



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências da Saúde  
**Departamento de Saúde Coletiva**

## **MEMORIAL DESCRITIVO**

PROFESSOR DR. BONALD CAVALCANTE DE FIGUEIREDO

Memorial descritivo das atividades de ensino, pesquisa, extensão e gestão acadêmica apresentado à Comissão Especial para Avaliação da Progressão na Carreira de Professor Universitário da classe de Professor Associado IV para a classe de Titular.

Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8256915032538540>

CURITIBA

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
2. FORMAÇÃO ACADÊMICA	2
3. ENSINO (GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO) E ATIVIDADES ADMINISTRATIVAS	5
4. ATIVIDADES DE PRODUÇÃO INTELECTUAL	11
Atividades de pesquisa (tumor de córtex adrenal)	12
5. ATIVIDADES DE EXTENSÃO	31
6. REFERÊNCIAS	32

### 1. INTRODUÇÃO

Sou Bonald Cavalcante de Figueiredo, nascido em 1957 no município de Souza, Paraíba, onde a pobreza coexiste com um dos mais bizarros e negligenciados pontos históricos do Brasil, o Vale dos Dinossauros. Sou o oitavo de uma prole de onze irmãos (4 médicos, 3 dentistas, um engenheiro e outros), filhos de Francisco Figueiredo dos Santos e Raimunda Cavalcante de Figueiredo. Sou pai de 3 filhos, Francisco Ricardo de Oliveira Figueiredo (Médico anestesista e Tenente do Exército Brasileiro), Mirna Maria de Oliveira Figueiredo (Médica anestesista) e Maria Gabriela Custódio de Figueiredo (aluna do oitavo ano do Ensino Médio da Escola Internacional de Curitiba). Esta última com a esposa atual, Dra. Gislaine Custódio.

### 2. FORMAÇÃO ACADÊMICA

Toda minha formação acadêmica foi em escolas públicas, da escola estadual até o Curso de graduação em Medicina, pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Recife (1977-1983). Minha carreira científica teve início no Laboratório de Endocrinologia do Departamento de Fisiologia da UFPE com o **Professor Waldemar Ladosky** e seu assistente Professor Oldemir Carlos Mangili. Com o apoio do Prof. Ladosky, interrompi o nono semestre na Escola Médica para trabalhar e estudar durante 14 meses no Instituto de Bioquímica Clínica da Friedrich Wilhelm Universität em Bonn (Alemanha), sob a

orientação dos **Professores, Dr. Heinz T. Schneider e Dr. Heinz Breuer** (Diretores do Instituto de Bioquímica Clínica, onde fiquei entre junho de 1980 e agosto de 1981). Neste período pude refinar a proficiência na língua alemã (antes na Associação de Cursos de Alemão do Recife-ACAR e depois na Volkshochschule de Bonn). O Instituto de Bioquímica Clínica (Institut für Klinische Biochemie), em 2007, passou a ser o **Departamento de Química Clínica e Farmacologia Clínica (Institut für Klinische Chemie und Klinische Pharmakologie)**. Foi um intercâmbio semelhante ao Programa Ciência sem Fronteiras, com a diferença de que a fonte patrocinadora foi o Instituto com recursos da Deutscher Forschung Gemeinschaft (DFG) da Alemanha. Estes primeiros passos nortearam a escolha de minha carreira científica porque, na época, muito se falava sobre as descobertas do saudoso Professor Heinz Breuer (1926-1983, Bonn) no campo do metabolismo dos hormônios esteroidais e das doenças causadas pelo excesso ou deficiência destes hormônios. Foi a era pré-genômica, ainda com as duas cidades separadas pelo muro (Berlin Oriental e Ocidental), quando tudo acontecia em ritmo mais lento sem a globalização atual, mas colocava o Instituto em destaque no continente europeu. Tal reconhecimento já vinha do século anterior, quando ali perto do Instituto, entre outros veneráveis pesquisadores, estava **Friedrich August Kekulé** (1829-1896- Bonn) que havia descoberto o anel do Benzeno. Ali também nasceu e viveu o compositor **Ludwig van Beethoven** (1770 -1827) que tres (3) anos antes de sua morte completara a nona sinfonia (1824). O intercâmbio me propiciou a entender que meu maior interesse era a pesquisa básica e clínica, e não a prática clínica fora do ambiente acadêmico.

No retorno ao Brasil (1981), completei o Curso de Medicina e me graduei em 1982. A pesquisa iniciada na Alemanha foi utilizada como Projeto de Mestrado no Departamento de Fisiologia da UFPE (concluído em 1984) sob a orientação do Professor Waldemar Ladosky, cuja Dissertação versou sobre esteróides hormonais publicada no Brazilian Journal of Medical and Biological Research (1984). Minhas obrigações no Mestrado em Fisiologia foram apenas obter os créditos das disciplinas, o que me permitiu realizar parcialmente a Residência em Clínica Médica no Hospital Getúlio Vargas (1984-1985), que foi interrompida pela preferência ao primeiro emprego como Professor Visitante Universidade de Mato Grosso em Cuiabá. Na convivência diária de trabalho no laboratório, costumava ouvir o Professor Ladosky dizer que Curitiba [anteriormente ele havia sido docente da Universidade Católica do Paraná, (PUCPR)] é a cidade brasileira com excelentes padrões europeus, mas o destino me colocou primeiro em outros lugares onde aprendi bastante. De 1985 a 1986, fui professor visitante na Fundação da Universidade de Mato Grosso em Cuiabá, onde

lecionei na disciplina de Fisiopatologia da Nutrição e Metabologia do Curso de Graduação (Nutrição). Aprovado em concurso em 1985, lecionei por 3 anos e 6 meses na disciplina de Farmacologia Clínica do Departamento de Farmacologia e Terapêutica da Universidade Federal do Ceará (1986-1989). Em seguida, apliquei para o doutorado em Montreal com grande diversidade em culturas e idiomas de muitos países, e também por ser a cidade com o maior estatus bilingue da província de Quebec (inglês-francês), no Canadá. Surgiu ali a oportunidade de realizar o **Doutorado e Pós-Doutorado no Departamento de Terapêutica da Universidade McGill (1989-1995)**. Minhas atividades de pesquisa durante os 6 anos na McGill se basearam no modelo experimental de degeneração e regeneração cerebral em animais com hipotireoidismo congênito ou trauma isquêmico. Foi na McGill que se abriram portas para o estudo da morfogenética e biologia molecular. O Doutorado foi concluído no início de 1994, mas permaneci na McGill como Fellow do Hospital Royal Victoria e Departamento de Farmacologia e Terapêutica por mais um ano (licença sem vencimentos da UFC). Novamente guiado pelas indicações do Professor Ladosky, que permanecia na UFPE, fui transferido em 01/10/1995 para Curitiba como professor do Departamento de Pediatria da Universidade Federal do Paraná, lotado no Serviço de Endocrinologia Pediátrica. A grande riqueza de casos clínicos para pesquisa neste Serviço e o apoio recebido da Reitoria me permitiram realizar pesquisas envolvendo a fisiopatologia de doenças com distúrbios na síntese e metabolismo de esteróides, sobretudo nos tumores do córtex da glândula adrenal, com elevada incidência no Paraná. Na época, o que a equipe deste Serviço mais estudava era o tumor de córtex adrenal (TCA) pediátrico. Contudo, diante das dificuldades de infraestrutura e recursos para pesquisa, utilizei meu período de férias acumuladas e o curto afastamento, com ônus, para realizar pesquisas, em 1997, no **National Institutes of Health (NIH)**, estudando amostras biológicas de pacientes com TCA em investigação no Departamento de Pediatria da UFPR. Porém, quem dominava a metodologia que me era importante (hibridização genômica comparativa) e orientou todo o trabalho foi o **Professor Bassem Haddad na Georgetown University**, próximo ao NIH. Depois de retornar ao Brasil, meses depois (1998) completei o que precisava com uma pesquisa sobre cultivo primário de células do tumor de córtex adrenal de crianças no St. Jude Children's Research Hospital. Talvez impulsionado pela motivação na pesquisa que estava se tornando muito interessante, os vínculos anteriores com Bonn e com Montreal foram ficando menos intensos até que anos mais tarde os vínculos se estabeleceram quase que exclusivamente com colaboradores dos Estados Unidos e da França. Depois do curto período de pós-doutoramento no NIH e St. Jude Children's Research Hospital, voltei a Curitiba, e comecei a procurar financiamentos de agências de fomento, empresas e apoio

da Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia (APACN) para montar um Centro de Pesquisa associado à UFPR. Fundei então em 2001 o Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC) que permanece até o presente sob minha coordenação.

### **3. ENSINO (GRADUAÇÃO E PÓS-GRADUAÇÃO) e ATIVIDADES ADMINISTRATIVAS**

Durante todo o período como docente no Departamento de Pediatria lecionei para os alunos do curso de Medicina (disciplinas MD308, MD309, e MD311 do internato curricular obrigatório, e optativo em Pediatria 4 e 5, curso de especialização, residência médica e de Pós-Graduação stricto sensu (Mestrado e Doutorado), totalizando aproximadamente 10 anos nas atividades de ensino, extensão e pesquisa. Em 2000 e 2001, assumi a coordenação do Curso de Mestrado em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR durante 4 anos, sendo dois mandatos de 2 anos (Portaria No 2.890 de 24 de abril de 1998, e portaria No 823 de 26 de abril de 2000). Minha meta principal foi a implantação do Curso de Doutorado, um trabalho que foi concluído em 2001 com a aprovação pela CAPES. Novamente, atuei como vice-coordenador deste Programa em 2003 e 2004. Buscando fortalecer a pesquisa em oncologia pediátrica e ampliar a infraestrutura para projetos de alunos do Curso de Mestrado e Doutorado do Departamento de Pediatria da UFPR, no Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC), muitos equipamentos foram adquiridos do St. Jude Children's Research Hospital de Memphis, e passamos a ter mais ajuda da Associação Paranaense de Apoio à Criança com Neoplasia- (depois de pagar a compra do imóvel) e da Reitoria da Universidade Federal do Paraná. O CEGEMPAC está localizado à avenida Agostinho Leão Júnior, 400, Alto da Glória. O CEGEMPAC serviu de base para mais de 30 projetos de alunos de Pós-Graduação da UFPR, e, continuo até a presente data responsável por sua coordenação. Atualmente, o CEGEMPAC desenvolve vários projetos de cooperação técnica com professores da UFPR, do Brasil e do exterior, com intercâmbio mais constante com o Hospital Erasto Gaertner e Hospital do Câncer de Cascavel (UOPECCAN) nos primeiros 10 anos, e depois com forte financiamento e intercâmbio científico com o Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe.

