos, provavelmente devido à compressão da artéria renal pelo tumor ou por aumento da produção de aldosterona (Michalkiewicz et al, 2004).

Outros sinais e sintomas encontrados são: classificação acima de 75% no percentil peso e altura e idade óssea maior que a idade cronológica (80%), dor abdominal (50%) e massa abdominal palpável (Sabbaga, 1998).



A: Foto de menina com pilificação pubiana

B: Foto de criança com Sd. De Cushing

C: Foto de menino com macrogenitossomia

D: Foto de criança com Sd. De Cushing

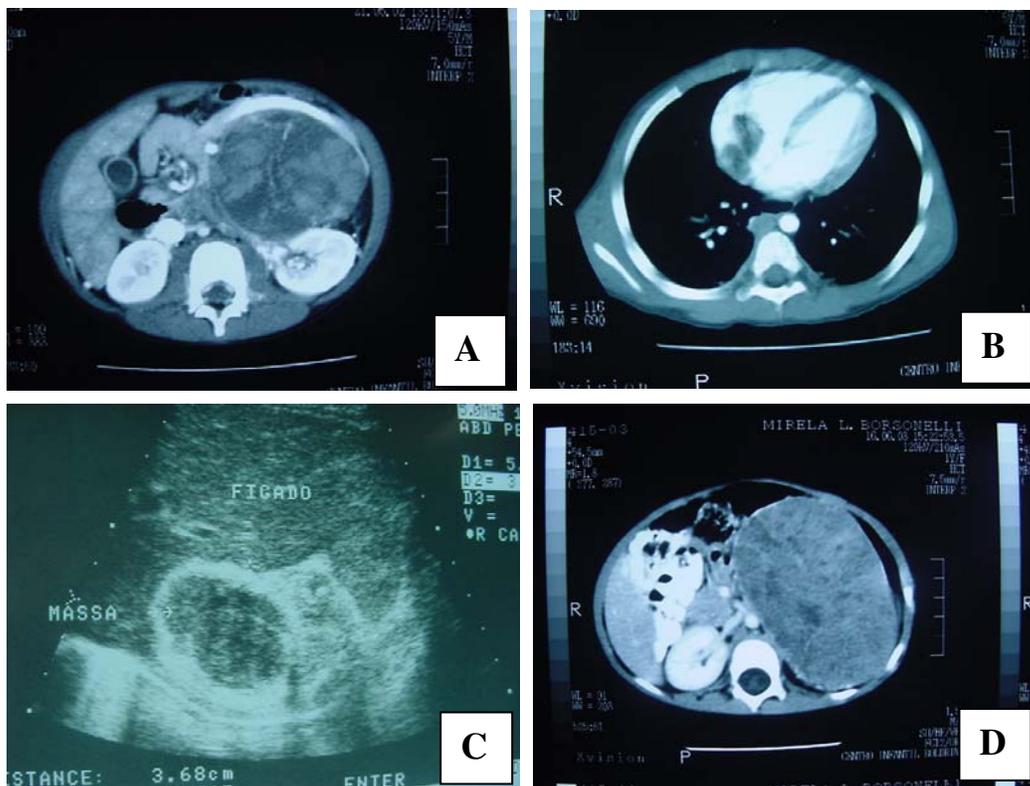
Figura 1- Quadro clínico de crianças portadoras de TCSR

Em crianças pequenas, a manifestação precoce da doença, a predominância de tumores funcionais virilizantes e a histologia tumoral, sugerem que estes tumores provêm da zona fetal do córtex adrenal e o intervalo entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e o diagnóstico pode variar de poucos dias a oito anos (média de cinco meses) (Ribeiro et al, 1990; Michalkiewicz et al, 2004). Esta discrepância pode ser explicada pelos fatores citados a seguir: tumores pequenos podem causar manifestações clínicas importantes antes que sejam detectados; as crianças com TCSR dificilmente se apresentam “doentes”, com queda do estado geral, apatia e astenia. Além disso, o crescimento tumoral pode ser lento, o que leva o atraso na procura por assistência médica. (Michalkiewicz et al, 2004).

1.4- Diagnóstico

O diagnóstico dos TCSR é simples e direto, uma vez que, frequentemente se trata de tumores funcionais que apresentam sinais e sintomas clínicos característicos. O diagnóstico laboratorial observa o aumento dos níveis séricos de hormônios adrenocorticais como: dehidroepiandrosterona (S-DHEA), testosterona, aldosterona e cortisol, bem como aumento dos níveis em amostras urinárias (17-hidroxicorticóides, 17- cetosteróides, S-DHEA) (Galindo et al, 2005).

Além disso, exames de imagem são necessários para estagiar a doença e realizar o planejamento cirúrgico. Primeiramente, realiza-se ultra-sonografia abdominal para delimitar o tamanho da lesão, verificar o comprometimento de órgãos vizinhos e presença de trombos na veia cava (Ribeiro et al, 2000). Em seguida, o exame de raios-X (RX) simples de abdome mostra presença de calcificações intratumorais quando estas estão presentes. A tomografia computadorizada (TC) e ressonância nuclear magnética (RNM) são outros importantes exames para detectar com mais precisão a relação do tumor com estruturas adjacentes e também a presença de metástases (Figura 2).



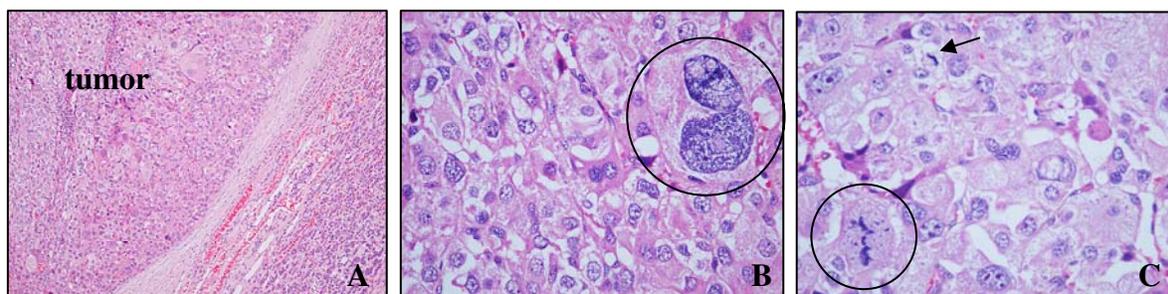
- A: Imagem de TC - massa tumoral com áreas de hemorragia e necrose
- B: Imagem de TC - presença de trombo intracaval
- C: Imagem de USG - massa tumoral
- D: Imagem de TC - grande massa tumoral com áreas de hemorragia e necrose

Figura 2- Exames de imagem de crianças portadoras de TCSR

Os tumores possuem pseudocápsula fina e podem apresentar áreas de calcificação e necrose (Ribeiro et al, 2000; Galindo et al, 2005; Allolio e Fassnacht, 2006). A invasão vascular é frequente e trombos tumorais intracavais (Figura 2) podem ser encontrados em cerca de 20 % dos casos devendo ser diagnosticados com precisão para o adequado planejamento terapêutico (Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005). Os TCSR podem apresentar metástases à distância envolvendo fígado, pulmão, rins e/ou ossos, nesta ordem e, portanto a investigação diagnóstica adequada por imagem deve ser realizada (Galindo et al, 2005).

1.5- Histologia

Do ponto de vista histológico, a distinção entre tumores benignos (adenomas) e malignos (carcinomas), na glândula supra-renal, pode ser difícil de ser realizada (Figueiredo et al, 1999; Galindo et al, 2005). Macroscopicamente os adenomas tendem a ser bem definidos e esféricos, e, normalmente, não invadem estruturas adjacentes. Microscopicamente, podem apresentar córtex adrenal normal, sendo compostos por células com núcleos arredondados e regulares, citoplasmas claros, dispostos num modelo sinusoidal, trabecular ou sólido com vasculatura proeminente. Já os carcinomas apresentam características que sugerem malignidade. São tumores maiores, lobulados, com extensas áreas de hemorragia e necrose. Microscopicamente os carcinomas apresentam grandes células com citoplasma eosinofílico, agrupadas em cachos e com figuras de atipia celular e mitoses atípicas (Galindo et al, 2005) (Figura 3).



A- tumor e adrenal normal separados por septo fibroso.

B- atipia celular tumoral -célula bi-nucleada e poli-nucleolada (círculo).

C- mitose atípica (círculo).

- mitose típica (seta).

Figura 3- Imagem de microscopia óptica de TCSR

1.6- Tratamento

O tratamento dos TCSR em crianças é baseado no estadiamento da doença (tabela 1), sendo a cirurgia com ressecção completa do tumor e sem ruptura a forma mais eficaz para a cura de pacientes com doença local (Vassilopoulou e Schultz, 2001; Galindo et al, 2005; Kirschner, 2006).

A abordagem cirúrgica é realizada por um acesso transabdominal amplo com ressecção em bloco do tumor e estruturas adjacentes quando necessário. A nefrectomia ou ressecções parciais hepáticas podem ser necessárias nos casos de grandes tumores que podem se aderir a estruturas adjacentes e apresentar áreas friáveis com pontos de necrose. Nestes casos, pode ocorrer ruptura capsular durante a ressecção cirúrgica, que acontece em 20% das ressecções iniciais e em até 43% das cirurgias para doença recorrente (Sandrini et al, 1997; Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005). A cirurgia laparoscópica ainda é controversa, devendo ser realizada em casos selecionados de ressecções de pequenos tumores (de 3 a 5 cm) e com uma equipe especializada no procedimento.

Estudos de Michalkiewicz et al (2004), mostraram que embora não seja um fator independente de mau prognóstico, a ruptura tumoral está intimamente relacionada com pior evolução do caso e, portanto, deve ser evitada, recomendando-se extremo cuidado na realização da ressecção dos TCSR. A quimioterapia com Mitotane® e agentes sistêmicos é indicada para casos de doença avançada ou com alto risco de recorrência (Galindo et al, 2005), sendo esta droga uma inibidora da biossíntese de corticóides causando a destruição de células adrenocorticais. Seu uso em baixas doses anula a secreção de esteróides adrenais, promovendo melhora dos sintomas e regressão parcial da disfunção endócrina na maioria dos pacientes com tumores funcionais (Luton et al, 1990; Galindo et al, 2005). Altas doses do medicamento são necessárias para que se tenha efeito adrenolítico (Vassilopoulou e Schultz, 2001; Wajchemberg et al, 2000; Galindo et al, 2005). Aproximadamente 20 a 30% dos pacientes com doença avançada têm boa resposta com o uso de Mitotane® isoladamente (Vassilopoulou e Schultz, 2001; Galindo et al, 2005). As manifestações gastrintestinais são os efeitos adversos mais comuns dessa droga (Galindo et al, 2005).

Outros agentes quimioterápicos têm sido utilizados no tratamento de TCSR. A cisplatina, por exemplo, apresenta boa resposta em 25% dos pacientes (Galindo et al, 2005). Esquemas compostos pela combinação de cisplatina® com doxorubicina® e ciclofosfamida® ou 5-fluorouracil® (Galindo et al, 2005) também mostraram bons efeitos em 20 a 40% dos casos. Além desses, a associação cisplatina® e etoposide® apresenta resultados satisfatórios (Wajchemberg et al, 2000; Galindo et al, 2005; Hovi et al, 2003). No entanto, o uso da radioterapia em TCSR não tem sido eficaz, sendo estes tumores considerados radio resistentes (Wajchemberg et al, 2000; Galindo et al, 2005).

1.7- Estadiamento

O estadiamento para os TCSR tem sido motivo de discussão na literatura médica, sendo que vários autores utilizam o esquema proposto por MacFarlane (McFarlane, 1958) e modificado por Sullivan et al (Michalkiewicz et al, 2004). O estadiamento inicialmente proposto para adultos se baseia no tamanho da lesão, no comprometimento de nódulos linfáticos regionais e na presença de metástase à distância. Em estudo com 40 casos de crianças com TCSR, Ribeiro et al (1990) relataram que o volume tumoral maior que 200 ml ou o peso maior que 80 gramas, além da idade ao diagnóstico maior do que 3,5 anos estavam associados a prognóstico desfavorável. Dados do *International Pediatric Adreno Cortical Tumor Registry* (IPACTR) mostraram que os fatores prognósticos associados à boa evolução foram: idade menor que três anos, tumores pequenos (< 200g), presença da virilização e estádios iniciais (Michalkiewicz et al, 2004).

Diferentemente do estadiamento anterior, a proposta de Sandrini et al (1993) tem sido a mais adotada para classificação dos tumores em crianças e considera o tipo de ressecção do tumor, o peso e volume tumoral e a presença de metástases à distância (Ribeiro et al, 1990; Sandrini et al, 1993; Wieneke et al, 2003; Michalkiewicz et al, 1997) (Tabela 1).

Tabela 1- Estadiamento TCSR segundo Sandrini et al. (1993)

Estádio	Descrição
I	Tumor pequeno completamente ressecado (<100g e <200 cm ³) com normalização dos níveis hormonais pós-operatório
II	Tumor completamente ressecado (>100g ou >200 cm ³) com normalização dos níveis hormonais pós-operatório
III	Tumores irressecáveis ou com doença residual microscópica; I ou II que não normalizem os níveis hormonais após a cirurgia
IV	Metástases à distância ao diagnóstico

1.8- Prognóstico

Estes critérios nos permitem identificar três grupos prognósticos distintos: **1)** pacientes com tumores pequenos (≤ 200 g) e totalmente ressecados com alta taxa de sobrevida; **2)** pacientes com tumores maiores (≥ 200 g) e totalmente ressecados de prognóstico intermediário e **3)** aqueles com doença residual ou metástases à distância com pior prognóstico (Michalkiewicz et al, 2004).