Depois dos 10 anos como Professor do Serviço de Endocrinologia Pediátrica do Departamento de Pediatria do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná (1995-2005), fui transferido, em 08/08/2006, para o **Departamento de Saúde**

**Coletiva (antes chamado de Saúde Comunitária).** Aqui as pesquisas continuaram na área de câncer pediátrico e hereditário (incluindo todos os tipos de câncer em adultos), porém com viés mais forte na epidemiologia, unindo aspectos ecológicos com a genética de população. Neste Departamento, o ensino e a pesquisa foram modernizados com tecnologias de informações geográficas (SIG), com o objetivo de mapear as regiões de maior incidência de câncer e malformações congênitas. Desde 1995 me dediquei principalmente à busca de respostas sobre a elevada incidência de TCA no Paraná e hoje, orgulhosamente, apresento grande parte das descobertas que mudaram o curso da assistência e pesquisa desta doença. Pude introduzir ferramentas novas e modalidades de pesquisa clínica em larga escala, criei em 2006 a maior coorte do mundo de famílias com potencial risco de desenvolver câncer (<http://coorte1.ippsys.org>) e os maiores mapeamentos genéticos e químicos (de microbacias) no mesmo território (200.000 km<sup>2</sup> do Paraná).

Infelizmente, em 1995, não houve consenso para a fundação do Instituto de Pediatria da UFPR, profundamente agravado por problemas de liderança de projetos, financiamentos e coautoria dos artigos científicos. Contudo, tenho gratidão institucional e reconheço o valor dos 10 anos de atuação na Endocrinologia Pediátrica para minhas pesquisas. Minha saída deste Departamento se deu nos meses em que o CEGEMPAC iniciara o primeiro mapeamento genético da mutação *TP53* R337H responsável pela maior incidência do TCA no Paraná, com financiamento da Secretaria de Estado do Governo do Paraná, SETI/PR. Para evitar o cancelamento do projeto devido à impossibilidade de usar o ambulatório do Departamento de Pediatria, a solução foi (e continua sendo) o forte apoio ambulatorial do Hospital Pequeno Príncipe. Demonstramos, neste primeiro e longo projeto, com 171 mil recém-nascidos testados, que todas as crianças que desenvolveram TCA tiveram diagnóstico precoce e foram curadas (Custódio et al., 2013). Depois de minha saída do Departamento de Pediatria em 2005, e já no Departamento de Saúde Comunitária, ainda permaneci como orientador dos últimos alunos de Mestrado e Doutorado da Pediatria até o ano de 2006. Em seguida, continuei por mais dois anos como orientador apenas do **Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Farmacêuticas da UFPR** (2002-2007).

Foram 25 anos de dedicação ao Ensino, pesquisa (resumida em 25 perguntas e respostas, mostradas abaixo, que mudaram paradigmas) e extensão na Universidade Federal do Paraná, que incluiu orientações de alunos de iniciação científica, de Mestrado e Doutorado do Programa de Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR (1995-2006), do Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências Farmacêuticas (2002-2007) e do recentemente criado Curso de Mestrado Acadêmico em

Saúde Coletiva do Setor de Ciências da Saúde (2017 até o presente). Nestes 25 anos como docente na UFPR, fiquei ausente, no exterior, por pouco tempo (total de 149 dias de afastamento do país, com ônus), e cerca de até um mês por ano (no mês de férias), sempre envolvido em atividades de pesquisa com colaboradores dos Estados Unidos ou da França. O foco principal da minha pesquisa neste período foi a oncologia, que corresponde a 60% de minhas publicações. A internacionalização de minha pesquisa surgiu inicialmente por meio dos projetos que culminaram com artigos publicados, e continua até o presente com o suporte de colaboradores do *St. Jude Children's Research Hospital* de Memphis, TN, EUA (destacando as colaborações com Dr. Gerard P. Zambetti, Dr. Raul C. Ribeiro e Dra. Emília M. Pinto) e do Instituto de Farmacologia Molecular e Celular (IPMC) de Valbonne e Universidade de Nice, (Nice, França) (com a colaboração do Dr. Enzo Lalli.. A internacionalização dos achados obtidos como colaborador e palestrante dos principais eventos ligados a minha principal linha de pesquisa, sobre diagnóstico, tratamento e cura do tumor de córtex adrenal em crianças, se intensificou a partir de 2011 com palestras em eventos, como de Wüzburg, Alemanha ([https://www.ukw.de/fileadmin/uk/portal/04\\_Aktuelles/Dokumente/AdrenalCancerSymposium.pdf](https://www.ukw.de/fileadmin/uk/portal/04_Aktuelles/Dokumente/AdrenalCancerSymposium.pdf)) até o mais recente encontro em Clermont-Ferrand, França (<https://acc2019.wordpress.com/programme/>). Tem sido muito interessante a experiência adquirida no Departamento de Saúde Coletiva porque grande parte das investigações que desenvolvo está fortemente ligada à epidemiologia, e aos aspectos genéticos e ambientais do câncer hereditário de muitas famílias.

Dentro deste panorama geral na UFPR, minha atuação no ensino da graduação sempre foi no Curso de Medicina, seguindo o modelo tradicional com aulas teóricas em sala e aulas práticas nas enfermarias e consultórios. Os temas sempre foram relacionados à endocrinologia pediátrica enquanto docente do Departamento de Pediatria até 2005. No Departamento de Saúde Coletiva continuei atuando na formação profissionalizante do Curso de Medicina onde a maior parte do ensino foi dedicada à disciplina de Atenção Integral à Saúde II (MS065). Nesta disciplina, com forte conteúdo prático, empregamos a metodologia ativa, centrada na metodologia da problematização. Neste modelo, o aprendizado do aluno começa com a percepção da realidade e a liberdade de ação frente ao cotidiano do paciente do SUS, seja no consultório de uma Unidade Básica de Saúde (UBS) de atenção primária ou em ambiente domiciliar nos bairros Bacacheri, Bom Pastor e Fernando de Noronha. Os conteúdos construídos pelo estudante são adaptados à sua experiência prévia (conhecimentos de vários conteúdos que ele aplica em um certo problema), e, nesta interface o meu papel como docente tem sido ajustar o pensamento

crítico e as decisões do aluno até a solução do problema. O ensino se baseia no enfrentamento da realidade do SUS, no qual o aluno tem mais autonomia e assume mais responsabilidade, com ênfase na Estratégia Saúde da Família (ESF) e nos princípios da Atenção Primária à Saúde (APS). O importante neste processo de aprendizagem é a convivência do aluno com várias especialidades, com conhecimentos e qualificações distintas, atuando fora do hospital universitário. Além da atenção básica, a noção de sistemas e serviços de saúde organizados em redes assistenciais é bastante discutida, procurando entender como o paciente se desloca da APS para atenção secundária/terciária e redes de atenção à saúde.

No contexto da pós-graduação, os alunos de Mestrado e Doutorado optavam por escolher seu tema de projeto de pesquisa ou seguiam os projetos que eu os disponibilizava. Foram mais de 10 alunos (de outros professores) que executavam seus projetos no CEGEMPAC, e meus 20 alunos formados em 4 Programas de Pós-Graduação da UFPR, a saber, Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria; Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; Curso de Mestrado Acadêmico em Saúde Coletiva e Curso de Mestrado em Informática). Destes, fui orientador de 18 e coorientador de 2 alunos, com os seguintes títulos de projetos de pesquisa:

1. "Desenvolvimento de ELISA para hormônio do crescimento humano e comparação com outros métodos comerciais", dissertação de Mestrado defendida por Juliana Ferreira de Moura em 2001 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
2. "Síndrome de insensibilidade androgênica completa: mutação do receptor androgênico, aspectos clínicos e comportamento sexual numa grande família brasileira", dissertação de Mestrado defendida por Carla Claudia Pavan Senn em 2002 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
3. "Autoanticorpos contra nervos periféricos em pacientes com diabetes mellitus tipo 1", dissertação de Mestrado defendida por Eduardo R. Meister em 08/11/2003 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
4. "Identificação de um marcador embrionário no tumor de córtex adrenal de crianças", dissertação defendida por Giovanna Assis Pereira em 20/02/2004 no Curso de Mestrado do Programa de Ciências Farmacêuticas da UFPR;



5. "Otimização do uso do mitotano no tratamento de carcinoma adrenocortical em crianças", dissertação de Mestrado defendida por Patrícia Zancanella em 21/12/2004 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
6. "Avaliação de Parâmetros Clínicos histopatológicos e amplificação do oncogene N-Myc para estimar o prognóstico de crianças com neuroblastoma", dissertação de Mestrado defendida por Ivy Zortéa da Silva Parise em 06/04/2005 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
7. "Desenvolvimento de imunoenensaio para determinar a atividade das fosfatases alcalinas placentárias (PLAP) e PLAP-símile em amostras de soro e tecido de pacientes oncológicos", dissertação de Mestrado defendida por Sérgio Túlio Stingenen em 31/05/2005 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
8. "Aspectos epidemiológicos e expressão de SF-1 e DAX-1 dos tumores de córtex adrenal de crianças no Estado do Paraná", tese de Doutorado defendida por Mara Alboney D. Pianosvski em 28/07/2005 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
9. "Relação entre infiltração de linfócitos T CD8+ e células CD25+ com o estágio, tamanho, apresentação clínica e sobrevivência de tumores de córtex adrenal em crianças", dissertação de Mestrado defendida por Guilherme Augusto Parise em 07/11/2005 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
10. "Proliferação e apoptose de fibroblastos com a mutação no gene *TP53* de pacientes com síndrome de Li-Fraumeni", dissertação de Mestrado defendida por Flávia Ludmila Kavalec em 12/07/2006 do Programa de Ciências Farmacêuticas da UFPR;
11. "Prevalência do alelo *TP53* R337H no Estado do Paraná", dissertação de Mestrado defendida por Gislaïne Custódio em 18/12/ 2006 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
12. "Plataforma de ensino e pesquisa para área médica", tese de Doutorado defendida por Jeroniza Nunes Marchaukoski em 16/02/2007 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;

13. “Relação entre taxas de mortalidade por câncer e a quantidade de agrotóxicos teoricamente usada no Estado do Paraná”, dissertação de Mestrado defendida por Ednéia Perez Machado em 28/09/2007 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
14. “Mecanismos moleculares implicados na formação do tumor de córtex adrenal de crianças”, tese de Doutorado defendida por Giovanna Assis Rodrigues em 25/02/2008 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
15. “Teste de pré-triagem para avaliação do desenvolvimento neuropsicomotor em crianças com até 12 meses de idade”, dissertação de Mestrado defendida por Joseli do Rócio Maito de Lima em 21/07/2008 no Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR;
16. “Análise em alta resolução (aCGH) de alterações genômicas em tumores de córtex adrenal em crianças”, dissertação de Mestrado defendida por Heloisa Komechen em 25/02/2010 no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR;
17. “Monitoramento observacional pelos pais de crianças portadoras da mutação *TP53* R337H “ dissertação de Mestrado de Karina C F Tosin, defendida em 30/11/2020 no Curso de Mestrado em Saúde Coletiva da UFPR.