Observou-se em análise multivariada que crianças com idade inferior a quatro anos apresentam melhor prognóstico e maior taxa de sobrevida quando comparada às crianças maiores (Icard et al, 1992; Stojadnovic et al, 2002). A virilização como manifestação clínica isolada foi relacionada com melhor prognóstico. Já aquelas com síndrome de Cushing isolada ou combinada a outras síndromes endócrinas manifestavam-se com pior prognóstico (Michalkiewicz et al, 2004), bem como a presença de ruptura tumoral intraoperatória (Allolio e Fassnacht, 2006).

O intervalo entre o aparecimento dos primeiros sinais e sintomas e o diagnóstico da doença não tem relação com o tamanho da lesão ou com a agressividade do tumor (Michalkiewicz et al, 2004). Segundo os autores, há uma fase inicial de progressão de crescimento tumoral caracterizada principalmente por manifestações endócrinas,

sem evidência de presença de massa palpável, seguida de uma fase subsequente de progressão rápida da lesão.

Outras variáveis são consideradas importantes na identificação de grupos de risco. Weiss et al (1989) propuseram um *score* baseado nas características derivado de características histopatológicas como invasão capsular, invasão venosa, invasão sinusoidal, comprometimento de órgãos adjacentes, presença de necrose tumoral, taxa de mitoses e presença de mitoses atípicas que mostrou ter um valor prognóstico nos TCSR (Weiss et al, 1989; Michalkiewicz et al, 2004; Galindo et al, 2005; Assié et al, 2007; Libé et al, 2007). O tamanho e peso da lesão, por exemplo, têm valor prognóstico importante e independente (Harrison et al, 1999) e a taxa de mitoses é uma variável importante relacionada à agressividade tumoral (Weiss et al, 1989; Harrison et al, 1999; Kendrick et al, 2001). Estes dois últimos são considerados fatores determinantes para diferenciar lesões de maior agressividade (Michalkiewicz et al, 2004).

Ainda como parte dos fatores que levam a uma agressividade tumoral, o processo de metástase parece ser mediado por vários elementos como: **1)** presença de receptores célula-célula e célula-matriz extracelular, **2)** presença de enzimas proteolíticas que facilitam a invasão da membrana celular, de canais vasculares e órgãos, **3)** fatores de “mobilidade“ que propiciam a migração celular pelos tecidos, **4)** fatores de crescimento necessários para a manutenção de mitocôndrias tumorais no órgão secundário e finalmente, **5)** elementos angiogênicos que resultam em neovascularização, propiciando aporte de nutrientes e remoção de metabólitos de células tumorais, que levam ao desprendimento de células metastáticas (Beavon, 2000).

A adesão celular participa de maneira ativa na regulação da diferenciação, proliferação das células metastáticas e apoptose. Esta possui tanto efeito sinalizador quanto morfogenético, justificando sua grande importância na biologia tumoral (Harrison et al, 1999; Miguel et al, 2004).

1.9- Complexo caderina-catenina

As caderinas e as cateninas são importantes moléculas de adesão do tecido epitelial normal, formando o complexo denominado caderina-catenina, com importante papel na formação e manutenção da arquitetura tissular (Tsuchiya et al, 2006) (Figura 4).

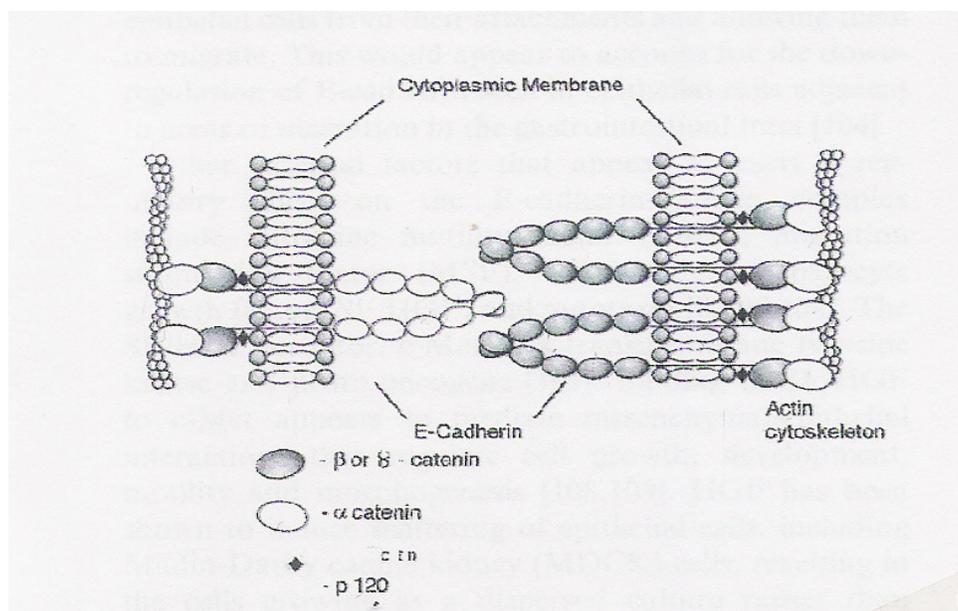


Figura 4- Complexo caderina-catenina (fonte: Beavon, 2000)

As caderinas compreendem grande número de moléculas de adesão localizadas nas junções intercelulares que estabelecem ligação entre as células por meio de interações homofílicas proteína-proteína (Ramburan e Govender, 2002; Miguel et al, 2004). O reconhecimento de um papel importante das caderinas na determinação do fenótipo epitelial, na migração celular, na diferenciação celular e na disseminação tumoral tem estimulado grande interesse nesta família de moléculas de adesão (Peredes et al, 2002). Dentre elas, a E-caderina (Human Epithelial Cadherin) é uma glicoproteína transmembrana cálcio-dependente envolvida diretamente no processo de adesão celular (Ramburan e Govender, 2002; Miguel et al, 2004).

Já as cateninas, incluindo α , β e γ cateninas têm um papel importante na transdução do sinal intercelular. A β -catenina destaca-se por se ligar diretamente à porção citoplasmática da E-caderina (Miguel et al, 2004) e também à estrutura dos microfilamentos de actina ao citoesqueleto, reforçando seu representativo papel na adesão celular (Beavon, 2000). Além disso, observou-se que o gen da β -catenina está localizado em uma região do genoma humano que se encontra frequentemente alterado em várias neoplasias malignas.

Além da redução da expressão da β -catenina, a desregulação do complexo caderina-catenina está presente em diversos tumores malignos, especialmente naqueles de caráter mais agressivo com maior potencial de metástases. (Beavon, 2000; Miguel et al, 2004; Tissier, 2005). Em virtude disso, a diminuição da E-caderina e β -catenina têm sido considerados marcadores moleculares da progressão tumoral e de mau prognóstico (Nakanishi et al, 1997).

As alterações na adesão de células tumorais refletem-se no nível da adesão celular e no padrão de crescimento tumoral. Portanto, o desprendimento destas células é considerado o início do processo de disseminação tumoral local e à distância (Beavon, 2000).

Há várias evidências sobre o papel da E-caderina no controle da invasão tumoral: **1)** muitos cânceres apresentam uma relação inversa com os níveis de E-caderina e o comportamento metastático, **2)** níveis elevados de E-caderina são usualmente associados a menores índices de metástases em certos tipos de tumor, **3)** bloqueio da E-caderina aumenta a mobilidade da célula tumoral e seu potencial de invasão e metástase e **4)** níveis elevados de E-caderina no câncer de mama inibem sua disseminação.

Dessa forma, a expressão de moléculas de adesão pode refletir comportamentos biológicos característicos dos tumores, auxiliando a avaliar riscos de metástases e recidivas em uma série de tumores como carcinoma de esôfago (Nakanishi et al, 1997; Lin et al, 2004), carcinoma de glândulas salivares (Franchi et al, 1999; Gupta et al, 2001), câncer de tireóide (Wasielwsky et al, 1997; Gupta et al, 2000), câncer de pulmão (Sulzer et al, 1998; Gupta et al, 2001; Salon et al, 2004), tumor de fígado

(Charpin et al, 1998; Gupta et al, 2000), tumor gástrico (Zavala et al, 2007) e câncer de mama (Paredes et al, 2002).

Os critérios de malignidade dos TCSR em crianças, ao contrário da população adulta, ainda são incertos não nos permitindo avaliar com segurança o comportamento biológico destes tumores com bases exclusivamente morfológicas (Weiss et al, 1989; Wieneke et al, 2003). Portanto, a busca por novos marcadores é de extrema importância para o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e melhor programação terapêutica destes tumores.

Baseada nestes dados, a pesquisa da expressão de E-caderina e β -catenina nos TCSR de crianças, pode trazer contribuição sobre os mecanismos de evolução e progressão da doença, possibilitando assim o tratamento mais adequado e individualizado das crianças com este raro tipo de tumor.

2- OBJETIVOS

- 1- Analisar a expressão da E-caderina e β -catenina em TCSR de crianças.
- 2- Avaliar a correlação da expressão da E-caderina e β -catenina com a evolução das crianças tratadas de tumores do córtex da supra-renal.

3- MÉTODOS

3.1- População de estudo e avaliação dos dados clínicos

Foi realizado um estudo de coorte transversal com análise retrospectiva dos prontuários de crianças de 5 a 188 meses com diagnóstico de TCSR tratadas no Centro Infantil Dr. Domingos A. Boldrini, em Campinas, SP, no período de janeiro de 1998 a janeiro de 2005.

Foram selecionados para este estudo apenas pacientes com diagnóstico de TCSR submetidos a procedimentos cirúrgicos, associados ou não a outros tratamentos e que possuíam material disponível para análise histopatológica e imunoistoquímica. Além dessas exigências, as crianças selecionadas na amostra apresentavam no mínimo de um ano e meio de seguimento após o tratamento.

Depois de aplicados os critérios de inclusão e exclusão e obtida a aprovação do comitê de ética e pesquisa (apêndice um), foram analisados os prontuários de 33 crianças para a coleta de dados referentes ao sexo e idade dos pacientes ao diagnóstico (em meses), apresentação clínica, tempo de aparecimento dos sintomas, presença de hipertensão arterial, dosagens de Sulfato Dehidroepiandrosterona (S-DHEA), lateralidade do tumor, presença de metástases ao diagnóstico, utilização de quimioterapia pré-operatória, tipos de cirurgias realizadas, ocorrência de ruptura tumoral, estadiamento da doença, uso de tratamento quimioterápico pós-operatório, presença de recidiva e sobrevida das crianças.

Os dados foram levantados exclusivamente pela autora, por meio de um formulário específico (apêndice dois).

A classificação dos pacientes quanto aos estádios evolutivos da doença foi estabelecida de acordo com a proposta de Sandrini *et al.* (1993) (Tabela 1).

3.2- Avaliação histopatológica

Para a análise histopatológica foram recuperados 30 blocos de parafina com TCSR referentes a 30 pacientes, nos quais foi possível a realização dos exames de hematoxilina-eosina e avaliação imunohistoquímica da E-caderina e β -catenina.

Os materiais disponíveis foram analisados segundo os critérios abaixo descritos:

3.2.1- Avaliação macroscópica

Foram avaliados os pesos e medidas do tumor.

3.2.1.1- Peso em gramas

3.2.1.2- Tamanho em centímetros

3.2.2- Avaliação microscópica

Os cortes histológicos dos tumores, corados em hematoxilina-eosina, foram classificados de acordo com os critérios de Weiss revistos por Weiss, Medeiros e Vickery (1989) que incluem os seguintes parâmetros:

- 1- Grau nuclear (I, II, III e IV);
- 2- Taxa mitótica em 50 campos de grande aumento (0-5, 6-20, 21-50, > 50);
- 3- Mitoses atípicas (ausente, presente);
- 4- Citoplasma (26-100% claro, 0-25% claro);
- 5- Arquitetura das células tumorais (não-difusa, difusa);
- 6- Necrose (ausente, presente);
- 7- Invasão de vasos (ausente, presente);
- 8- Invasão de sinusóides (ausente, presente);
- 9- Invasão capsular (ausente, presente).

3.2.3- Técnica imunoistoquímica

Para realizar tal análise, foi empregada a técnica de *multitissue array* (Andrade, 2007), na qual foram analisados todos os pacientes em uma única lâmina, juntamente com o controle positivo do teste e a adrenal normal.

A única adrenal normal utilizada no estudo, provém de um paciente com tumor de Wilms operado sem quimioterapia prévia do qual a glândula necessariamente teve que ser retirada juntamente com o tumor. A adrenal normal não foi utilizada como grupo controle de comparação com os resultados de E-caderina e β -catenina nos TCSR analisados, já que o objetivo do estudo é verificar se há uma relação entre a expressão destes marcadores e a apresentação ao diagnóstico, como também com a evolução dos pacientes tratados.

As lâminas utilizadas na coleta dos dados foram desparafinadas com duas passagens em banho de xilol; a primeira passagem por 5 minutos na substância pré-aquecida a 60°C, e a segunda, pelo tempo de 5 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas foram imersas por 5 minutos em 4 concentrações diferentes de álcool, respectivamente, absoluto, 95%, 80% e por fim, álcool 70%, para uma hidratação progressiva. Posteriormente, foram lavadas em água corrente por três minutos e banhadas em água destilada.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, as lâminas receberam três banhos de peróxido de hidrogênio a 3%, à temperatura ambiente, por 7 minutos. Em seguida, elas foram lavadas em tampão PBS por 5 minutos (três passagens).

A recuperação antigênica é feita pela imersão das lâminas em tampão citrato 1ml:10ml, pH 6,0, durante 30 minutos, a 99°C usando-se panela a vapor; como alternativa pode ser utilizado tampão Tris-EDTA 0,05M pH 8,9. Posteriormente deixa-se esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos, para que então seja feita a lavagem das lâminas em tampão PBS e, na seqüência, sejam colocadas em solução tampão fosfato (PBS) durante 5 minutos.

As lâminas são incubadas com anticorpo primário em estufa a 37°C por 30 minutos e, em seguida, incubadas por toda a noite (12-16 horas), a 4°C, em câmara úmida. Em seguida, foram utilizados os seguintes anticorpos primários: **1)** E-Caderina (Cell Marque, pré-diluído, anticorpo monoclonal de IgG1/K de rato); **2)** B-Catenina (Novocastra, anticorpo monoclonal de IgG2a de rato). No dia seguinte, retira-se o excesso do anticorpo primário; segue-se lavagem e imersão em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. Após este processo, é aplicado o anticorpo secundário (Biotinylated Link Universal, DAKO) por 30 minutos a 37°C. Segue-se lavagem e imersão em tampão PBS por 5 minutos. Em seguida aplica-se a Streptavidina (Streptavidina-HRP, DAKO) por 30 minutos a 37°C. Segue-se lavagem e imersão em tampão PBS por 5 minutos.

A coloração das lâminas é realizada com DAB líquido (DAB + substrato, DAKO) - cromógeno de cor marrom impregnado no local onde ocorre a reação. Segue-se a contra coloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto e lavagem em água corrente e água destilada por três minutos. Posteriormente, as lâminas são desidratadas com banhos em álcool absoluto e passadas em xilol para posterior montagem com resina Entellan (Merck). A positividade da presença da E-caderina e β -catenina é evidenciada pela marcação do núcleo, membrana citoplasmática ou citoplasma das células tumorais em marrom que contrasta com a cor roxa dos núcleos das células não marcadas e coradas apenas pela hematoxilina de Harris.

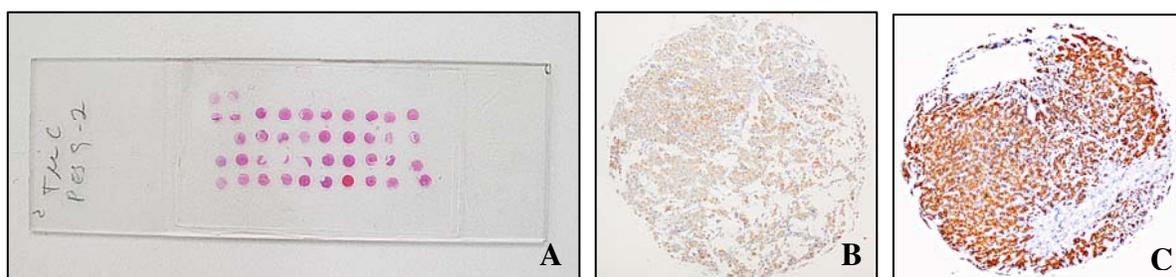
3.2.4- Técnica do *Tissue Microarray* (TMA)

Na segunda fase do trabalho, as lâminas histológicas e os blocos de parafina foram organizados para a técnica do *Tissue microarray* (TMA). Este método permite a realização simultânea de reações imunoistoquímicas de todos os casos de tumor da cortical da adrenal e da glândula adrenal não tumoral. Para a construção do TMA, foram selecionadas, nos casos de tumor da cortical de adrenal, duas áreas com maior representatividade tumoral, procurando-se evitar áreas com necrose e hemorragia. Na glândula adrenal não tumoral, também foram selecionadas duas áreas mais representativas. Os blocos originais foram denominados de blocos doadores. O bloco final

contendo as áreas selecionadas dos tumores e da glândula não tumoral, foi denominado de bloco receptor. Uma planilha foi construída com eixo XY, que se refere à coluna e linha, respectivamente, e os números de cada bloco colocados em sequência.

Nesta técnica, após a retirada do cilindro de parafina do bloco receptor (1,5 mm de diâmetro), perfura-se o primeiro bloco doador nas áreas previamente marcadas, obtendo-se o cilindro de tecido tumoral dentro da agulha. O tecido é, então, implantado na respectiva cavidade do bloco receptor, usando-se um instrumento de precisão. Este procedimento é repetido sucessivamente em todos os blocos de tumor da cortical de adrenal e de glândula supra-renal não tumoral.

Ao final foram obtidas amostras seqüenciadas e distribuídas em um único bloco receptor que continha: **1)** 30 casos de tumores da cortical da adrenal com duas amostras de cada caso, **2)** duas amostras da glândula supra-renal não tumoral, **3)** um controle interno positivo e **4)** uma amostra de tecido renal normal para orientação de leitura. O total é de 70 cilindros (Figura 5).



A: lâmina TMA com os cilindros fixados e corados pela hematoxilina-eosina.

B: cilindro de um tumor corado para pesquisa de E-caderina.

C: cilindro de um tumor corado para pesquisa de β -catenina.

Figura 5- Lâmina do *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

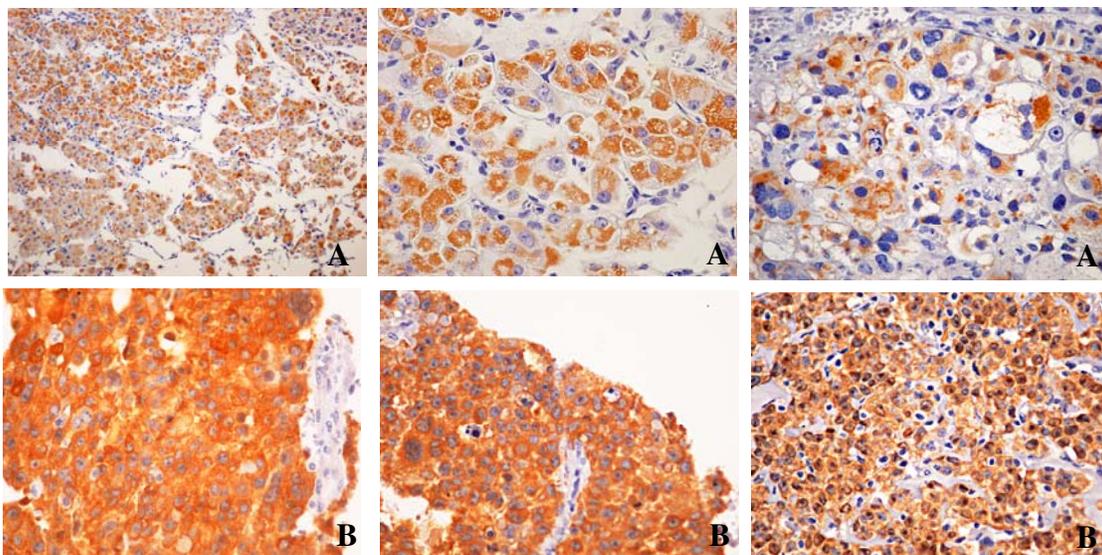
Para controle positivo de β -catenina e de E-caderina, foram utilizados cortes histológicos de pele. Para cada um dos marcadores, foram realizados controles negativos, com a omissão do anticorpo primário.

Cortes em dois níveis do bloco receptor (primeiro e último corte) foram corados em hematoxilina-eosina para demonstração da qualidade das amostras. Os demais cortes foram encaminhados para coloração imunoistoquímica.

3.2.5- Método de leitura das lâminas do TMA

O *score* de Weiss e a leitura das reações imunoistoquímicas foram realizados independentemente por dois patologistas, e os casos de discordância foram reavaliados em conjunto para estabelecimento de um consenso quanto à avaliação histopatológica. A análise imunoistoquímica foi iniciada sempre na parte superior da lâmina de TMA, onde o corte de rim normal é considerado o início.

A planilha com a determinação dos casos é importante no mapeamento, bem como na identificação a imunoexpressão de cada caso quanto a sua qualidade e quantidade. As duas amostras das diferentes áreas de cada caso de TCSR e as duas amostras de tecido glandular normal permitem maior representatividade e, dessa maneira, diminui-se a possibilidade de casos não representados. É considerada aceitável a não representação de até 30% dos casos em cada lâmina. Para os cilindros eventualmente não representados, a reação de imunoistoquímica foi repetida (Figura 6).



A: expressão da E-caderina

B: expressão da β -catenina

Figura 6- Fotos de TCSR corados para E-caderina e β -catenina

Foram avaliados os seguintes elementos imunoistoquímicos e histopatológicos durante a leitura das lâminas de TMA:

Intensidade da reação:

A- Positiva forte: 3/3. Para intensidade da coloração da reação igual a do controle positivo utilizado;

B- Positiva moderada: 2/3. Para intensidade da coloração da reação menor do que a do controle positivo utilizado, sendo observada com clareza com a objetiva de 10X (aumento de 100X);

C- Positiva fraca: 1/3. Para intensidade da coloração da reação bem menor do que a do controle positivo usado, observada com aumento de 400X;

D- Negativa: Para ausência de coloração imunoistoquímica.

Extensão da positividade da reação (positividade da reação/ área de tumor avaliável):

A amostra de formato circular foi dividida em quatro quadrantes e a área de tumor avaliável é colocada no denominador da fração:

A- $X/4 = 100\%$ da amostra viável e avaliável.

B- $X/3 = 75\%$ da amostra viável e avaliável.

C- $X/2 = 50\%$ da amostra viável e avaliável.

D- $X/1 = 25\%$ da amostra viável e avaliável.

No numerador desta fração está indicada em quantos quadrantes a reação imunistoquímica é positiva no tumor:

A- $4/4$: reação 100% positiva, englobando os quatro quadrantes do tumor.

B- $3/X$: reação positiva em três quadrantes do tumor.

C- $2/X$: reação positiva em dois quadrantes do tumor.

D- $1/X$: reação positiva em um quadrante do tumor.

E- $0,5/X$: reação positiva em menos de um quadrante do tumor.

F- $0/X$: reação negativa em todos os quadrantes do tumor.

3.3- Consentimento livre e esclarecido

Foi obtido consentimento livre e esclarecido dos pais ou responsáveis pelas crianças para a realização deste estudo (Apêndice três). Já para o uso da adrenal normal, foi obtido consentimento livre e informado dos pais da criança conforme modelo em anexo (Apêndice quatro).

3.4- Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi feita por meio do uso do teste χ^2 , teste exato de Fischer e análise das curvas de sobrevida de Kaplan-Meier.

O poder do teste foi calculado após a coleta de dados para um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

4- RESULTADOS

No presente estudo, do total de 33 pacientes pesquisados, 24 eram do sexo feminino (72,7%) e 9 do sexo masculino (27,3%), perfazendo uma relação feminino/masculino de 2,6: 1. A idade dos sujeitos variou de 5 a 188 meses, com mediana de 22,5 meses, sendo que 17 crianças eram < 2 anos e 16 eram ≥ 2 anos (Tabela 2). Quando analisada a idade ao diagnóstico e sobrevida, foi verificado que crianças menores de dois anos apresentavam melhor evolução (Figura 7).

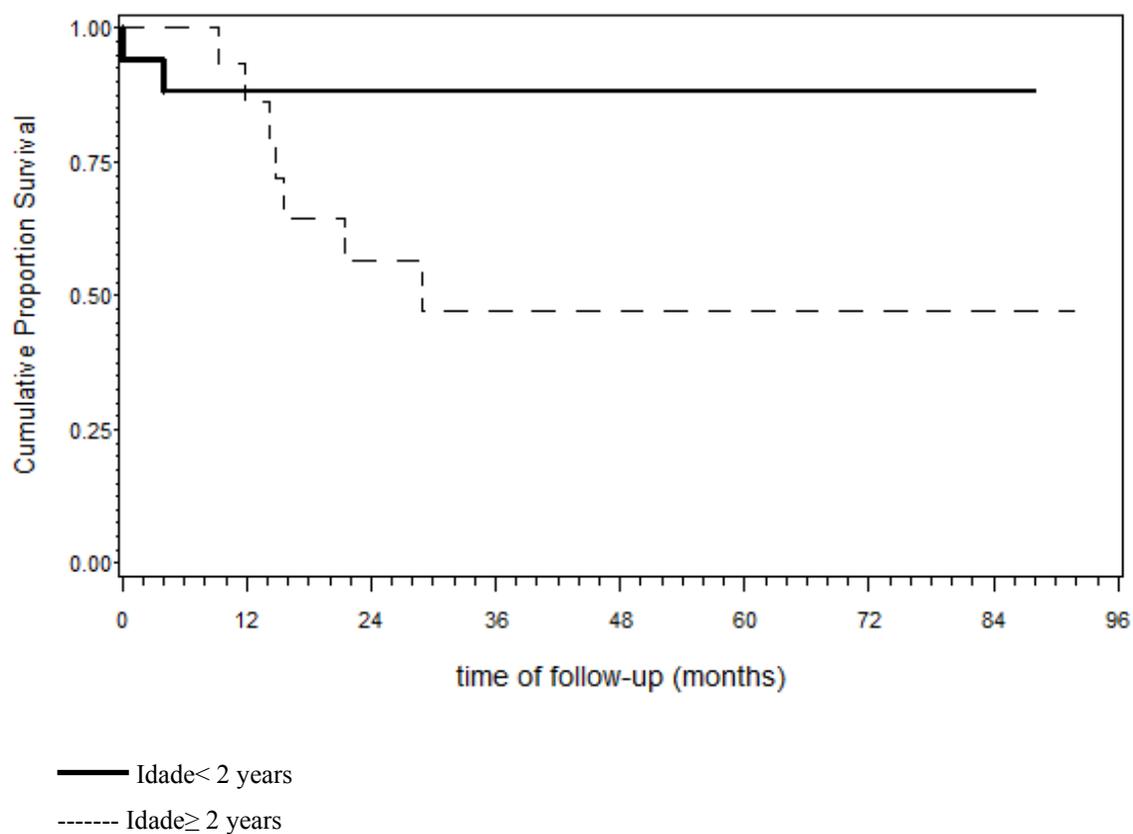


Figura 7- Gráfico da relação idade X sobrevida ($p = 0,0321$)

As apresentações clínicas predominantes foram a virilização isolada, presente em 16 casos (48,5%) e a apresentação mista (virilização e Síndrome de Cushing associadas) em 11 casos (33,3%). Quatro pacientes eram assintomáticos (12,1%) e dois deles apresentaram a Síndrome de Cushing (6,1%) (Tabela 2).