Duas coorientações de projetos de Mestrado e Doutorado:

1. “Geomedicina: Sistema de visualização de fatores ambientais e doenças em mapas na internet”, dissertação de Mestrado defendida por Humberto Cereser Ibañez em 19/06/2007 no Programa de Pós-Graduação em Informática da Universidade Federal do Paraná (Coorientador);
2. “Prevalência da mutação R337H *TP53* no Paraná, histórico de câncer e avaliação de carcinomas de plexo coróide em crianças no Estado do Paraná”, tese de Doutorado defendida por Gislaíne Custódio em 02/06/2011 no Programa de Ciências Farmacêuticas da UFPR (coorientador).

Em 2018, passei a orientar alunos do Mestrado no recém-criado Curso de Mestrado em Saúde Coletiva. Tenho colaborado com a disciplina de Epidemiologia com uma parte específica da minha pesquisa (epidemiologia do câncer, geoprocessamento, e estatística espacial). O destaque desta pesquisa (Sistema de Informações Geográficas pela Internet – Geomedicina patentado em 2007) foi financiado pelo Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe e tem sido utilizado por alunos do Mestrado de Ciências da Computação e da Estatística da UFPR. A primeira aluna que concluiu o Mestrado neste Curso (Karina Costa Fraguas Tosin) defendeu o artigo sobre Ética Médica (18º aluno orientado na UFPR).

18. A importância do teste TP53 R337H neonatal e do monitoramento observacional pelos pais no diagnóstico precoce do tumor de córtex adrenal em crianças. Dissertação de Mestrado de Karina Costa Fraguas Tosin do Curso de Mestrado em Saúde Coletiva, UFPR (novembro de 2020).

#### **Atividades administrativas:**

1. Membro do primeiro Comitê Assessor da área de saúde da Fundação Araucária (FAP Paraná) de 02 de outubro de 2000 a 30 de outubro de 2003;
2. Assessor Setorial (Setor de Ciências da Saúde) de relações internacionais da UFPR (portaria 918 da Reitoria da UFPR de 17/11/2003) em 2003 e 2004.
3. Membro do Comitê Assessor dos Programas de Mestrado e Doutorado da Medicina 2 da CAPES 2012-2017(6 anos);
4. Membro da Comissão de seleção do Prêmio de melhor Tese do ano da Medicina 2 (membro em 2013 e coordenador em 2014);
5. Diretor fundador do CEGEMPAC-UFPR de 2002 (ano de inauguração da sede da Rua Agostinho Leão Júnior, 400) a 2010 (mediante acordo de cooperação entre APACN e UFPR) (8 anos) e depois renovado desde 2015, até o presente;
6. Coordenador do Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR, de 1998 a 2001 (4 anos).

#### **4. ATIVIDADES DE PRODUÇÃO INTELECTUAL: uma abordagem da pesquisa principal**

Aqui apresento apenas um recorte da minha pesquisa incluindo tudo sobre o tumor de córtex adrenal de crianças.

Minhas pesquisas contribuíram com conhecimentos, produtos e ações que foram citados em mais de 2.600 artigos (<https://www.scopus.com/authid/detail.uri?authorId=7004532805>).

Grande parte de minhas descobertas e protocolos versaram sobre mudanças de conceitos e condutas no diagnóstico e tratamento com impacto na redução da mortalidade do tumor de cortex adrenal (TCA) de crianças no Paraná e Santa Catarina. Embora tenha tido atuações e publicações em outros assuntos e tipos de câncer, selecionei uma narrativa com 31 dos 72 artigos que tem como meta mostrar a evolução da pesquisa que beneficiou as populações do Paraná e Santa Catarina, usando diferentes metodologias que evoluíram conforme a disponibilidade de financiamentos. Sempre foi uma conquista de muitas mãos e sobretudo atribuídas diretamente ao trabalho de alunos de pós-graduação titulados de 1999 a 2020, com o suporte e incentivos do Hospital de Clínicas, Hospital Pequeno Príncipe e Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe, **tendo como principal patrocinador a Associação Hospitalar de Proteção à Infância Dr. Raul Carneiro onde destaco o importante apoio de seus diretores Ety Gonçalves Forti, Ety Cristina Forti Carneiro e José Álvaro Carneiro.** Enalteço aqui, igualmente, as parcerias da Associação Paranaense de Apoio à Criança com Câncer e também de grandes colaboradores estrangeiros, colegas do Departamento de Saúde Coletiva da UFPR, APACN-CEGEMPAC-UFPR, Hospital Erasto Gaertner (em especial a Dra. Mara A.D. Planovski), Hospital do Câncer de Cascavel (UOPECCAN, em particular da Dra. Carmem M. Fiori), Hospital Infantil Joana de Gusmão de Florianópolis (em especial Dra. Tatiana E.J. Costa e Ivy Z.S. Parise), Hospital Pequeno Príncipe (em especial Dra. Flora Watanabe), dos profissionais da rede pública, sobretudo de todas as maternidades do Paraná e de Santa Catarina, e das demais Instituições financiadoras tais como SETI-PR, CNPq, CAPES, National Institutes of Health dos Estados Unidos da América (por meio do *St. Jude Children's Research Hospital* de Memphis), Le Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) da França (por meio do Instituto de Farmacologia Celular e Molecular de Valbonne) e de patrocinadores privados. Destaco aqui também, o apoio recebido do Professor Carlos Moreira Filho (enquanto Reitor da UFPR), Dr. Fernando Miranda (enquanto Coordenador da Associação dos Amigos do HC) e dos Presidentes da APACN (Antônio Carlos dos Santos Lima e Mariza Del Claro).

**Atividades de pesquisa:** uma abordagem da pesquisa laboratorial, clínica e em animais sobre o tumor de córtex adrenal

O tema de minha narrativa, na forma de perguntas formuladas (ou objetivos propostos) com as respectivas respostas, teve uma seleção de 31 artigos destacados com o identificador de objeto digital-DOI (com minha coautoria), cujo principal foco e título foi: **“Epidemiologia, diagnóstico, Prognóstico, Tratamento e Cura dos Tumores de Córtex Adrenal (TCA) em Crianças do Paraná e Santa Catarina: determinantes genômicos, ambientais e terapêuticos”**. Os artigos apresentados com minha coautoria incluem também os trabalhos com maior mérito de outros coautores, sem os quais não seria possível atingir os objetivos pretendidos. As crianças com TCA geralmente apresentam manifestações clínicas típicas do excesso de esteróides hormonais de cada camada do córtex adrenal normal: sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S) da zona reticular (o principal); cortisol da zona fasciculada (o segundo mais importante) e mineralocorticóide da zona glomerulosa. As perguntas formuladas em cada pesquisa e respondidas em cada artigo foram se tornando mais complexas a partir do ano 2005. As mais importantes são descritas cronologicamente aqui. O *background* genético dos TCAs era pouco conhecido antes do ano 2000 e já se sabia que algo fora do comum existia para explicar a sua elevada incidência reportada em São Paulo por Marigo *et al.* (1968). No Paraná, o primeiro levantamento (Sandrini *et al.* 1997) confirmou uma incidência 10 vezes maior do que nos Estados Unidos da América que é 0,3 / milhão de crianças abaixo de 15 anos de idade (Young *et al.* 1981).

Perguntas formuladas (destacadas em vermelho):

**(1) Qual a complexidade macro-genômica dos TCAs?** As alterações encontradas utilizando o método de Hibridização Genômica Comparativa (CGH) incluem perdas de função de genes importantes com propriedades supressoras de tumor (nas deleções cromossômicas) e/ou o aumento de função de genes pró-carcinogênicos (nos ganhos cromossômicos). As respostas para esta primeira pergunta foram publicadas em 1999 (Figueiredo *et al.* 1999, DOI: [10.1210/jcem.84.3.5526](https://doi.org/10.1210/jcem.84.3.5526)).

A análise digital de imagens detectou ganhos ou perdas cromossômicas e revelou grandes aberrações genéticas em adenomas e carcinomas, porém devido ao pequeno número de casos estudados (N=9) não houve diferenças significativas em relação à idade, sexo, tamanho ou estágio do tumor ( $p > 0,1$ ). Cromossomos e regiões cromossômicas 1q, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 9q, 10p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 18q, 19 e 20q tiveram ganhos,

enquanto 2q, 3, 4, 9p, 11, 13q, 18, 20p e Xq apresentaram perdas. **O achado mais notável foi o ganho consistente no número de cópias da região cromossômica 9q34 em 8 dos 9 tumores.** Concluímos que, tanto o tumor benigno quanto o maligno do sul do Brasil, apresentam múltiplas aberrações genéticas, incluindo um ganho consistente na região cromossômica 9q34, cujo significado foi descoberto pelo nosso grupo alguns anos depois e foi parte da Tese de Doutorado da Dra. Mara D.A. Pianovski, ex-docente do Departamento de Pediatria (**amplificação do número de cópias no gene *SF-1*, fator esteroideogênico 1**). Em 1999 ampliamos as pesquisas em busca de mutações na linhagem germinativa dos pacientes. Este estudo foi complementado anos mais tarde com o surgimento de novas tecnologias de bioinformática e colaboração com o grupo de pesquisadores de Paris (coordenado pelos doutores Eric Letouzé e Enzo Lalli), mostrando ser maior a instabilidade genômica (alterações de ganhos e perdas de partes do cromossomo) da criança portadora da mutação *TP53* R337H com TCA no Paraná do que no paciente com TCA europeu sem mutação no gene *TP53* (Letouzé *et al.* 2012A, 2012B, DOI: [10.1210/jc.2012-1184](https://doi.org/10.1210/jc.2012-1184), DOI: [10.1371/journal.pone.0035897](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035897)).