Apenas dois pacientes (6%) apresentaram hipertensão arterial no diagnóstico e tiveram sua pressão sanguínea controlada antes da cirurgia com medidas simples (Tabela 2).

Tabela 2- Características clínicas de 33 pacientes com TCSR

Característica clínica	n	%
Idade em anos		
< 2 anos	17	51,5
≥ 2 anos	16	48,5
Sexo		
Feminino	24	72,7
Masculino	9	27,3
Apresentação clínica		
Virilização	16	48,5
Síndrome de cushing	2	6,1
Mista	11	33,3
Assintomático	4	12,1
Hipertensão ao diagnóstico		
Sim	2	6,3
Não	30	93,8

Os sinais clínicos encontrados foram pilificação pubiana prematura em 66,7% dos casos (n = 22), aumento do clitóris em 45,5% (n = 15), acne em 33,3% (n = 11), aumento do tamanho do pênis em 18,2% (n = 6), massa abdominal em 15,2% (n = 5), aumento da musculatura em 12,1% (n = 4), estrias abdominais em 9,1% (n = 3) e agressividade em 3% dos casos (n = 1) (Tabela 3).

Tabela 3- Sinais clínicos encontrados na população de estudo

Sinais clínicos	n	%
Pilificação	22	66,7
Aumento de clitóris	15	45,5
Acne	11	33,3
Aumento de pênis	6	18,2
Massa abdominal	5	15,2
Aumento da musculatura	4	12,1
Estrias abdominais	3	9,1
Agressividade	1	3,0

O tempo desde o início dos sintomas até o diagnóstico variou de 1 a 24 meses com mediana de cinco meses.

As dosagens de sulfato dehidroepiandrosterona (S-DHEA) ao diagnóstico foram recuperadas em 31 pacientes (dois pacientes foram operados em outro serviço e não tinham realizado a dosagem) e se mostravam muito elevadas em 28 pacientes (valores variaram entre 20 e 51.834 mg/dia, mediana = 2.305 mg/dia). Os pacientes com ressecção completa do tumor apresentaram queda dos valores de S-DHEA para níveis normais após um mês da cirurgia.

O lado da glândula mais afetado foi o direito em 20 pacientes (60,6%). Através da avaliação radiológica constatou-se a presença de adenomegalia loco regional em apenas um paciente e trombos tumorais no interior da veia cava em cinco casos (15,2%). Foi observado invasão de órgãos vizinhos em quatro pacientes (12,1%). A presença de metástase ao diagnóstico foi encontrada em 15,2% dos pacientes (n = 5), o fígado estava comprometido em todos os casos, estando associado ou não à metástase pulmonar ou ganglionar.

O tratamento quimioterápico pré-operatório (QTPO) foi realizado em 15,2% dos pacientes (n = 5) e as drogas utilizadas foram: etoposide em 80% dos pacientes (n = 4), cisplatina em 80% (n = 4), Mitotane[®], em 60% (n= 3), e doxorubicina, em 40% dos casos (n = 2). A indicação de QTPO deveu-se à presença de trombo tumoral intracaval em três casos, estágio IV em um caso e tumor de grande dimensões (10,2 X 11,1 X 10,5 cm, volume 870 cm³) em outro caso.

A ressecção completa sem ocorrência de ruptura tumoral foi realizada em 69,7% dos casos (n = 23) e a ressecção completa com ruptura em 18,2% dos casos (n = 6). A biópsia por laparotomia ou laparoscopia foi realizada em três pacientes (9,1%) e a ressecção tumoral parcial em apenas um paciente (3%) (Tabela 4).

Tabela 4- Tipos de cirurgias realizadas nos pacientes com TCSR

Tipo de cirurgia	n	%
Ressecção completa sem ruptura tumoral	23	69,7
Ressecção completa com ruptura tumoral	6	18,2
Ressecção parcial	1	3
Biópsia tumoral	3	9,1
Total	33	100

Dez crianças foram submetidas ao tratamento quimioterápico pós-operatório, com administração de Mitotane[®], em 70% delas (n = 7), etoposide, em 60% (n = 6), cisplatina, em 60% (n = 6) e doxorrubicina em 40% das crianças (n = 4).

De acordo com o estadiamento proposto, dezesseis pacientes foram classificados como estágio I (51,5%), nove como estágio II (27,3%), dois como estágio III (6,1%) e seis como estágio IV (15,2%) (Tabela 5). Quando analisadas as curvas de sobrevida em relação ao estadiamento, foi verificada associação significativa de pior prognóstico com os maiores estádios (Figura 8).

Tabela 5- Estadiamento de 33 crianças com TCSR

Estadiamento	n	%
I	17	51,5
II	9	27,3
III	2	6,0
IV	5	15,2
Total	33	100

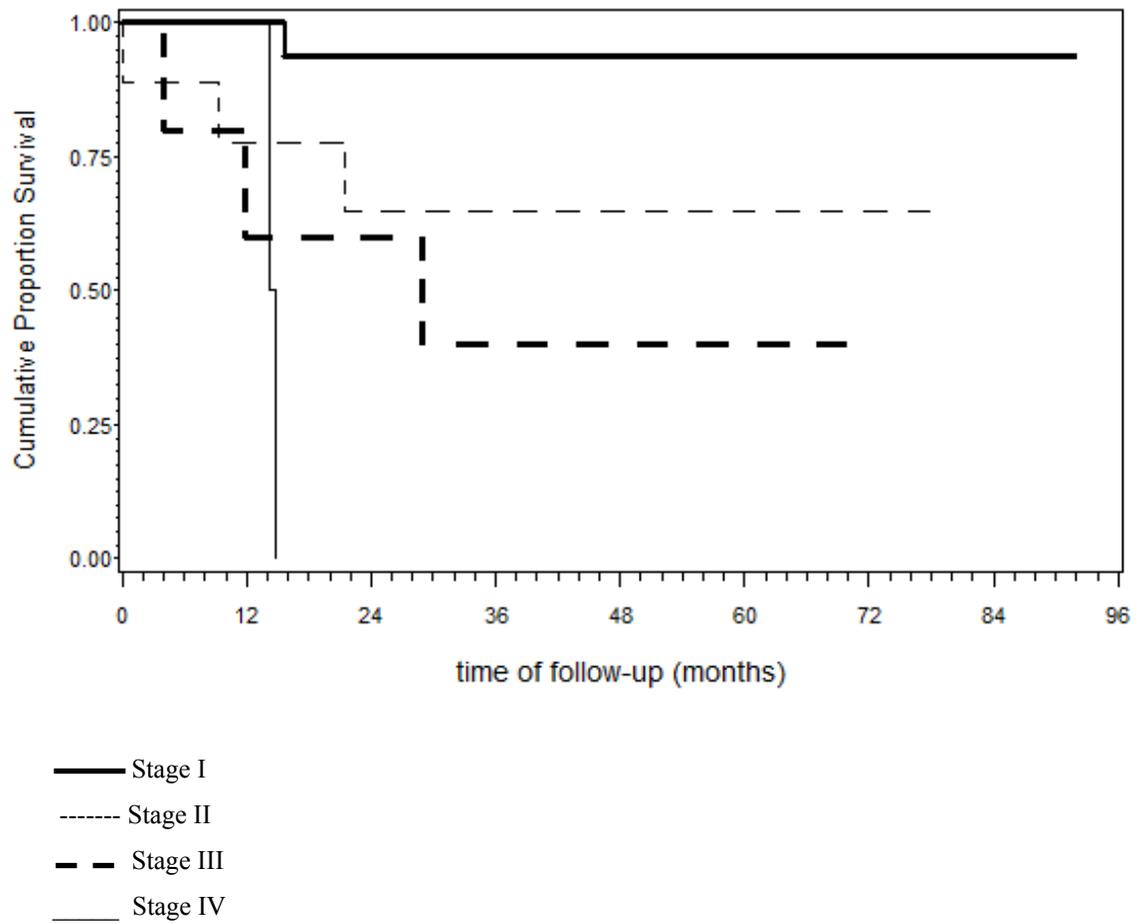


Figura 8- Gráfico da relação entre estadiamento e sobrevida ($p=0,0105$)

A recidiva tumoral ocorreu em quatro crianças (12,1%), sendo uma na glândula contralateral, uma pulmonar, uma em retroperitônio e outra peritoneal. Quando analisadas as curvas de Kaplan-Meier, a recidiva afetou negativamente a sobrevida (Figura 9).

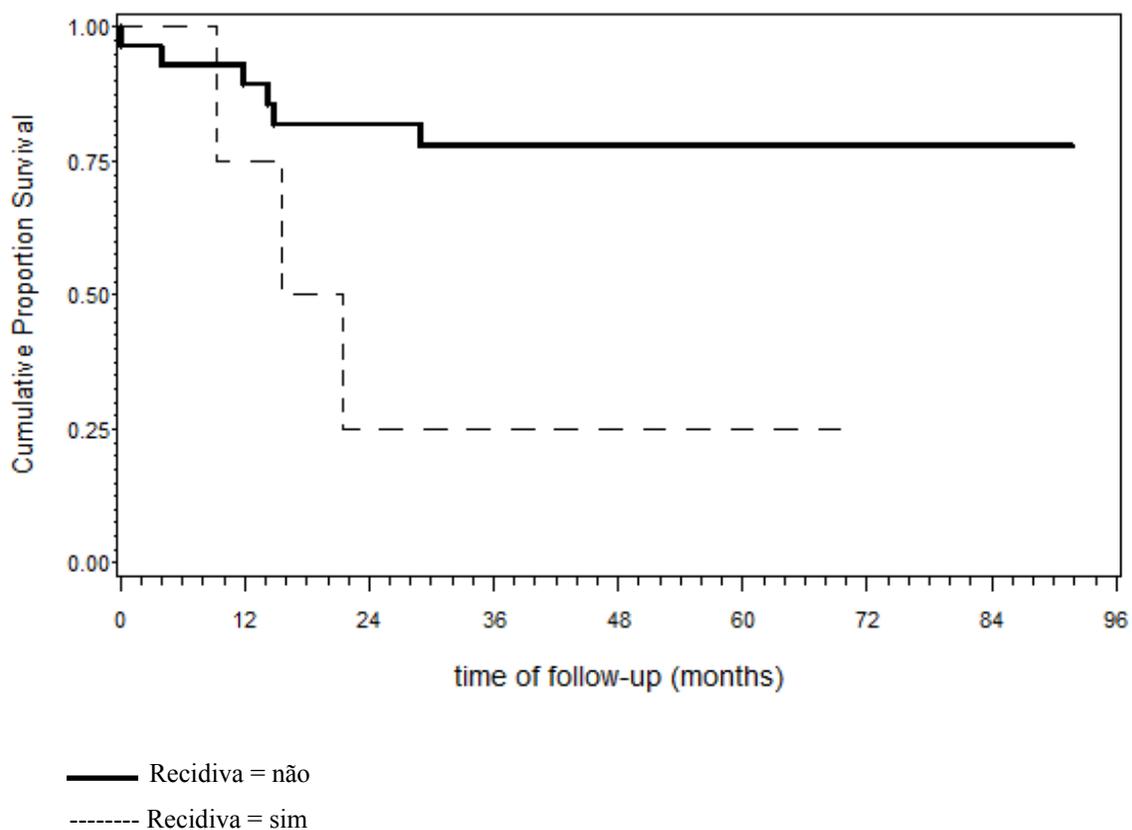


Figura 9- Gráfico da relação entre recidiva e sobrevida ($p = 0,0283$)

Quando realizada a análise histológica das lâminas estudadas, foi observada influência significativa na sobrevida dos pacientes que apresentavam invasão de estruturas adjacentes (Tabela 6 e Figura 10).