**(2) A origem do TCA em crianças é congênita?** Em qualquer região do mundo, a grande maioria dos TCAs apresenta um pico de diagnóstico antes dos 4 anos de idade. No Paraná não é diferente, 65% (38/58) dos TCAs acontecem antes dos 4 anos, enquanto a mediana de idade para os primeiros sinais e sintomas foi com menos de 3 anos, numa série com 70% de meninas (Sandrini *et al.*, 1997). Entretanto, esta faixa etária ainda deve ser menor porque o diagnóstico do TCA tem atrasos de até 2 anos devido a falha na percepção dos pais e/ou dos médicos da atenção primária. Como a maior parte dos TCAs em crianças apresenta principalmente sinais e sintomas de excesso de andrógenos, e considerando que as células normais da zona fetal do córtex adrenal (onde são produzidos os hormônios dehidroepiandrosterona/DHEA e sua forma sulfatada DHEA-S) deveriam morrer por meio da morte celular programada (fisiológica), entre o nascimento e o quarto mês de vida, acredita-se que a célula inicial do tumor tem origem dos remanescentes desta zona fetal (hipótese descrita por Figueiredo *et al.* 2000, DOI: [10.1590/s0100-879x2000001000012](https://doi.org/10.1590/s0100-879x2000001000012)). A hipótese relacionada ao pico do TCA pediátrico próximo ao nascimento sugere que o TCA faz parte dos tumores congênitos, e para esta compreensão é preciso conhecer o comportamento de uma parte do córtex adrenal fetal. Outra evidência a favor do TCA virilizante ter o mesmo fenótipo de células da zona fetal e ser congênito (com produção de andrógenos) o fato de outros TCAs (30-40%) com apresentação mista (virilização + Síndrome de Cushing relacionados com hiperprodução de andrógenos + cortisol) serem

mais comuns em crianças mais velhas e semelhantes ao fenótipo de TCAs de adultos, provavelmente originário da camada fascicular ou glomerulosa. Assim, estes últimos tumores de crianças mais velhas provavelmente não são congênitos. Alguns meses após o nascimento a zona fetal desaparece completamente e mais tarde resurge como uma nova camada celular denominada camada reticular, que atinge o crescimento máximo com intensa atividade esteroidogênica no início da puberdade. Considerando que a suspeita de uma causa genética (somática ou hereditária) era mais provável do que uma causa de origem ambiental, surgiu então a pergunta 3.

**(3) Qual a causa da incidência elevada do TCA pediátrico no Paraná?** Para nossa surpresa, 03 fatos importantes aconteceram em 1998:

- o surgimento de vários casos de TCA na mesma família (originada principalmente de Irati e Guarapuava), sem outros tipos de câncer (uma forte evidência da hereditariedade), cuja principal hipótese seria uma mutação no gene *TP53*;

- paralelamente, a Affymetrix tinha acabado de lançar um chip de microarranjos para DNA com todas as mutações no gene *TP53* e no ano 2000, numa cortesia oferecida pela Affymetrix ao *St. Jude Children's Research Hospital*, os micro-arranjos foram realizados usando o DNA do sangue das crianças e foi possível descobrir que 35 de 36 crianças de famílias não aparentadas apresentaram a mesma mutação (*TP53* R337H, substituição de arginina por histidina no códon 337);

- outro fato notável foi que todos os TCAs com esta mutação perderam o alelo normal, evidenciando uma elevada expressão nuclear da variante *TP53* R337H e que um dos pais sempre era portador da mesma mutação (Ribeiro *et al.* 2001, DOI: [10.1073/pnas.161479898](https://doi.org/10.1073/pnas.161479898)). Com estes achados ficou esclarecido que a principal causa (mas não a única) da elevada incidência de TCA pediátrico é o alelo *TP53* R337H herdado de um dos pais, com herança autossômica dominante (significando que a mutação foi de apenas um dos dois alelos do pai ou da mãe).

O histórico e a frequência de diversos tipos de tumores de todas as famílias portadoras de *TP53* R337H incluía apenas 1/3 de famílias com perfil de síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL) e, em menor proporção, a síndrome Li-Fraumeni clássica (LFS). A maioria dos casos de TCAs em crianças ocorre nos estados de Paraná e São Paulo. A população paranaense é principalmente de descendência europeia e menos heterogênea do que a de São Paulo, que é composta por muitos imigrantes de todas as partes do Brasil. Os novos casos de TCA ocorrem em todos os grupos étnicos, exceto índios e asiáticos. Sabe-se que o TCA ocorre com maior frequência em crianças com LFS (Malkin *et al.*, 1990)

ou síndrome de Beck-with-Wiedemann, mesmo sem haver mutação no gene *TP53* (Tank & Kay, 1980).

Utilizamos o método de microarranjos da Affymetrix para identificar mutações e polimorfismos no gene *TP53*, usando DNA sanguíneo de 36 crianças paranaenses. Notavelmente, 35 dos 36 (97%) pacientes eram portadores de uma mutação pontual idêntica que codifica uma substituição do aminoácido arginina por histidina no códon 337 (R337H). Nas células de TCA, o alelo selvagem foi deletado em todos os tumores pesquisados, e a imunohistoquímica da proteína p53 mutante acusou concentrações aumentadas dentro dos núcleos.

O achado de mutação heterozigótica no sangue (R337H/P53 selvagem) já descrevia a perda do alelo selvagem e permanência apenas o alelo *TP53* R337H no tumor, confirmando a perda do alelo selvagem, ou seja, o segundo golpe demonstrado por Knudson (1971). Embora essas características fossem consistentes com o encontrado por outros autores em tumores adrenais associados à LFS, não estava claro como seria possível a grande heterogeneidade nos tipos e frequências de câncer nas famílias paranaenses. Os experimentos *in vitro* demonstraram que *TP53* R337H funciona razoavelmente bem no tubo de ensaio, e que representa um alelo de baixa penetrância, porém representando a causa de 97% dos casos de TCA do Paraná. Respondida a pergunta (3) e demonstrado que *TP53* R337H é o responsável pela elevada incidência do TCA no Paraná, e provavelmente em pelo menos mais 6 estados brasileiros (Santa Catarina, Rio Grande do Sul, São Paulo, sul de Minas Gerais, e parte do sul do Rio de Janeiro e Mato Grosso do Sul), ficou a dúvida se esta mutação ainda acontece ou se surgiu de um ancestral comum (efeito fundador, ou seja, um ancestral comum). Três anos mais tarde Pinto e colaboradores da USP de São Paulo descobriram que se tratava de um efeito fundador (Pinto *et al.*, 2004). Esta informação foi muito importante porque colocou um ponto final na busca por fatores ambientais carcinogênicos capazes de mudar o codon 337 normal para o genótipo R337H, e portanto, nenhum dos agentes carcinogênicos atuais é responsável pela origem desta mutação. Corroborando com esta hipótese, até o presente, não encontramos nenhuma criança portadora de R337H de pais sem R337H.

(4) Os dados epidemiológicos relativos à idade, apresentação clínica do TCA e sobrevida, têm uma tendência mundial de serem idênticos ou diferentes para os portadores da mutação *TP53* R337H do Brasil? Para responder a esta pergunta era necessário avaliar um grande número de casos, o que era difícil por se tratar de doença rara fora do Sul e



Sudeste do Brasil. O artigo de revisão elaborado a partir do Registro Internacional do Tumor de Córtex Adrenal de Crianças (IPACTR) pelo *St. Jude Children's Research Hospital*, reuniu o maior número de casos de TCA em uma única revisão, cujo mérito principal foi do trabalho do cirurgião Dr. Edson Michalkiewicz (Michalkiewicz *et al.*, 2004; DOI: [10.1200/JCO.2004.08.085](https://doi.org/10.1200/JCO.2004.08.085)). Neste trabalho, os TCAs foram classificados como adenomas ou carcinomas; no entanto, a distinção entre esses dois subtipos às vezes é difícil (baseado-se na recorrência do tumor). As informações foram obtidas do Registro Internacional dos Tumores de Córtex Adrenal de Crianças (IPACTR) sob a orientação do Dr. Raul Ribeiro do *St. Jude Children's Research Hospital* e a partir deste estudo surgiram novas pistas para entender a patogênese, a epidemiologia e a resposta ao tratamento. A análise clínica incluiu 254 pacientes, sendo quase 50% de casos do Hospital de Clínicas da UFPR e Sudeste do Brasil. Neste registro nota-se maior proporção de crianças abaixo dos 4 anos (70%) e do sexo feminino (1,6:1). A maioria das crianças apresentou sinais e sintomas de virilização, acompanhados por manifestações da hipersecreção de outros hormônios corticais supra-renais. O sinal mais comum (84,2%) foi a virilização, seguida de síndrome de Cushing (34%). A sobrevida depende do estágio do tumor; pacientes com tumores pequenos e ressecáveis têm taxas de sobrevida superiores a 80%, enquanto o desfecho para todos os casos teve apenas cerca de 50% de sobrevida (Michalkiewicz *et al.*, 2004). Entre os fatores prognósticos favoráveis estão incluídos a idade inferior a 4 anos, menor tamanho do tumor, sinais de virilização isolada na apresentação, ausência de síndrome de Cushing, e de sinais histológicos de malignidade do tumor, demora no diagnóstico e tratamento, entre outros. A quimioterapia com cisplatina, doxorrubicina e etoposídeo juntamente com um adrenolítico (mitotano) são indicados para casos de tumor irressecável ou metastático, embora seu impacto no desfecho geral seja pequeno. Um recorte destes casos do IPACTR (revisado por Pereira *et al.*, 2004; DOI: [10.1590/s0004-27302004000500010](https://doi.org/10.1590/s0004-27302004000500010)), contendo apenas os casos do Hospital de Clínicas da UFPR (N=125), apresentou uma proporção feminina:masculina de 2,6:1. As formas mais comuns de apresentação foram virilização isolada ou associada (93%) e síndrome de Cushing (42%), demonstrando que os casos do Paraná acontecem em idade mais jovem. Estes dados demonstram que há duas tendências de TCA na faixa pediátrica, uma em idade mais jovem com maior frequência de virilização (provavelmente congênito) e outra em crianças mais velhas com mais casos de síndrome de Cushing.

**(5) Qual é a penetrância (“risco”) da mutação TP53 R337H para induzir ou causar o desenvolvimento do tumor de córtex adrenal e (6) qual é a incidência de TCA**

**pediátrico no Paraná?** Para ser exato, o importante é calcular a penetrância em uma população geral, mas como inicialmente não foi possível, utilizamos todas as famílias de crianças que tiveram pelo menos um caso de TCA com registro no Hospital de Clínicas da UFPR. Na época a resposta permitiu orientar os pais sobre as chances de desenvolvimento do TCA de acordo com a idade (Figueiredo *et al.*, 2006; DOI: [10.1136/jmg.2004.030551](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.030551)). Todos os portadores identificados haviam herdado esta mutação do pai ou da mãe. Considerando que a mutação *TP53* R337H *de novo* (sem pais portadores) não foi ainda identificada no Sul do Brasil, o tamanho da população de portadores deverá depender da penetrância para o TCA e talvez das características de sub-regiões do Paraná. Para responder a esta pergunta havia duas alternativas, da forma mais fácil (usando uma coorte de base hospitalar) e da forma mais difícil, mais demorada e mais exata (usando uma coorte de base populacional). Calculamos a penetrância desta mutação em um grupo de 30 famílias que tiveram 41 casos de TCA admitidos no Hospital de Clínicas da UFPR. Outro viés importante foi incluir famílias que tinham dois ou mais casos de TCA, quando o mais comum é ter um caso de TCA por família. Foram obtidas informações sobre os antecedentes mórbidos das 30 famílias e 927 familiares foram testados para *TP53* R337H. Usamos o método da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de digestão enzimática (enzima de restrição) do DNA amplificado (PCR-RFLP). Do total de indivíduos testados, 232 eram do lado do pai ou da mãe sem a mutação e 695 (incluindo os 40 probandos) eram do lado que segrega a mutação *TP53* R337H. Não encontramos neste grupo de 30 famílias nenhuma que preenchesse os critérios de síndrome de Li-Fraumeni (LFS); no entanto, sete preencheram os critérios para síndrome semelhante a Li-Fraumeni (LFL). Dos 695 indivíduos do lado com a mutação, 240 (34,5%) tiveram teste positivo para a mutação, enquanto nenhum dos 232 indivíduos na outra linhagem parental apresentou a mutação. A penetrância para o TCA foi de 9,9% (intervalo de confiança de 95%, variando de 8,7 a 11,1%). Concluiu-se também que para surgir um TCA em adulto seria preciso pelo menos mais de 30 TCAs em crianças. Para responder a pergunta (6) sobre a frequência de TCA no Paraná, revisamos os TCAs do município de Curitiba a partir dos atestados de óbito (Pianovski *et al.*, 2006; DOI: [10.1002/psc.20624](https://doi.org/10.1002/psc.20624)). Revisamos todos os atestados de óbito que mencionavam TCA e que foram relatados à Secretaria de Saúde do Estado do Paraná entre 1998 e 2003, para indivíduos menores de 15 anos que residiam na região metropolitana de Curitiba. Foram identificados oito óbitos por TCA. A taxa de mortalidade padronizada por idade por milhão de crianças abaixo de 15 anos na região metropolitana de Curitiba durante os anos 1998-2003 foi de 1,6 (intervalo de confiança de 95% (IC) 1,4, 1,8) para o TCA. A proporção das taxas de mortalidade ajustadas à idade do RN e do TCA

adrenal foi de 1,43. A incidência de TCA estimada a partir dos dados de mortalidade, assumindo uma taxa de sobrevivência de 0,542 (descrita no artigo de Michalkiewicz *et al.*, 2004, acima mencionado), foi de 3,5 (IC95% 2,9, 4,2). Concluímos que a incidência de TCA nessa região é cerca de 12 a 18 vezes superior à incidência relatada nos Estados Unidos e na Europa (Young *et al.*, 1981). Os trabalhos da Dra. Mara Pianovski principalmente na linha de pesquisa com SF-1, foram capítulos de sua tese de Doutorado defendida no Curso de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente do Departamento de Pediatria da UFPR.

(7) Com mais de 90% dos pacientes do Paraná com TCA sendo portadores da mutação hereditária TP53 R337H, qual seria o papel do elevado ganho de DNA no braço longo do cromossomo 9 nos TCAs (remetendo ao desdobramento da questão 1)? Detectamos um ganho consistente em 9q (ou uma porção dele) em oito dos nove casos de ACTs pediátricos e amplificação de 9q34 na maioria desses casos usando hibridização genômica comparativa (questão 1). Para acompanhar esses resultados, examinamos se o gene do fator esteroideogênico 1 (SF-1) (que está localizado em 9q34) desempenha um papel importante no desenvolvimento e função do córtex adrenal. Usando o método de Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) detectamos aumento do número de cópias do gene SF-1 em todos os oito casos com ganho de 9q, sugerindo uma associação entre um aumento no número de cópias do gene SF-1 e tumorigênese adrenocortical (Figueiredo *et al.*, 2005, DOI: [10.1210/jc.2004-0942](https://doi.org/10.1210/jc.2004-0942)). Entretanto, faltava demonstrar se o número de cópias de SF-1 poderia per se aumentar a probabilidade de desenvolvimento do TCA. Isto foi demonstrado em nosso primeiro modelo animal em uma colaboração que ocorreu por 3 anos com o Dr. Enzo Lalli do Instituto de Farmacologia Molecular e Celular de Valbonne, França e colaboradores da Califórnia (Doghman *et al.*, Mol Endocrinol. 2007, DOI: [10.1210/me.2007-0120](https://doi.org/10.1210/me.2007-0120)). Neste estudo foi demonstrado que camundongos com elevada expressão de SF-1 desenvolvem o TCA, mesmo na ausência de TP53 R337H e foi concluído que esta via pode participar do processo inicial de surgimento de TCA em crianças de qualquer lugar do mundo. Além desta participação de SF-1, nos 4 anos seguintes (2007-2011) focamos na pesquisa de outra via que poderia contribuir na origem do TCA pediátrico que era a perda de *imprinting* genômico do braço curto do cromossomo 11, tema da próxima pergunta formulada.

(8) A perda de *imprinting* está implicada na formação do TCA pediátrico e com que frequência? A pergunta formulada se refere a banda 11p15.5 do cromossomo humano que abriga um grande conjunto de genes que sofrem perda de *imprinting* genômico (no qual

apenas o alelo do pai é expresso). A desregulação deste grupo de genes está associada à síndrome de crescimento excessivo e predisposição tumoral, síndrome de Beckwith-Wiedemann. Para responder esta pergunta analisamos o DNA tumoral de 12 crianças com TCA (4 adenomas e 8 carcinomas) e comparamos com o DNA do sangue de seus pais. Onze pacientes apresentaram perda de 11p15.5 do lado materno no TCA (Rosati et al. 2008, DOI: [10.1016/j.cancergencyto.2008.05.010](https://doi.org/10.1016/j.cancergencyto.2008.05.010)). Todos os TCAs de crianças que tiveram perda de 11p15.5 materno apresentaram superexpressão de Fator de Crescimento similar a Insulina (IGF2), confirmando a super-expressão que encontramos no gene *IGF2* (West et al. 2007, DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-06-376](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-376)) decorrente da hiperativação do alelo paterno na ausência do alelo materno. Nossos dados sugerem que a perda de 11p15 é um achado generalizado no TCA infantil, independente da criança ser ou não portadora de *TP53* R337H, ser ou não do Paraná. Alterações na expressão de outros genes na mesma região (por exemplo, a baixa expressão de CDKN1C/Inibidor 1C de Quinase dependente de Ciclina) podem contribuir para outras doenças como a síndrome de Beckwith-Wiedemann (neste caso dizemos que o gene CDKN1 está sob controle de *imprinting* paterno e expressão materna, e na perda do materno cai a síntese de CDKN1 e, assim, pode ocorrer a síndrome de Beckwith-Wiedemann). Com isto confirmamos que para o IGF2 é o inverso, de expressão paterna e com a perda do alelo materno esta expressão pode ficar muito maior. Notavelmente, quase 100% dos TCAs de crianças e adultos expressão altas concentrações de IGF2.

Enquanto estas duas últimas pesquisas aconteciam (2005-2011), meu foco principal em outro longo projeto foi comprovar a cura das crianças (2005-2013) com TCA sem usar medicamentos antitumorais e sem fazer mais de uma cirurgia (a mudança de paradigma). Assim, em 2005 teve início o projeto coorte 1 para responder às duas próximas perguntas. Considerando que mais de 90% dos TCAs de crianças paranaenses são portadoras do gene *TP53* R337H, responsável pela elevada incidência e taxa de mortalidade, perguntamos:

(10) Seria eticamente correto realizar um teste de DNA em todos os recém-nascidos do Paraná para identificar a mutação usando uma gota do sangue (teste do pezinho), e depois monitorar a criança por meio de exames periódicos para fazer o diagnóstico pré-clínico ou clínico por meio de exames periódicos? (11) E, qual seria o estadiamento destes TCAs e a sobrevida a médio prazo (acima de 3 anos de seguimento ambulatorial)? O artigo publicado em 2013 confirmou que não fazer nada é negligenciar o que é possível ser feito e nunca havia sido feito em lugar algum, para nenhum tipo de câncer pediátrico com abordagem

na população geral (Custódio *et al.*, 2013, doi: [10.1200/JCO.2012.46.3711](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711)). Este foi o projeto da aluna do Curso de Doutorado em Ciências Farmacêuticas da UFPR (Gislaine Custódio). Conseguimos demonstrar que todas as crianças que fizeram o acompanhamento regular foram diagnosticadas com TCA de tamanho abaixo de 50g (o estágio 1 considera até 100g sem desenvolvimento de metástases) e precisaram apenas de uma cirurgia. Percebemos que não havia necessidade do diagnóstico pré-clínico (sem o paciente ter manifestações clínicas), mas resolvemos acompanhar todas as crianças por mais 7 anos para saber como elas evoluíram, e os demais adultos portadores da mutação em relação a todos os demais tipos de câncer. Para isto, em 2006, criamos a base de dados com todas as informações registradas em heredogramas automatizados com os dados clínicos e demográficos (<https://coorte.ippsys.org>).

Iniciamos também, em 2010, a pesquisa de mapeamento dos portadores de R337H em todo o território paranaense usando o sistema Geomedicina que desenvolvemos (<https://geomed5.ippsys.org>). Por meio deste sistema de geoprocessamento teve início também o registro prospectivo de todas as amostras de agrotóxicos nas águas das microbacias do Paraná, com a colaboração da ex-Mineropar (colaboração com Dr. Otávio A. B. Licht e Dr. Eduardo Salamuni, <https://apufpr.org.br/2019/11/22/alem-das-8-quando-a-medicina-e-a-geologia-se-encontram-para-salvar-vidas/>). Como explicado neste vídeo, a meta a longo prazo (2010-2020) era cruzar dados químicos do ambiente onde vivem os portadores de R337H com a frequência de TCAs pediátricos e outros tumores em adultos. Este assunto ambiental segue sendo abordado nas perguntas (15) e (16).