Tabela 6- Análise da correlação entre presença de invasão de estruturas adjacentes e status dos pacientes

Invasão estruturas adjacentes	Vivo	Morto	Total
Sim	1	3	4
Não	21	5	26
Total	22	8	30

p = 0,0525 (teste exato de Fisher)

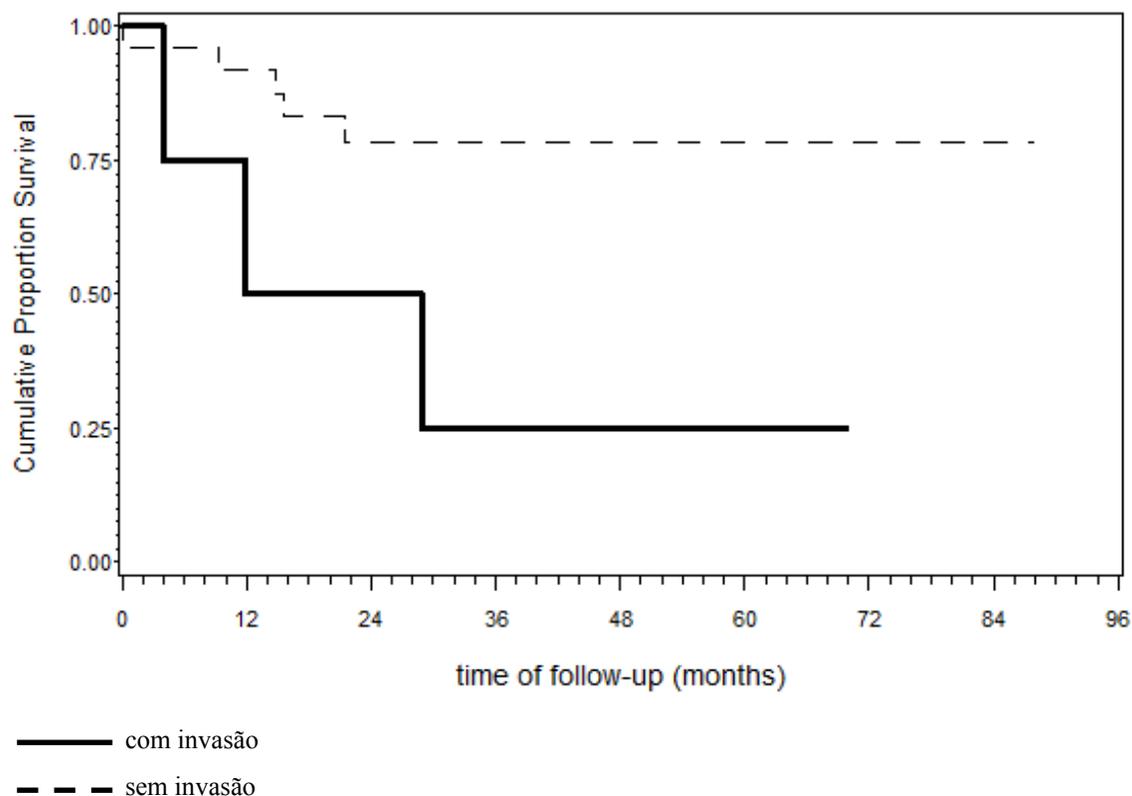


Figura 10- Gráfico da relação entre presença de invasão de estruturas adjacentes e status dos pacientes (p = 0,0197)

Foi observada influência significativa da ruptura tumoral na sobrevida dos pacientes através da curva de Kaplan-Meier (Tabela 7 e Figura 11).

Tabela 7- Análise da correlação entre presença de ruptura e status dos pacientes

Ruptura	Vivo	Morto	Total
Sim	3	3	6
Não	20	3	23
Total	23	6	29

$p = 0,0828$ $p(KM) = 0,0469$

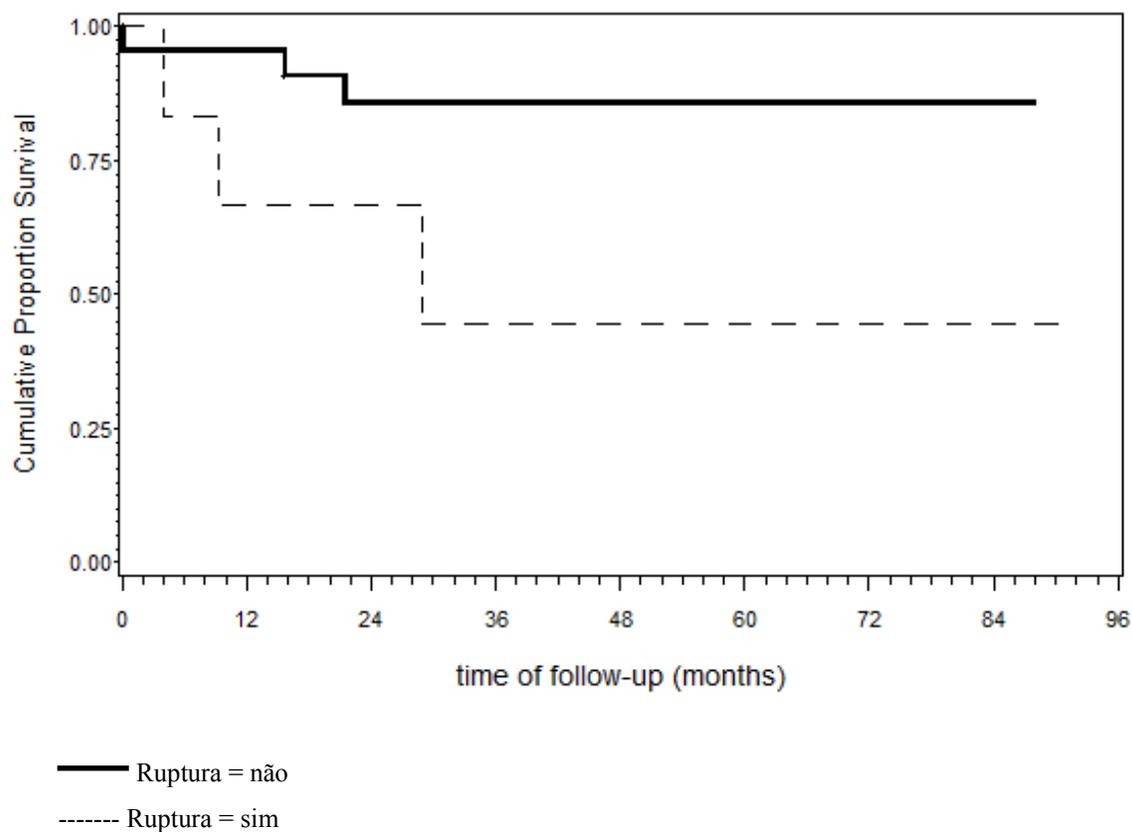


Figura 11- Gráfico da relação entre presença de ruptura tumoral e status dos pacientes ($p=0,0469$)

Quando analisada a correlação entre ruptura tumoral e recidiva, observamos que, excetuando-se a presença de recidiva da doença, a ocorrência de ruptura tumoral afetou negativamente a sobrevida (Tabela 8 e Figura 12).

Tabela 8- Análise da correlação entre ruptura tumoral, recidiva e status do paciente

Ruptura / Recidiva	Vivo	Morto	Total
Sim / Sim	0	1	1
Não / Sim	1	2	3
Sim / Não	3	2	5
Não / Não	19	1	20
Total	23	6	29

p = 0,0059

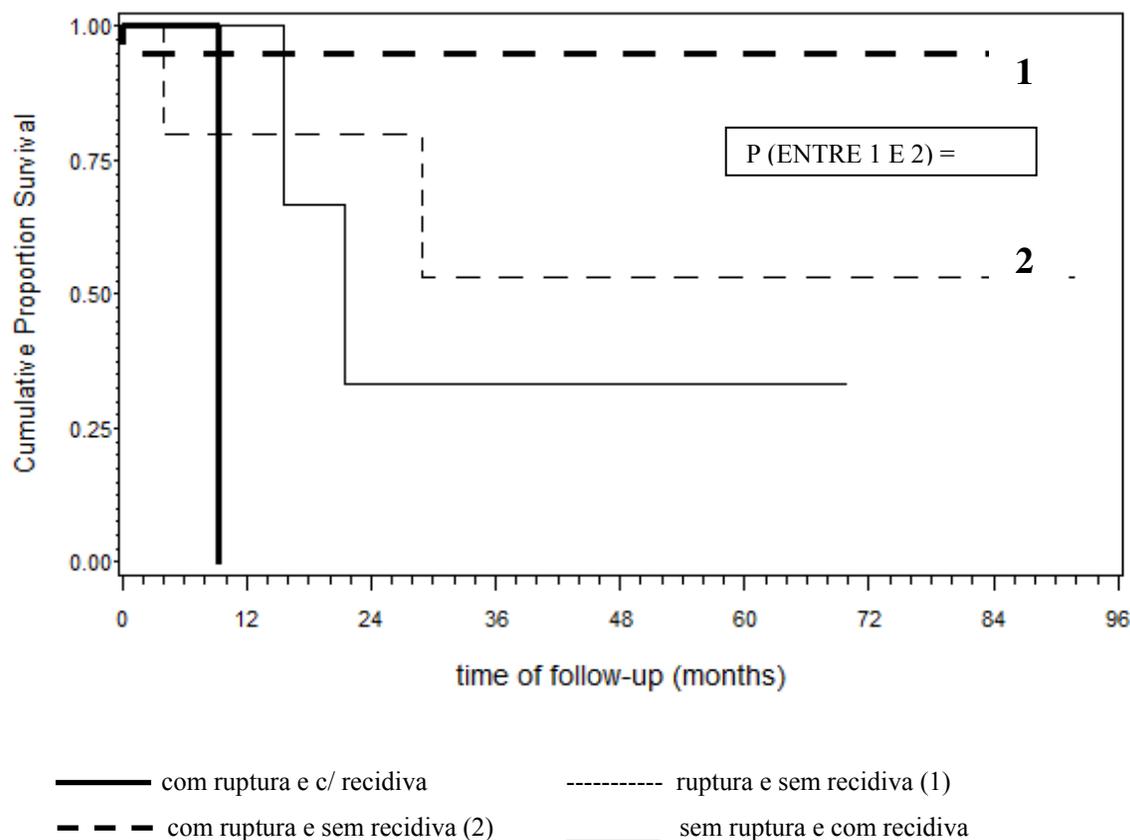


Figura 12- Gráfico da correlação entre ruptura tumoral, recidiva e sobrevida (p=0,0023)

Outros itens analisados como a presença de mitoses atípicas, necrose, invasão capsular, invasão vascular, invasão sinusoidal e presença de pseudo-invasão nuclear não foram significantes na sobrevida (Tabela 9, Tabela 10, Tabela 11, Tabela 12, Tabela 13, Tabela 14).

Tabela 9- Análise da correlação entre presença de mitoses atípicas e status dos pacientes

Mitoses atípicas	Vivo	Morto	Total
Sim	20	8	28
Não	2	0	2
Total	22	8	30

p = 1,00 p (KM) = 0,3937

Tabela 10- Análise da correlação entre presença de necrose e status dos pacientes

Necrose	Vivo	Morto	Total
Sim	14	7	21
Não	8	1	9
Total	22	8	30

p = 0,3742 p (KM) = 0,2555

Tabela 11- Análise da correlação entre presença de invasão capsular e status dos pacientes

Invasão capsular	Vivo	Morto	Total
Sim	9	4	13
Não	13	4	17
Total	22	8	30

p = 0,6967 p (KM) = 0,8192

Tabela 12- Análise da correlação entre presença de invasão vascular e status dos pacientes

Invasão vascular	Vivo	Morto	Total
Sim	7	3	10
Não	16	4	20
Total	23	7	30

p = 1,00 p (KM) = 0,9939

Tabela 13- Análise da correlação entre presença de invasão sinusoidal e status dos pacientes

Invasão sinusoidal	Vivo	Morto	Total
Sim	5	2	7
Não	17	6	23
Total	22	8	30

p = 1,00 p (KM) = 0,9167

Tabela 14- Análise da correlação entre presença de pseudo-invasão nuclear e status dos pacientes

Pseudo-invasão nuclear	Vivo	Morto	Total
Sim	19	8	27
Não	3	0	3
Total	22	8	30

p = 0,5445 p (KM) = 0,2847

A análise imunoistoquímica de trinta pacientes mostrou positividade da E-caderina em 22 casos, encontrando-se 18 vivos e quatro mortos, sem significância na sua sobrevida (Tabela 15).

Tabela 15- Análise da correlação entre positividade da E-caderina e status dos pacientes

E-caderina	Vivo	Morto	Total
positiva	18	4	22
negativa	5	3	8
Total	23	7	30

p = 0,3446 p (KM) = 0,3289

Foi correlacionado o status dos pacientes com a presença da molécula no citoplasma não mostrando significância (Tabela 16).

Tabela 16- Análise da correlação entre presença de E-caderina no citoplasma e status dos pacientes

E-caderina (citoplasma)	Vivo	Morto	Total
positiva	17	4	21
negativa	6	3	9
Total	23	7	30

p = 0,6402 p (KM) = 0,4792

Já a positividade da E-caderina na membrana celular mostrou significância estatística quando realizada a análise pela curva de Kaplan-Meier (Tabela 17 e Figura 13).

Tabela 17- Análise da correlação entre presença de E-caderina na membrana e status dos pacientes

E-caderina (membrana)	Vivo	Morto	Total
positiva	0	1	1
negativa	23	6	29
Total	23	7	30

p = 0,2333

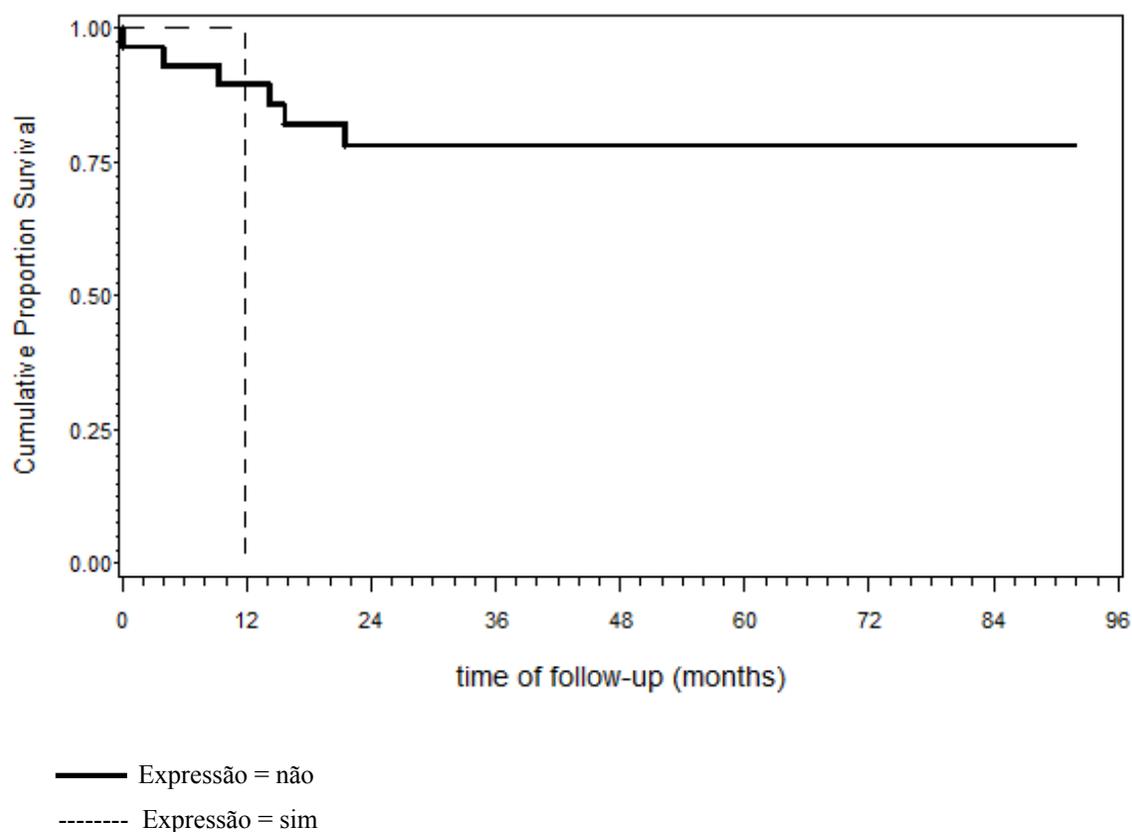


Figura 13- Gráfico da relação entre presença da positividade da E-caderina na membrana celular e status dos pacientes (p = 0,0221)

A análise estatística da positividade da β -catenina relacionada ao status dos pacientes não foi significativa (Tabela 18), como também não o foi sua expressão no citoplasma e no núcleo (Tabelas 19 e 20). Quando avaliada a expressão da β -catenina na membrana celular, foi encontrada uma relação significativa com pior prognóstico (Tabela 21 e Figura 14).

Tabela 18- Correlação entre positividade da β -catenina e status dos pacientes

β-catenina	Vivo	Morto	Total
positiva	19	6	25
negativa	4	1	5
Total	23	7	30

p = 1,00 p (KM) = 0,8053

Tabela 19- Análise da correlação entre presença de β -catenina no citoplasma e status dos pacientes

β-catenina (citoplasma)	Vivo	Morto	Total
positiva	19	5	24
negativa	4	2	6
Total	23	7	30

p = 0,6033 p (KM) = 0,6287

Tabela 20- Análise da correlação entre presença de β -catenina no núcleo e status dos pacientes

β-catenina (núcleo)	Vivo	Morto	Total
positiva	2	3	5
negativa	21	4	25
Total	23	7	30

p = 0,0679 p (KM) = 0,0548

Tabela 21- Análise da correlação entre presença de β -catenina na membrana e status dos pacientes

β-catenina (membrana)	Vivo	Morto	Total
positiva	5	6	11
negativa	18	1	19
Total	23	7	30

p = 0,0045

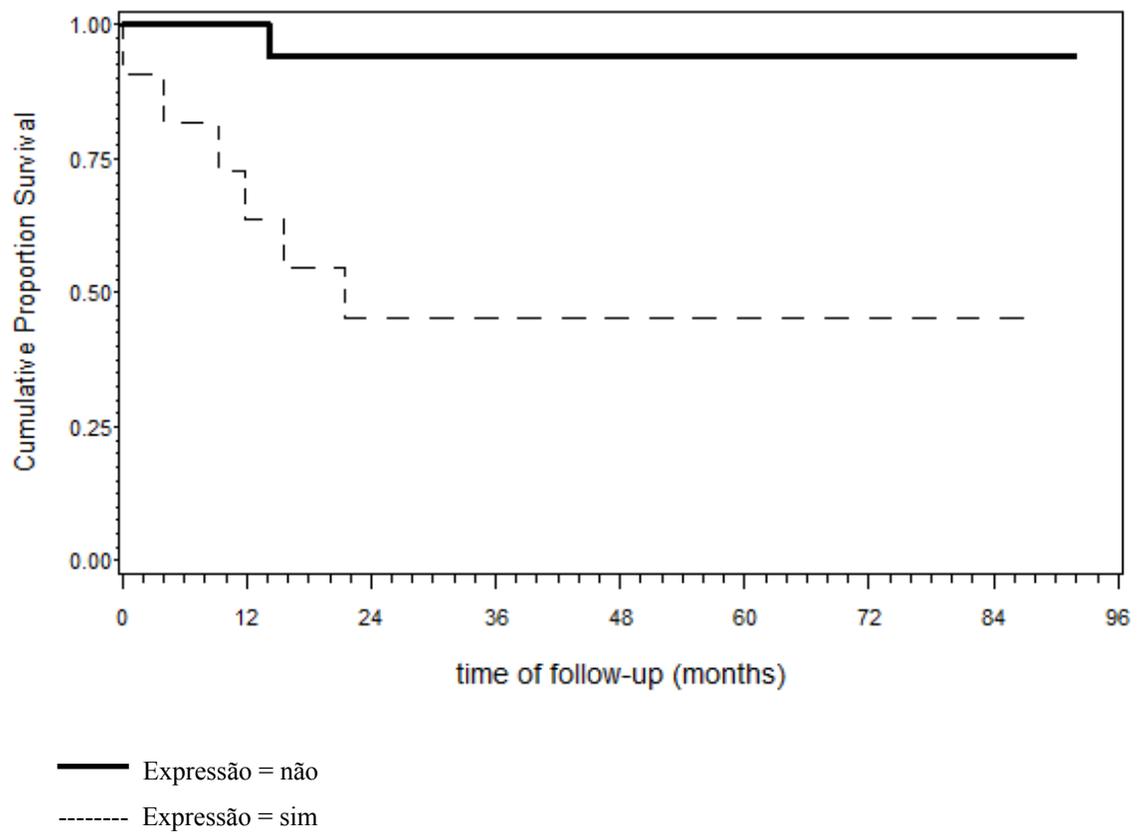


Figura 14- Gráfico da relação entre positividade da β -catenina na membrana celular e status dos pacientes ($p = 0,0023$)

Quando analisados os estádios evolutivos da doença com a expressão de E-caderina e β -catenina, não foram verificadas diferenças significativas entre os estádios III e IV em relação aos I e II (Tabelas 22 e 23).

Tabela 22- Expressão da E-caderina e sua correlação com os estádios evolutivos dos TCSR

E-caderina	III e IV	I e II	Total
positiva	6	16	22
negativa	4	4	8
Total	10	20	30

p = 0,3814

Tabela 23- Expressão da β -catenina e sua correlação com os estádios evolutivos dos TCSR

β-catenina	III e IV	I e II	Total
positiva	9	16	25
negativa	1	4	5
Total	10	20	30

p = 0,6400

De acordo com o seguimento realizado, das trinta e três crianças estudadas, vinte e quatro se encontram vivas (69,7%), nove faleceram por progressão da doença (27,3%) e houve uma perda de seguimento (3%). A sobrevida global na série estudada foi de 70,9% em cinco anos (Figura 15).

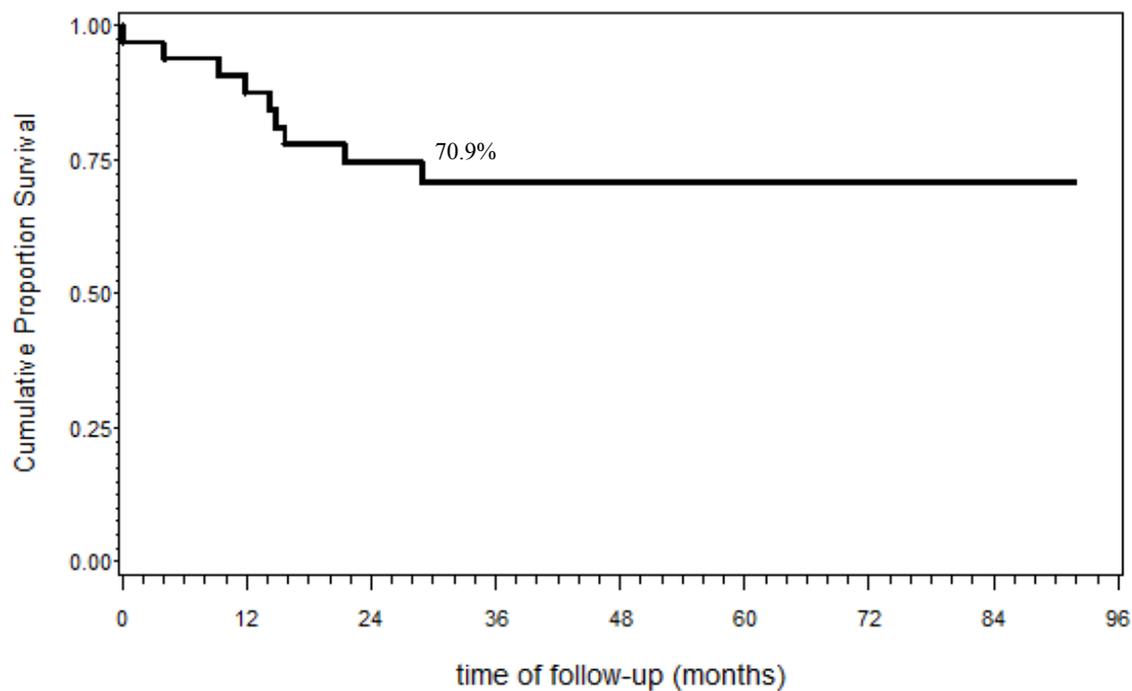


Figura 15- Gráfico da sobrevida global dos pacientes com TCSR

5- DISCUSSÃO

O tumor do córtex da supra-renal em crianças é uma doença rara com prognóstico e sobrevida ainda não muito bem estabelecidos (Michalkiewicz et al, 2004).

Neste estudo, foi observada predominância do sexo feminino (2,6:1,0) conforme observado em estudos anteriores (Sandrini et al, 1997; Michalkiewicz et al, 2004). Na análise da relação entre idade e sobrevida dos pacientes, nota-se que crianças com idade inferior a dois anos apresentaram melhor prognóstico, semelhante aos resultados obtidos pelo IPACTR (Michalkiewicz et al, 2004).

A apresentação clínica mais predominante nos pacientes analisados foi a virilização (48,5%) e o sinal clínico mais encontrado foi a pilificação pubiana (66,7%), conforme a descrição de Michalkiewicz et al (2004) e Galindo et al (2005); porém, a hipertensão arterial ocorreu numa minoria dos pacientes.

As dosagens do SDHEA ao diagnóstico tendem a se normalizar após o tratamento cirúrgico com ressecção completa do tumor (Galindo et al, 2005), fato também observado neste estudo.

O tratamento dos TCSR baseia-se no estadiamento, e a forma mais eficaz para a sua cura é a ressecção completa da lesão sem ruptura da cápsula tumoral (Galindo et al, 2005; Kirschner, 2006). Michalkiewicz et al (2004), analisando dados do IPACTR e Allolio e Fassnacht (2006), mostraram que a ruptura tumoral apresentou influência negativa na sobrevida de pacientes com TCSR. No presente estudo, a ressecção completa sem ruptura foi alcançada em 69,7% dos casos, sendo também observada influência negativa da ruptura tumoral na sobrevida dos pacientes. Entretanto, quando analisada a correlação entre ruptura tumoral e recidiva, percebe-se que, com exceção da presença de recidiva da doença, a ocorrência de ruptura tumoral se mostrou como fator importante na evolução desfavorável da doença.

A recidiva tumoral apresentou-se como outro elemento que afetou negativamente a sobrevida dos pacientes pesquisados. Michalkiewicz et al. (2004) e Galindo et al. (2005) também apontam, em seus estudos, este fator como um mau prognóstico.

Dados do IPACTR mostraram relação de melhor prognóstico com estádios iniciais (Michalkiewicz et al, 2004). Nesta pesquisa, foi observada a associação de pior prognóstico com estádios mais avançados da doença.

As variáveis histológicas estabelecidas por Weiss (1989), como invasão capsular, invasão venosa, invasão sinusoidal, comprometimento de órgãos adjacentes, presença de necrose tumoral, alto número de taxas de mitose e presença de mitoses atípicas, que, quando agrupadas, determinam um *score* com valor prognóstico, foram analisadas no presente estudo e não mostraram relação significativa com a sobrevida dos pacientes, exceto a presença de invasão de estruturas adjacentes, a qual foi relacionada com um pior prognóstico.