Sabemos que R337H é uma mutação de baixa penetrância e não pode ser considerada como causa da síndrome de Li-Fraumeni (LFS), nem da forma mais leve de LFS, chamada de síndrome de Li-Fraumeni-like (LFL), sem haver outras alterações genéticas associadas, e parte desta afirmação foi demonstrada em 2006 e 2008 (Figueiredo *et al.* 2006, DOI: [10.1136/jmq.2004.030551](https://doi.org/10.1136/jmq.2004.030551) ; Ribeiro *et al.* 2007, DOI: [10.1016/j.canlet.2006.04.008](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2006.04.008)). Identificamos que LFL acontece em 20 a 30% e LFS acontece em menos de 8% de todas as nossas famílias (mais de 600). Alguns pesquisadores pesquisam apenas as famílias de base hospitalar (ou seja, com pelo menos um caso de câncer), enquanto as nossas famílias são da população geral (cerca de 15% não têm casos de câncer e aproximadamente 20% com apenas um ou dois casos). Outra verdade comum nas famílias com LFS, as mutações no gene *TP53* são mais patogênicas e os portadores geralmente tem câncer e vão a óbito em idade reprodutiva, conseqüentemente a tendência é de queda do número de portadores de mutações graves nas futuras gerações. Em contra partida, a maior parte dos portadores

de R337H sobrevive o tempo suficiente para ter filhos e netos, e por isto a pergunta seguinte foi mais fácil ser respondida.

(12) Qual o impacto epidemiológico da mutação *TP53* R337H para 85 milhões de brasileiros (toda Região Sul, São Paulo, parte do Mato Grosso do Sul, Sul de Minas e Sul do Rio de Janeiro)? Se todas estas regiões se comportam da mesma maneira como ocorre no Paraná, então aproximadamente a cada 40 anos duplica-se a população, ou seja, estes 85 serão 170 milhões e também duplicará o número de portadores de R337H (entre 0,21 e 0,30% dos casos). No aconselhamento genético (mais adiante) defendemos que não iríamos interferir na decisão dos pais de ter ou não ter filhos. Conseqüentemente, o problema tende a crescer e algo precisa ser assumido pelas autoridades de saúde.

Com a queda nos custos do sequenciamento do genoma completo (WGS) o mundo inteiro passou a utilizar esta metodologia a partir de 2010, e no caso de pacientes com câncer, é possível parrear os resultados de WGS de DNA sanguíneo com WGS do DNA tumoral. Sendo assim, formulou-se a pergunta 13.

(13) Que outras variantes poderiam estar associadas ao R337H para aumentar o risco de desenvolver TCA? Foi um projeto de elevado custo, o *St. Jude Children's Research Hospital* estava no consórcio com outras instituições americanas para sequenciar os principais tipos de câncer, e entramos no projeto reunindo casos de TCA com e sem a mutação *TP53* R337H. As conclusões foram parcialmente publicadas em 2015 na revista *Nature Communications* (Pinto *et al.* 2015, DOI: [10.1038/ncomms7302](https://doi.org/10.1038/ncomms7302)). Trinta e sete (37) TCAs e as amostras de sangue foram então analisadas por sequenciamento genômico completo, sequenciamento completo dos exons, e transcriptoma. Os cromossomos 11p e 17 sofrem perda de heterozigose no início da tumorigênese, sugerindo que há eventos controladores pró-TCA. Alterações genéticas adicionais incluem mutações somáticas recorrentes nos genes *ATRX* e *CTNNB* e integração do herpesvírus-6 humano no cromossomo 11p. Em conjunto, esses achados mostraram piorar o prognóstico do TCA pediátrico e podem participar do processo de tumorigênese no córtex da glândula supra-renal.

O MHC (Sistema Principal de Histocompatibilidade, *Major Histocompatibility Complex*) é um conjunto de genes com papel importante na identidade biológica de cada um dos seres vertebrados. Os genes MHC nos seres humanos recebe o nome de HLA (Antígenos Leucocitários Humanos, *Human Leukocyte Antigen*) que codificam um grupo de proteínas encontradas na superfície das células. Este HLA, juntamente com todo



o sistema imunológico, identifica e protege o ser humano de um corpo estranho invasor. Baseado neste contexto formulou-se a pergunta 14.

(14) O que acontece com o sistema imunológico da criança considerando o TCA como um invasor/não próprio? Sabemos que apesar da mutação R337H ter baixa penetrância (Figueiredo *et al.* 2006, DOI: [10.1136/jmg.2004.030551](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.030551)), ela é a única alteração que está quase que 100% presente nos casos de TCA pediátrico do Paraná. Entramos no projeto do *St. Jude Children's Research Hospital*, iniciado em 2015, para estudar o sistema MHC baseado nas evidências anteriores de que os TCAs avançados com o pior prognóstico apresentaram baixa expressão da classe MHC II. Resumindo, a expressão dos genes da classe MHC II e de um grupo selecionado de genes de diferenciação foi analisada usando-se um chip da Affymetrix. As células que expressam MHC classe II foram identificadas por ensaios morfológicos e imuno-histoquímicos. Confirmamos o que havíamos publicado antes com os pesquisadores do *St. Jude Children's Research Hospital* (West *et al.* 2007, DOI: [10.1158/0008-5472.CAN-06-3767](https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3767)) que a expressão do MHC classe II foi significativamente maior nos adenomas adrenocorticais do que nos carcinomas e foi associada a uma estimativa mais alta de sobrevida. Especificamente, a sobrevida livre de progressão (PFS) se associa a uma maior expressão de HLA-DPA1, encontrada predominantemente em células hematopoiéticas infiltrantes no TCA. Nossos resultados sugerem então que as respostas imunes modulam a tumorigênese adrenocortical e podem permitir a estratificação de prognóstico para esta doença. Ficou claro que o sistema imunológico tem um papel importante, mas ainda restava saber como se comportam os linfócitos T citotóxicos. O aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação do Departamento de Pediatria da UFPR, Dr. Guilherme A. Parise, sob minha orientação, havia encontrado maior infiltração de linfócitos T citotóxicos CD8+ nos TCAs de melhor prognóstico. Não satisfeitos com a qualidade da imunohistoquímica para este marcador, resolvemos não publicar, mas só conseguimos repetir os experimentos 15 anos mais tarde quando surgiram melhores anticorpos anti-CD8. Como novidade, surgiu também um novo conceito e de maior interesse (via de evasão ou de inibição do sistema imunológico do paciente com câncer). Ou seja, o sistema imunológico de alguns pacientes com alguns tipos de câncer parece ficar sob o controle de 3 proteínas, sendo uma delas um receptor chamado PD-1 (morte celular programada 1, do inglês *programmed cell death 1*) encontrado na superfície de células do sistema imune, com ação inibitória. Se o tumor expressar concentrações altas do ligante PD-L1 haverá inibição da reação imunológica. Assim, quando expresso na superfície de células tumorais, o ligante PD-L1 permite escapar

do ataque imunológico contra o tumor. Há também o ligante PD-L2 com o mesmo efeito de PD-L1. Publicamos esses resultados (Parise *et al.* 2019, DOI: [10.3390/cancers11111730](https://doi.org/10.3390/cancers11111730)) com a elevada expressão de linfócitos T citotóxicos associada aos estádios com melhor prognóstico e sobrevida, mas não encontramos expressão relevante para PD-1 nem PD-L1 entre os TCAs. Concluimos que a via PD-1/PD-L1 não desempenha um papel importante no bloqueio imunológico contra o TCA como acontece com outros tipos de câncer, não sendo possível ainda dominar a técnica de imunohistoquímica para PD-L2.

Até 2010 era difícil saber se o ambiente do Paraná, bem conhecido como um dos maiores consumidores de agrotóxicos do mundo, se insere no contexto da etiologia do TCA. Sabemos que a mutação *TP53* R337H em crianças sempre é herdada de um ou ambos os pais (Figueiredo *et al.* 2006, DOI: [10.1136/jmq.2004.030551](https://doi.org/10.1136/jmq.2004.030551), Custódio *et al.* 2013, DOI: [10.1200/JCO.2012.46.3711](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711)), e que a hipótese da origem ambiental desta mutação no Paraná não se confirmou e prevaleceu o efeito fundador (Pinto *et al.*, 2004), muito provavelmente de origem caucasiana portuguesa-ibérica (Paskulin *et al.*, 2015).

Iniciamos as análises químicas no meio ambiente, cujos resultados alimentavam nosso sistema de geoprocessamento (<https://geomed5.ippsys.org>), enquanto em outra camada do mesmo sistema armazenamos os dados de câncer da coorte 1 do primeiro mapeamento de famílias paranenses (cerca de 16 mil pessoas de todas as idades, sendo cerca de 25% portadores da mutação R337H). Entretanto, para ter poder estatístico e ser possível demonstrar causa e efeito, faltava uma casuística muito maior de uma doença sensível à poluição ambiental, para primeiro caracterizar uma associação do ambiente rural (toneladas de grãos/Km<sup>2</sup>) com o químico [concentrações de organoclorados e concentrações do ânion cloreto (Cl<sup>-</sup>) derivado do metabolismo de organoclorados, outros agrotóxicos, e de produtos industrializados e utilizados como materiais de limpeza. Ou seja, seria necessário uma doença muito mais frequente que o TCA pediátrico e escolhemos as malformações congênitas. Este foi o teste usado para caracterizar o território paranaense em três sub-regiões: muito agrícola (C1), muito industrializada e com elevada densidade populacional (C3) e uma intermediária (C2). Então foi formulada a pergunta 15.

**(15) Sabendo qual é o ambiente paranense mais poluído para as malformações congênitas, como este ambiente afetaria a frequência de TCA?** Demonstramos neste artigo (Ibañez *et al.* 2019, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.09.061](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.061)) que a variabilidade da incidência de malformações congênitas (MCs) entre os 399 municípios do Estado do Paraná sugere forte influência de fatores ambientais. O foco foi nos organoclorados por serem extremamente



potentes, tóxicos, de baixo custo e facilmente importados da China, via Paraguai. Analisamos o ânion Cl<sup>-</sup>, diclorodifeniltricloroetano (p, p'-DDT), diclorodifenildicloroetileno (p, p'-DDE), diclorodifenildicloroetano (p, p'-DDD) e outros em 465 amostras de água coletadas (465/736, 63%) de microbacias hidrográficas. Também foram avaliadas as produções agrícolas para as safras de 2006 a 2010 (toneladas/km<sup>2</sup>). Os níveis de Cl<sup>-</sup> aumentaram significativamente no período de coleta de amostras de água (2008, 2009 ou 2010) em comparação com 1996 (p < 0,0001). Os municípios foram divididos de acordo com os níveis de Cl<sup>-</sup>, onde a sub-região C2 (centro-sul) apresentou menores concentrações do que as sub-regiões C1 (norte-oeste) e C3 (leste-sul). Foram identificados 8.756 casos de MCs entre 1.221.287 recém-nascidos (RN) de todas as sub-regiões, nascidos entre 2007 e 2017. C1 apresentou maiores concentrações de DDT-DDE-DDD (p, p'-DDT + p, p'-DDE + p, p'-DDD), maior produção agrícola/km<sup>2</sup> e maior proporção de casos de MCs por nascidos vivos. Os resultados permitiram concluir que os organoclorados e outros produtos químicos tóxicos clorados podem contribuir para os casos de MCs em humanos e esses produtos químicos são transformados e liberam Cl<sup>-</sup> nos rios. Níveis mais altos de Cl<sup>-</sup> foram encontrados nas regiões mais industrializadas e maior uso de produtos para limpeza encontrados em C3 onde se localiza Curitiba.

Baseados nesta classificação concluímos o levantamento de casos de TCA da coorte 1 nestas 3 regiões (C1, C2 e C3). Os portadores do R337H que vivem na sub-região agrícola C1 tiveram um menor risco de desenvolver TCA (um caso para cada 105 portadores de R335H) do que aqueles que vivem na sub-região industrial com grande densidade populacional (risco relativo = 2,4), correspondendo a um caso de TCA pediátrico para cada 40 portadores de R337H. Estes resultados sugerem que algum fator está dificultando o aparecimento de TCA em C1 ou facilitando a tumorigênese em C3 ou ambos. Este estudo foi publicado por Costa *et al.*, 2019, DOI: [10.3390/cancers11111804](https://doi.org/10.3390/cancers11111804). O que se destaca como mais implicado nesta diferença são os elevados teores de organoclorados encontrados em C1 (Ibañez *et al.* 2019, DOI: [10.1016/j.scitotenv.2018.09.061](https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.061)). A hipótese é que a exposição a estes produtos tóxicos tem o mesmo efeito que o mitotano que usamos para tratar o TCA avançado (Zancanella *et al.* 2006, DOI: [10.1097/01.mph.0000212965.52759.1c](https://doi.org/10.1097/01.mph.0000212965.52759.1c)), considerando que o mitotano é quimicamente quase idêntico aos organoclorados. Ademais, há uma enorme disparidade entre a criança que está sendo tratada para eliminar uma massa tumoral que, às vezes, é muito grande (acima de 500g) e um grupo pequeno de células no começo de um TCA, exposto aos organoclorados da água e dos alimentos consumidos nesta região. O fato é que os teores de organoclorados na água podem chegar a mais de 10 microgramas por

litro em algumas microbacias, o que seria mais fácil para eliminar um TCA inicial. Em outras palavras, num TCA grande tem muitos mais barreiras e células para serem eliminadas com mitotano, enquanto poucas células iniciais ficariam proporcionalmente mais vulneráveis aos organoclorados. Por outro lado, não descartamos que outros produtos tóxicos em C3 contribuam também para aumentar os riscos de desenvolver o TCA em quem já tem maior predisposição (ser portador de R337H e outras alterações genéticas e epigenéticas). Com estes achados agregamos o Fator Ambiental como anti-TCA em C1, contrário a todos as outras alterações pró-TCA aqui descritas.

Considerando as evidências recentes, em 2017 dois grupos de colaboradores propuseram dois objetivos para responder às perguntas formuladas

**(16 e 17). As vias do ácido retinóico e das fosfodiesterases estão relacionadas à etiologia ou a patogênese do TCA pediátrico?** E de fato, se comprovou que ambas, independentemente,

estão associadas. Uma delas é um polimorfismo (Surakhy *et al.* 2020, doi: [10.1038/s41416-020-0764-3](https://doi.org/10.1038/s41416-020-0764-3)) no DNA genômico de crianças com TCA positivo para R337H. Movidos por este achado, a busca em genes relacionados à síntese de ácido retinóico ou do receptor de ácido retinóico foi feita num banco de amostras genômicas dos sequenciamentos genômicos anteriores de nossos TCAs no *St. Jude Children's Research Hospital*, (utilizando os genomas resultantes da nossa publicação de 2015 na *Nature Communications*) e foi identificada uma mutação no gene *ALDH1A2* (envolvido no metabolismo do ácido retinóico) e relacionado com menor sobrevida. Isto reforça a hipótese de que a produção endógena de ácido retinóico, derivado do retinol e vitamina A, pode ser importante para proteger a célula de se transformar no TCA. Mais experimentos são necessários para se tirar alguma decisão importante destes achados, como por exemplo, se seria o caso de aumentar o consumo de precursores imediatos do ácido retinóico para reduzir o risco de desenvolvimento do TCA em portadores de R337H. A segunda via envolvida com disfunções hereditárias foi encontrada em isoformas das enzimas fosfodiesterases de crianças com ou sem a mutação R337H (Pinto *et al.*, 2020, DOI: [10.3390/cancers12020506](https://doi.org/10.3390/cancers12020506)). As fosfodiesterases catalisam a hidrólise dos nucleotídeos cíclicos adenosina monofosfato cíclico 3'5'-cíclico (cAMP) e monofosfato cíclico da guanosina 3'5'-cíclico (cGMP) em seus monofosfatos inativos 5'. O cAMP desempenha um papel crítico como um segundo mensageiro nos tecidos endócrinos, por exemplo do hormônio ACTH, ao estimular células do córtex adrenal. Pesquisamos novamente os dados genômicos e exômicos nas amostras dos nossos próprios tumores, de amostras de sangue e do TCA emparelhadas (37 pares). Nove de 37 (24%) pacientes apresentaram variantes da linha germinativa de fosfodiesterases. Estes resultados sugerem

que variantes genéticas de fosfodiésteres alteradas podem contribuir para formação do TCA de crianças.

Para nossa surpresa, outra mutação na linhagem germinativa foi encontrada no banco de dados genômicos do *St. Jude Children's Research Hospital* incluindo também os nossos pacientes. Trata-se de uma variante não codificante (E134\*; rs146752602) no gene *XAF1* localizado no cromossomo 17q13.2, bem próximo do *locus* do gene *TP53* selvagem ou *TP53* R337H em 17q13.1. Com isto, formularam-se as perguntas 18 e 19.

(18) Qual o impacto da cosegregação de dois genes mutados, ambos com a função de serem supressores de tumor e (19) qual a abrangência desta cosegregação na população do Paraná?

As respostas (18) foram a grande descoberta pesquisando mais de 50 mil recém-nascidos do Paraná, os testes *in vitro* e funcionais com *XAF1*-E134\*, e as análises de mais de 200 diferentes tipos de tumores realizados no *St. Jude Children's Research Hospital*, com dados inéditos e mérito de publicar na revista **Science Advances** (Pinto *et al.*, 2020, DOI: [10.1126/sciadv.aba3231](https://doi.org/10.1126/sciadv.aba3231)). O sequenciamento completo do genoma dos TCAs pediátricos foi minuciosamente analisado nas bandas 17p13.1 e 17p13.2 de pacientes com câncer não aparentados. Os haplótipos foram avaliados por análise de segregação em 582 parentes, e comparados aos observados em 47.000 recém-nascidos com histórico desconhecido de câncer. Ademais foram realizados experimentos *in vitro* com variantes funcionais e genes alvo. Um haplótipo estendido compreendendo do gene *TP53* R337H ao segundo gene mutado *XAF1* (p.Glu134Ter / p.E134\* / rs146752602) foi mais prevalente em pacientes que desenvolveram sarcomas e cânceres múltiplos em comparação com o observado na população em geral. Estudos *in vitro* demonstraram que a proteína *XAF1*, do tipo selvagem, melhora a transativação de p53, enquanto o *XAF1*-E134\* é acentuadamente atenuado nessa atividade, estabelecendo uma interação funcional entre p53 e *XAF1*. Surpreendentemente, descartando os portadores de *TP53* R337H (que têm uma frequência revista em 2019 como sendo 1 caso para cada 327 recém-nascidos testados), a variante *XAF1*-E134\* aparece na população paranaense e europeia numa frequência de 1 para cada 130 recém-nascidos testados. Entretanto, *XAF1*-E134\*, sozinha, parece ser apenas um risco muito baixo. O que é impactante é que aproximadamente uma em cada 500 pessoas do Paraná cosegregam no braço longo do cromossomo 17, ambos *TP53* R337H e *XAF1*-E134\* que oferece maior risco do que cada um, separadamente. Sabia-se que o gene *XAF1* mantém *feedback* positivo, auxiliando na ativação do gene *TP53* (Lek *et al.*, 2016), e por isto havia muito interesse num estudo populacional extenso no Paraná e *in vitro* com

tumores de várias partes do Brasil e outros países (incluindo testes funcionais com a tecnologia CRISPR). Método usado no St. Jude Children's Research Hospital por Emília M. Pinto, pelo qual determinado genoma de uma célula pode ser modificado inserindo ou eliminando parte do genoma (baseado no sistema de defesa antiviral bacteriano CRISPR-Cas9). Ou seja, a nuclease Cas9 complexada com um RNA-guia sintético pode cortar no ponto onde o RNA se liga à sequência exata do genoma, permitindo que os genes existentes sejam removidos e / ou novos sejam adicionados. Por meio deste método se observou o efeito da eliminação de *XAF1-E134\** de células de crianças que cosegram *XAF1-E134\** com *TP53 R337H*.

Conclusão, o *XAF1 p.E134 \** atua em conjunto com a proteína *R337H*, levando a um fenótipo de câncer mais agressivo do que qualquer uma das variantes agindo sozinhas. Ademais, o risco da cosegregação destas duas variantes para o TCA foi calculado com base no comparativo entre pessoas com TCA (cerca de 85%) e sem TCA (cerca de 70%). Ou seja, quem cosegrega ambos os genes (no mesmo cromossomo) tem 15% de maior chance de desenvolver o TCA.