Entretanto, uma das principais características dos tumores malignos é sua capacidade de invadir tecidos vizinhos e se disseminar por meio de metástases. Este fato é apresentado frequentemente nas intensivas pesquisas que descrevem o processo de metástase caracterizado pelo desprendimento inicial da célula neoplásica do tumor primário, sua migração, invasão e desenvolvimento tumoral em tecido distante (Beavon, 2000).

O complexo de adesão intercelular E-caderina e β -catenina é parte dos fatores responsáveis pela estabilidade da junção célula-célula em tecidos humanos normais e vários estudos sugerem que sua perda ou disfunção, seja por supressão da E-caderina ou alterações da β -catenina, tem um papel importante como marcador relacionado à agressividade tumoral, disseminação metastática e pior prognóstico em alguns tipos de tumor (Wijnhoven et al, 2000; Lin et al, 2004; Salon et al, 2004).

No presente estudo, não foi verificado a expressão da E-caderina na adrenal normal, igualmente a Tsuchiya et al. (2006); porém, também não foi verificada a expressão da β -catenina na glândula normal, contrariamente ao demonstrado por Eberthart e Argani (2001).

Quando analisados os tumores da adrenal, nesta casuística, foi verificada a expressão da E-caderina e β -catenina na grande maioria dos casos (73,3% e 83,3% respectivamente). A expressão da E-caderina nos tumores e sua não expressão na adrenal

normal pode sugerir que alterações mais complexas possam estar envolvidas e que este mecanismo possa ser uma defesa para tornar o tumor mais coeso e menos propenso à disseminação metastática ou à invasão de estruturas vizinhas.

Além disso, a análise da expressão da E-caderina e β -catenina não mostrou, no presente estudo, relação com o estágio evolutivo da doença. Contudo, quando a análise foi feita comparando-se a influência da expressão com a sobrevida dos pacientes, verificou-se que apenas a expressão da E-caderina e β -catenina, na membrana celular, mostrou associação com mau prognóstico. Este achado, resultante da análise estatística, parece mostrar que a pesquisa das moléculas de adesão nos TCSR em crianças é uma linha a ser seguida, embora, devido ao pequeno número de casos, a análise multivariada não tenha sido realizada e, portanto, este dado não pode ser considerado uma variável independente de mau prognóstico.

Após um levantamento na base de dados *Medline*®, verificamos que este é o primeiro estudo a analisar a expressão da E-caderina e β -catenina em tumores da cortical da supra-renal em crianças, e os dados nos permitem dizer que este é um caminho promissor na busca pela eficácia no tratamento. Dessa forma estudos multicêntricos com maior número de casos devem ser realizados para melhor entendimento e tratamento desta rara doença.

6- CONCLUSÃO

De acordo com os objetivos propostos, a análise dos resultados permite as seguintes conclusões:

1-

- a) A E-caderina foi expressa em 22 pacientes dos 30 analisados (73,3%), sendo que a maioria estava localizada somente no citoplasma (21 pacientes) e um paciente apenas na membrana celular.
- b) A β -catenina mostrou expressão em 25 pacientes dos 30 analisados (83,3%) sendo que 24 apresentaram o marcador no citoplasma, 5 no núcleo e 11 na membrana celular.

2-

- a) A expressão da E-caderina e β -catenina na membrana celular mostrou associação significativa com pior evolução nas crianças com TCSR
- b) A expressão da E-caderina e β -catenina não mostrou associação com estádios evolutivos da doença.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Allolio B. Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update. *J Clin Endocrinol Metabol* 2006; 91(6): 2027-2037.

Andrade VP. Cunha IW. Silva, E. M. et al. Tissue Microarrays: High throughput and low cost available for pathologists. *J Bras Patol Med Lab* 2007; 43(1): 55-60.

Assié G. Antoni G. Tissier F. et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2007 92: 184-154.

Beavon JRG. The E-cadherin-catenin complex in tumor metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Canc* 2000; 36: 1607-1620.

Bernstein L. Gurney JG. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms, in Ries LAG, Smith MA, Gurney JG et al (eds): *Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995*.

Charpin C. Garcia S. Barnier P. et al. Reduced E-cadherin imunohistochemical expression in node-negative meast carcinomas correlates with 10-year survival. *Am J Clin Pathol* 1998; 109:431-438.

Ciftci AO. Senocok ME. Tanyel FC. et al. Adrenocortical tumors in children. *J Pediatr Surg* 2001; 36: 549-554.

Dichtchekenian V. Supra-renais. In: Setian N. *Endocrinologia Pediátrica: Aspectos físicos e metabólicos do recém-nascido ao adolescente*. Segunda edição. São Paulo: Savier; 2002: 365-71.

Driver CP. Birch J. Gough DCS. Bruce J. Adrenal cortical tumors in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 1998; 15: 527-532.

Eberhart CG. and Argani P. Wnt Signaling in Human Development: Beta-Catenin Nuclear Translocation in Fetal Lung, Kidney, Placenta, Capillaries, Adrenal, and Cartilage. *Pediatric and Developmental Pathology* 2001; 4:351-357.

Figueiredo BC. Stratakis CA. Sandrini, R. et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 1116-1121.

Franchi A. Gallo O. Bocciolini C. et al. Reduced E-cadherin expression correlates with unfavorable prognosis in adenoid cystic carcinoma of salivary glands of the oral cavity. *Am J Clin Pathol* 1999; 111: 43-50.

Galindo CR. Figueiredo BC. Zambetti GP. et al. Biology, clinical characteristics and management of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45: 265-273.

Gupta D. Shidham V. Holden J. Layfield L. Value of topoisomerase II α , MIB-1, p53, E-cadherin, retinoblastoma gene protein product and HER-2/neu immunohistochemical expression for the prediction of biologic behavior in adrenocortical neoplasms. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology* 2001; 9 (3): 215-221.

Hovi L. Wikströms S. Vettenrante K. et al. Adrenocortical carcinoma in children: A role for etoposide and cisplatin adjuvant therapy? Preliminary report. *Med Pediatr Oncol* 2003; 40: 324-326.

Harrison LE. Gaudin PB. Brennan MF. Pathologic features of prognostic significance for adrenocortical carcinoma after curative resection. *Arch Surg* 1999; 134: 181-185.

Icard P. Chapuis Y. Andreassian B. et al. Adrenocortical carcinoma in surgically treated patients: A retrospective study on 156 cases by the French Association of endocrine surgery. *Surgery* 1992; 112: 972-980.

Kirschner LS. Review: Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: A new hope. *J Clin Endocrinol Metab* 2006; 91: 14-21.

Kendrick M. L. Lloid R. Ericson L. et al. Adrenocortical carcinoma: Surgical progress or status quo? *Arch Surg* 2001; 136: 543-549.

Keegan CE. Hammer GD. Recent insight into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab* 2002; 13: 200-208.

Libé R. Fratticci A. Bertherat J. Adrenocortical cancer: Pathophysiology and clinical management. *Endocrine-Related Cancer* 2007; 14: 13-28.

Lin YC. Wu MY. Li DR. et al. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin, α -catenin, β -catenin, γ -catenin and cyclin D1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *World Journal of Gastroenterology* 2004; 10(22): 3235-3239.

Luton JP. Cerdas S. Billaud L. et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990; 322:1195-1201.

Mc Farlane DA. Cancer of adrenal cortex. *Annr Coll Surg Engl* 1958; 23: 155-186.

Michalkiewicz E. Sandrin R. Figueiredo B. et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors. A analysis of 254 cases from International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol* 2004; 22: 838-845.

Miguel MCC. e Amorim RFB. Multifuncionalidade of beta-catenin and its role in pathogy. *Rev Bras Patol Oral* 2004, 3(2): 57-61.

Miller RW. Young JRJL. Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995; 75 (1): 395-405.

Nakanisshi Y. Ochici A. Akimoto S. et al. Expression of E-cadherin, α -catenin, β -catenin and plakoglobin in esophageal carcinomas and its prognostic significance imunohistochemical analysis of 96 lesions. *Oncology* 1997; 54: 158-165.

Paredes JC. Milanezi MFG. Reis-Filho JC. et al. Correlation between E-caderin and estrogen receptor expression in breast cancer. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina* 2002; 38: 307-313.

Ramburan A. & Govender D. Cadherins end catenin in pathology. *Cur Diagnos Pathol* 2002; 8: 305-317.

Ribeiro J. Ribeiro RC. Fletcher BD. Imaging findings in pediatric adrenocortical carcinoma. *Pediatr Radiol* 2000; 30: 54-51.

Ribeiro RC. Michalkiewicz EL. Adrenocortical tumors in children, in Roghovan D, Brecher common. Cancer 1999; (ed 2). New York, NY; John Wiley of sons, p 611-620.

Ribeiro RC. Sandrini Neto R. Schell MJ. et al. Adrenocortical tumors in children: A study of 40 cases. J Clin Oncol 1990; 8: 67-74.

Sabbaga CC. Tumores do córtex da adrenal. In: Maksoud, J. G. Cirurgia pediátrica, Rio de Janeiro: Revinter; 1998; p.1035-1042.

Sandrini R. DeLacerda L. Sampaio G. et al. Adrenocortical tumors in children: Relationship between disease stage and outcome. Pediatr Res 1993; 33: 522 (suppl 5).

Sandrini R. Ribeiro RC. DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. J Clin Endocrinol Metab 1997; 7: 2027-2031.

Salon C. Moro D. Lantuejoul S. et al. E-cadherin – catenin adhesion complex in neuroendocrine tumors of the lung: A suggested role upon local invasion and metastasis. Human Pathology 2004; 35: 1148-1155.

Sbragia L. Oliveira-Filho AG. Vassallo, J. et al. Adrenocortical tumors in brasilian children: Immunohistochemical markers and prognostic factors. Arch Pathol Lab Med 2005; 129: 1127-1131.

Stojadinovic A. Ghossein RA. Hoss A. et al. Adrenocortical carcinoma: Clinical, morphologic and molecular characterization. J Clin Oncol 2002; 20: 941-950.

Sulzer MA. Leers MP. VanNoord JA. et al. Reduced E-cadherin expression is associated with increase lymph node metastasis and unfavorable prognosis in non-small cell lung cancer. Na J Respin Crit Care Med 1998; 157: 1319-1323.

Tirabochi RB. Domingos ALA. Reis RB. Bovo TB. Et al. Adrenalectomia laparoscópica: análise de 11 pacientes. Acta Cirúrgica Brasileira 2003; 18 (5): 41-42.

Tissier F. Cavard C. Groussin L. et al. Mutations of β -catenin in adrenocortical tumors: Activation of the signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. Cancer Res 2005; 65(17): 7622-7627.

Tsuchiya B. Sato Y. Kameya T. et al. Differential expression of N-cadherin and E-cadherin in normal human tissues. *Arch histol Cytol* 2006; 69: 135-145.

Vassilopoulou-Sellin R. Schultz PN. Adrenocortical carcinoma: Clinical outcome in the end of the 20 th century. *Cancer* 2001, 92: 1113-11221.

Wajchemberg BL. Pereira MAA. Medonça BB. et al. Adrenocortical carcinoma: Clinical and Laboratory observations. *Cancer* 2000; 88: 711-736.

Wasielewsky R. Rhein A. Werner M. et al. Immunohistochemical detection of E-cadherin in differentiated thyroid carcinoma correlates with clinical outcome. *Cancer Res* 1997; 57: 2501-2507.

Weiss LM. Medeiros LJ. Vickey AL. Pathologic features of prognostic significance for adrenocortical carcinoma. *Pathol* 1989; 13:202-206.

Wieneke JA. Thompson LDR. Heffers CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: A clinicopathologic and imunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27: 867-881.

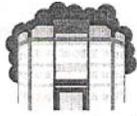
Wijnhoven BP. Dinjens WN. Pignateli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg* 2000; 87:992-1005.

Wooten MD. King KK. Adrenal cortical carcinoma: epidemiology and treatment with mitotane and review of the literature. *Cancer* 1993; 72: 3145-3155.

Zavala L. Luengo V. Ossandón F. et al. Hierarchical clustering analysis to detect associations between clinical and pathological features of gastric tumors and hypermethylation of suppressor genes. *Rev Med de Chile* 2007; 135: 17-25.

8- APÊNDICES

Aprovação do Comitê de Ética Médica



Centro Infantil
Boldrini

Campinas, 02 de maio de 2007.

Ilma. Sra.
FLÁVIA REZENDE PEREIRA PATRICIO
Av: Campos Sales, 1345 apto 53 Frezarim
Americana - SP

Prezada Senhora,

Informamos que seu projeto intitulado **"E-CADERINA E BETA-CATENINA: ANÁLISE DA EXPRESSÃO EM TUMORES DO CÓRTEX DE ADRENAL EM CRIANÇAS"**, foi aprovado com recomendação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini) em 13/04/2007 (vide parecer em anexo).

Informamos que a cada 6 meses, deverá ser apresentado um relatório parcial sobre o andamento da pesquisa em questão (formulário: acompanhamento das pesquisas; disponível no site:www.boldrini.org.br ou no L : público/ CEC/ CEP Formulários) ao Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini)

Solicitamos que, após a conclusão do estudo, o mesmo seja encaminhado à Secretaria do CEP /Boldrini e apresentado aos profissionais do Centro Infantil Boldrini.

Colocamo-nos à disposição para maiores esclarecimentos.

Cordialmente,


Prof. Dr. Flávio César de Sá'
Vice - Coordenador do CEP/Boldrini

P.S.: Pedimos a gentileza de acusar o recebimento

Util. Públ. Municipal Lei nº 496
Util. Públ. Estadual Dec. nº 22.018
Util. Públ. Federal Dec. nº 88.747
Registro no CNSS nº 23.002.000.591/84-0
Inscr. Estadual - Isento
CNPJ: 50.046.887/0001-27

CENTRO INFANTIL DR. DOMINGOS A. B
Dr. Gabriel Pc
Cid. Universitária - Car
Cep. 1
Tel. (55 19) 3

FICHA DE LEVANTAMENTO DE PACIENTES COM TUMOR DO CÓRTEX DE SUPRA-RENAL: AVALIAÇÃO DE E-CADERINA E β -CATENINA

Ficha número:

Nome:RG:.....

Data Nascimento:/..../..... Idade em meses: sexo:

CLÍNICA

Apresentação: virilização (1) Cushing (2) Mista (3) Assintomático (4)

Descrever sinais:

Tempo de aparecimento dos sintomas: (meses)

Hipertensão ao diagnóstico: sim () não () se sim, PA =/..... mmHg

SULFATO DHEA AO DIAGNÓSTICO:.....

RADIOLOGIA

Lado afetado: direito () esquerdo () bilateral ()

Medidas:..... X..... X..... cm

Adenomegalia loco regional: sim () não ()

Trombo em veia cava: sim () não () se sim, qual é a extensão?

Invasão de órgãos vizinhos: sim () não ()

METÁSTASE AO DIAGNÓSTICO: sim () não ()

Se sim, qual local ou locais? (1) pulmão (2) fígado (3) gânglios
(4) vários... (5) não se aplica

TRATAMENTO

Quimioterapia pré-operatória: sim () não ()

Se sim, quais drogas:.....

CIRURGIAS:

Peso do tumor na cirurgia:volume do tumor na cirurgia:

Cirurgia 1 data:/...../.....

Tipo de cirurgia: (1) ressecção total sem ruptura (2) ressecção total com ruptura

(3) ressecção parcial (4) ressecção total com retirada de trombo

(5) biópsia por agulha (6) biópsia por laparotomia/laparoscopia

Tratamento QT após cirurgia 1: sim () não ()

Se sim, quais drogas:.....

Cirurgia 2 sim () não ()

Data:/...../.....

Tipo de cirurgia:

- (1) ressecção completa do tumor residual;
- (2) ressecção completa das metástases / recidivas;
- (3) ressecção incompleta do tumor residual;
- (4) ressecção incompleta das metástases / recidivas;
- (5) não realizada;
- (6) Outras:

Cirurgia 3 sim () não ()

Data:/...../.....

Tipo de cirurgia:

- (1) ressecção completa do tumor residual;
- (2) ressecção completa das metástases / recidivas;
- (3) ressecção incompleta do tumor residual;
- (4) ressecção incompleta das metástases / recidivas;
- (5) não realizada;
- (6) Outras:

ESTADIAMENTO FINAL: (1) I..... (2) II..... (3) III.....(4) IV

EVOLUÇÃO

	inicial	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...
SDHEA							
	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...	.../.../...
SDHEA							

Recidiva tumoral: sim () não ()

Se sim, local: Data da recidiva:/..../.....

STATUS: (1) vivo (2) morto

DATA DO ÚLTIMO SEGUIMENTO (última consulta ou óbito):/...../.....

SITUAÇÃO:

(1) vivo sem doença (2) vivo com doença (3) óbito progressão doença

(4) óbito outra CAUSA:

(5) perda de seguimento

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PARA A AVALIAÇÃO DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS E-CADERINA E β -CATENINA NOS TUMORES DO CÓRTEX DA ADRENAL EM CRIANÇAS

Seu (sua) filho (a) teve um tumor do córtex da adrenal e foi tratado (a) no Centro Infantil Boldrini. Este é um tumor muito raro no mundo e estudos que visam compreender melhor o seu mecanismo de aparecimento, crescimento, apresentação e evolução são essenciais para o desenvolvimento de tratamentos mais adequados e individualizados para estas crianças. Os médicos do Centro Infantil Boldrini estão desenvolvendo uma pesquisa inédita sobre os marcadores imuno-histoquímicos (marcadores que podem estar presentes no tumor) E-caderina e β -catenina que possivelmente estão relacionados a tumores do córtex da adrenal com apresentações mais agressivas e de evoluções mais desfavoráveis. A possível identificação destes fatores prognósticos (fatores indicativos da evolução da doença) poderá auxiliar no tratamento individualizado deste grupo específico de crianças.

Este termo de consentimento lhe dará informação sobre o estudo que envolverá o tumor da adrenal que foi retirado de seu (sua) filho (a) por ocasião do tratamento e que está conservado em blocos de parafina os quais serão utilizados para o preparo das lâminas usadas na análise microscópica. Assim que você entender este estudo, e permitir a participação dele (a), você será solicitado a assinar este termo receberá uma cópia do mesmo.

- Fica inteiramente a seu critério decidir se sua criança participa ou não deste estudo.
- Caso você decida não permitir que sua criança participe, ou que venha mais tarde a desistir de continuar neste estudo, a sua criança não perderá os benefícios do tratamento médico que recebe do Centro Infantil Dr. Boldrini.

Qual é o objetivo deste estudo?

Os pesquisadores irão analisar como se apresentam os marcadores encontrados no tumor da glândula adrenal retirada de sua criança e avaliar se há relação destes marcadores com a apresentação mais agressiva do tumor ao diagnóstico e também com o tipo de evolução após o tratamento.

Quais os riscos deste estudo?

Não há risco para seu (sua) filho (a).

O material usado será apenas o bloco de parafina do tumor que já foi retirado do seu filho por ocasião do tratamento. Não serão necessárias coletas de sangue ou quaisquer outros materiais biológicos da sua criança.

Qualquer informação usada será mantida em sigilo.

O que dizer sobre confidencialidade?

Os dados de sua criança serão codificados. O código que identifica sua criança com os dados clínicos dela será mantido num arquivo separado. As informações codificadas serão guardadas no Centro Infantil Dr. Boldrini.

Quais são os benefícios deste estudo?

Não haverá benefício direto à sua criança por tomar parte deste estudo. Entretanto, a informação obtida a partir deste estudo poderá nos propiciar um melhor entendimento sobre os tumores do córtex adrenal em futuros pacientes.

O que saber sobre informação nova?

Você será informado sobre qualquer informação nova obtida durante o curso desta pesquisa que poderá causar você desistir de continuar neste estudo. Você tem o direito de saber sobre os resultados deste estudo. Se desejar saber mais sobre quando e como obtiver os resultados desta pesquisa você poderá contatar Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho pelo e-mail agoncalves@boldrini.org.br , Dra. Izilda Cardinali pelo e-mail izilda@boldrini.org.br, Dra. Maria José Mastellaro pelo e-mail zeze@boldrini.org.br ; Dra. Flavia R. P. Patrício pelo e-mail flaviarpp@terra.com.br, ou pelo endereço Rua Gabriel Porto 1270, Cidade Universitária, CEP13083-210, Campinas, SP; Fone: (19) 3787-5000.

Concordando com o uso deste material, do modo descrito, é necessário esclarecer que você não terá benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa.

Você receberá uma cópia deste documento e o original será arquivado no hospital.

DECLARAÇÃO DO PAI/MÃE OU GUARDIÃO

Eu li (ou alguém leu para mim) o conteúdo deste formulário de consentimento e fui incentivado a fazer perguntas. Eu recebi respostas para todas as minhas perguntas. Eu dou permissão para minha criança participar desta pesquisa.

Nome: _____

Assinatura do pai, mãe ou guardião

Local e data

Hora.

.....

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

Eu, abaixo assinado, certifico que discuti o projeto de pesquisa com o(s) pai(s) da criança participante. Expliquei todas as informações apresentadas neste termo de consentimento, incluindo sobre quaisquer riscos que podem ocorrer. Ainda declaro que o pai/a mãe ou guardião, bem como o próprio paciente foram incentivados a fazerem perguntas sobre este estudo.

Nome: _____

Médico / pesquisador ou designado

Local e data

Hora

.....

DECLARAÇÃO DA TESTEMUNHA

Eu acompanhei o processo de consentimento informado e certifico que a pesquisa, os riscos, benefícios e outras ligadas ao uso destas informações clínicas foram apresentados ao paciente / pai(s) / guardião.

Nome: _____

Testemunha

Local e data

Hora

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

PARA ESTUDO DE ADRENAL DESCARTADA DE PACIENTES COM TUMOR DE WILMS

Seu (sua) filho (a) tem tumor de Wilms e vai ser operado. Nesta cirurgia a glândula adrenal dele (a) será descartada. Você foi consultado e concordou em permitir que esta glândula de seu (sua) filho (a) seja usada para fins científicos de comparação com as glândulas de outras crianças que tiveram um tipo mais raro de tumor (tumor de córtex adrenal). Não iremos oferecer cura para seu (sua) filho (a), mas os conhecimentos obtidos nesta pesquisa laboratorial poderão proporcionar melhores condutas para crianças que tiverem um tumor de córtex adrenal.

Este termo de consentimento lhe dar informação sobre o estudo que envolverá a glândula adrenal de seu (sua) filho (a). Assim que você entender este estudo, e você permitir a participação dele (a), você será solicitado para assinar este termo de consentimento e receberá uma cópia para você.

Antes de compreender sobre este estudo, é importante você saber o seguinte:

- Fica inteiramente a seu critério decidir se sua criança participa ou não deste estudo.
- Caso você decida não permitir que sua criança participe deste estudo, ou que venha mais tarde a desistir de continuar neste estudo a sua criança não perderá os benefícios do tratamento médico que recebe do Centro Infantil Dr. Boldrini.

Por que este estudo está sendo realizado?

Nós estamos tentando entender mais sobre o funcionamento da glândula adrenal para comparar com o tumor de córtex adrenal, ou seja, que se origina da glândula adrenal. Os objetivos deste estudo são os seguintes:

- 1- Saber quais as características da glândula adrenal e do tumor de córtex adrenal e como os tumores reage ao tratamento para adotar medidas que aumentem a probabilidade de cura. Os resultados deste estudo podem nos ajudar, a saber, qual é a diferença entre o que acontece com a adrenal normal e com a glândula com o tumor.

Quantas pessoas participarão deste estudo?

Esperamos estudar o maior número possível de crianças com o tumor de Wilms.

Qual é o envolvimento deste estudo?

Os pesquisadores irão avaliar como se apresentam as substâncias encontradas na glândula adrenal retirada de sua criança em relação às encontradas nos tumores de córtex adrenal.

Se você deseja ser informada sobre qualquer informação deste estudo nós concordaremos em informar ao médico de seu (sua) filho (a) o qual irá discutir com você o que esta pesquisa significa.

Se durante o curso desta pesquisa tivermos conhecimento de qualquer condição clínica na sua criança iremos informar ao médico dela.

Quanto tempo minha criança ficará neste estudo?

A participação dela neste estudo fica limitada apenas ao tecido usado da glândula adrenal.

Quais são as conseqüências da desistência de continuar neste estudo?

Sua criança poderá desistir de continuar neste estudo a qualquer momento. Tão logo sua criança saia deste estudo, a pedido seu, nós deixaremos de usar os dados dela.

Quais os riscos deste estudo?

Não há risco para seu filho. Qualquer informação usada será mantida em sigilo.

Há várias coisas que você deverá saber antes de receber os dados de seu (sua) filho (a):

- 1- Informações sobre a raça, grupo étnico, sexo, história clínica da sua criança estarão disponíveis aos investigadores que estão analisando, exceto o nome do seu (sua) filho (a). Tais informações poderão ser importantes para fins científicos ou de saúde pública.

- 2- Se alguma informação sobre esta pesquisa poderia incomodar outro membro da família, lhe perguntaremos se você desejaria ainda concordar com o uso da glândula dela.

- 3- Você e sua criança têm a escolha de recusar permitir participar doando esta glândula de sua criança.

Quais são os benefícios deste estudo?

Não haverá benefício direto à sua criança por tomar parte deste estudo. Entretanto, a informação obtida a partir deste estudo poderá nos propiciar um melhor entendimento sobre os tumores do córtex adrenal em futuros pacientes. Os resultados deste estudo poderão nos ajudar a entender as chances de cura destes tumores em algumas crianças.

Que outras opções existem?

Você poderá escolher não participar deste estudo.

O que se sabe sobre informação nova?

Você será informado sobre qualquer informação nova obtida durante o curso desta pesquisa que poderá causar você desistir de continuar neste estudo. Você tem o direito de saber sobre os resultados deste estudo. Se desejar saber mais sobre quando e como obtiver os resultados desta pesquisa você poderá contatar Dr. Antonio Gonçalves de Oliveira Filho pelo e-mail agoncalves@boldrini.org.br, Dra. Izilda Cardinalli pelo e-mail izilda@boldrini.org.br, Dra. Maria José Mastellaro pelo e-mail zeze@boldrini.org.br; Dra. Flavia R. P. Patrício pelo e-mail flaviarpp@terra.com.br, ou pelo endereço Rua Gabriel Porto 1270, Cidade Universitária, CEP13083-210, Campinas, SP; Fone: (19) 3787-5000.

O que dizer sobre confidencial idade?

Os dados de sua criança serão codificados. O código que identifica sua criança com os dados clínicos dela será mantido num arquivo separado. As informações codificadas serão guardadas no Centro Infantil Dr. Boldrini.