Com isto, em 2015 iniciamos outro ambicioso projeto para: (20) **rever a frequência da mutação *R337H* em algumas regiões do Paraná** onde foram realizados poucos testes do pezinho (Custódio *et al.* 2013, DOI: [10.1200/JCO.2012.46.3711](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711)) (21) **realizar os testes nos recém-nascidos de Santa Catarina para mapear todas as regionais de saúde**, (22) **calcular as incidências de TCA e as frequências de *R337H* nos TCAs nos dois estados**; (23) **recalcular a penetrância de TCA na coorte 1 de 2006 porque as crianças completaram 12 anos de idade**; e (24) **testar um segundo protocolo de diagnóstico clínico do TCA, sem os exames periódicos** [antes realizado com exames periódicos para incluir o diagnóstico pré-clínico, ou seja, antes detectamos o TCA pelos exames complementares sem a criança apresentar sintomas e sinais de TCA (Custódio *et al.* 2013, DOI: [10.1200/JCO.2012.46.3711](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711))]. Com mais cerca de 100 mil testes realizados nos recém-nascidos do Paraná e Santa Catarina a partir de 2016, atingimos cerca de 300 mil testes em crianças e adultos nestes 2 estados. Os 4 últimos objetivos (21-24) foram respondidos no artigo publicado em 2019 (Costa *et al.* 2019, DOI: [10.3390/cancers11111804](https://doi.org/10.3390/cancers11111804)). Encontramos que as frequências médias de *R337H* nas populações do Paraná e Santa Catarina foram 0,306% e 0,245% respectivamente, e 95% e 87% nos TCAs destes estados, respectivamente. A incidência do TCA foi re-calculada considerando a faixa etária mais próxima do pico de incidência, aproximadamente 6,4 casos / milhão de crianças menores de 10 anos por ano no Paraná e 4,15 / milhão em Santa Catarina. A penetrância do TCA para portadores acompanhados do nascimento aos 12 anos foi de 3,9% a partir do teste do pezinho (base populacional).

Ou seja, é uma grande diferença em relação a penetrância calculada anteriormente (aproximadamente 10%) quando se usa uma população de base hospitalar (Figueiredo *et al.* 2006, DOI: [10.1136/jmg.2004.030551](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.030551)). Avaliando o objetivo (24) por um curto período (3 anos), verificamos que os pais que foram treinados para identificar os sinais e sintomas do TCA logo após o teste do pezinho e aconselhamento genético, puderam facilmente identificar um pequeno TCA (21g) nesta segunda coorte que chamamos de coorte de 2016 ou coorte 2. Mostramos que a incidência de TCA segue a frequência de R337H em cada população, mas diferenças ambientais como a observada entre as sub-regiões C1 (menos casos de TCA hipoteticamente relacionado à poluição com os organoclorados que são anti-TCA) e C3 pode alterar a prevalência de TCA.

Resumindo 22 anos de pesquisa até esta data (junho de 2020) descobrimos a mutação *TP53* R337H (o achado mais importante), as variantes associadas mais comuns (perda da banda 11p15.5 materna e elevada expressão proteica de IGF-2 e SF-1 no TCA), associações também hereditárias, que compreendem os polimorfismos e mutações em algumas isoformas de fosfodiesterases e enzimas que atuam na via de síntese e metabolismo do ácido retinóico, e menos frequentes foram os achados relacionados ao pior prognóstico do TCA (mutações somáticas recorrentes nos genes *ATRX* e *CTNNB1*). Por fim, uma deficiência do sistema imunológico caracterizada por falha de proteção da classe MHC II relacionada com menor infiltração de linfócitos T citotóxicos no TCA. Neste conjunto de fatores pró-TCA, postulamos que a associação mais comum, e provavelmente de maior impacto para risco de TCA, é quando a mesma célula do córtex adrenal apresenta a mutação *TP53* R337H e perda da banda 11p15.5 materna. Porém, quando esta criança portadora de R337H se tornar adulto o que será mais impactante é a cosegregação de *TP53* R337H e *XAF1*-E134\* para outros tipos de câncer. A premissa de haver outras alterações genômicas foi considerada em exaustivas pesquisas (Pinto *et al.* 2011, DOI: [10.1177/1947601911409745](https://doi.org/10.1177/1947601911409745), Pinto *et al.* 2015, DOI: [10.1038/ncomms7302](https://doi.org/10.1038/ncomms7302)) mas não se evidenciaram achados importantes nesta via relacionados à etiologia dos TCAs do Sul e Sudeste do Brasil. Além destas alterações, descobrimos a mutação no gene da subunidade alfa da inibina em 13% das crianças com TCA (6/46) colaborando com o Professor Carlos Alberto Longui da Santa Casa de São Paulo (Longui *et al.*, 2004, DOI: [10.1136/jmg.2004.018978](https://doi.org/10.1136/jmg.2004.018978)). A maior parte das crianças do Paraná e São Paulo, como sempre, eram portadoras de R337H (39/46, 85%) sugerindo que esta mutação também contribui com o desenvolvimento de TCA.

Diante de tantas associações de variantes genéticas com R337H em pacientes com TCA, outras relatadas por pesquisadores de São Paulo e as que ainda não conhecemos, conclui-se que *TP53* R337H é o mais importante responsável pelo TCA, mas não o único, como reafirmamos no editorial em português para esclarecer especificamente famílias e profissionais da área de saúde do Brasil (DOI: <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2017v63n3.144>).

Pensando em avaliar o potencial tumorigênico de R337H sem as interferências pró-TCA, formulou-se a pergunta (25) **Qual o risco de desenvolvimento de TCA sozinho num modelo animal controlado e sem outras alterações genéticas?** Para responder a esta pergunta, foi desenvolvido o segundo modelo animal para estudo do TCA e outros tumores, desenvolvido no *St. Jude Children's Research Hospital* sob a orientação de Gerard P. Zambetti. Este camundongo geneticamente modificado tem a inserção da mutação *TP53* R334H (equivalente a *TP53* R337H em humanos, Jeffers *et al.*, *Cancer Research* no prelo). A proteína p53 R334H neste animal se expressa em altos níveis em múltiplos tecidos e é comprometida funcionalmente de maneira específica em resposta ao estresse e ao dano no DNA. Estes animais mutantes p53-R334H desenvolvem poucos tumores, com longa latência e baixa penetrância, consistentes com o que achamos em cerca de 35% das famílias paranaenses portadoras de R337H. Embora seja um animal com tecidos e processos diferentes, observamos que quando existe apenas esta mutação o risco de câncer é mais baixo. Por exemplo, em 116 animais portadores de R334H surgiu apenas um TCA (0.8%, 1/116), enquanto entre 4162 portadores humanos de R337H (Costa *et al.* 2019, DOI: [10.3390/cancers11111804](https://doi.org/10.3390/cancers11111804)) encontramos 77 casos de TCAs pediátricos (1.8%). E ainda nem conhecemos as alterações epigenéticas, todo o sistema imunológico e como vai mudar o tratamento que permanece o mesmo dos últimos 30 anos. Neste desconhecimento, a solução é investir na prevenção contra o diagnóstico tardio. Assim, propusemos o protocolo com custo-efetividade comprovadamente demonstrado na resposta da pergunta 25 (Costa *et al.*, 2019; DOI: [10.3390/cancers11111804](https://doi.org/10.3390/cancers11111804)).

Pensando na população paranaense com cerca de 34 mil portadores de R337H (dos quais 75% cosegregam *TP53* R337H e *XAF1*-E134\*), concluo com a pergunta mais importante, (26) **como as evidências apresentadas poderiam beneficiar as crianças e adultos do Paraná e de Santa Catarina?** No formato proposto, o teste de DNA para R337H é de baixo custo, não mais caro que os demais testes obrigatórios para o recém-nascido. Na proposta de projeto de lei federal, este teste seria concedido a todos os recém-nascidos nascidos no Paraná e Santa Catarina, mas seria obrigatório apenas para famílias com pelo



menos um caso de câncer em que pelo menos um dos pais ou avós nasceram no Sudeste ou Sul do Brasil. Depois de divulgar o resultado presencial para os pais sob aconselhamento genético, os pais recebem orientação sobre todos os sinais e sintomas do TCA e só aparecem no ambulatório para investigar suspeita de TCA ou outro tipo de patologia. O contato com os pais e parentes (depois de testados para mutação *TP53* R337H) seria por telefone e mídias como o whatsapp, periodicamente, para saber se está tudo bem e para oferecer o aconselhamento e o teste de DNA para os demais parentes que ficam periodicamente aparecendo na central de controle. Há críticos contrários ao diagnóstico precoce do TCA por meio do teste do pezinho para R337H alegando sobre o impacto psicológico ao oferecer o teste, pois apenas 0,30% terão resultado positivo e grande parte dos positivos não irão desenvolver o TCA. Nosso estudo com cinco psicólogas realizou 03 testes de depressão e ansiedade para as mães com intervalo de 2 meses, começando quando o RN tinha menos de um mês de idade. Os escores HAD (Hospital Anxiety Depression, do inglês Hospital Anxiety Depression) aplicados nas mães de recém-nascidos testados são moderadamente elevados para ansiedade somente no primeiro teste (antes de completar um mês de idade), ou seja, se normalizam nos testes seguintes com 2 e 4 meses depois do teste do pezinho (Gozdziejewski *et al.*, submetido). Nas primeiras duas tentativas de projeto de lei estadual (apenas para o Paraná) para o teste *TP53* R337H (junto com o teste do pezinho) para tornar obrigatório no Paraná sem exceção, a nossa proposta defendia o teste do pezinho com exames periódicos para o diagnóstico de tumores com peso muito pequeno que caracterizam o começo do TCA (Custódio *et al.*, 2013; DOI: [10.1200/JCO.2012.46.3711](https://doi.org/10.1200/JCO.2012.46.3711)). Entretanto, comprovando-se que pais bem treinados não precisam dos exames periódicos como demonstrado no artigo de Costa *et al.* 2019 (DOI: [10.3390/cancers11111804](https://doi.org/10.3390/cancers11111804)), evitou-se também a péssima qualidade de vida e estresse para as crianças e pais. O custo para a realização do teste do pezinho nos RNs é quase equivalente ao custo com as cirurgias múltiplas e quimioterapia para quem é diagnosticado acima do estágio 1. Ademais, seria obrigatório apenas para recém-nascidos de famílias com pelo menos um caso de câncer (dissertação de mestrado de K.F. Tosin, Mestrado em Saúde Coletiva sob minha orientação).

Diante de muitos comentários contra e a favor do teste do Pezinho para variante *TP53* R337H, seguida de duas opções para vigilância oncológica (com e sem exames periódicos), resolvemos lançar uma pesquisa para uma revista de ética médica, tentando mostrar as vantagens e desvantagens do teste do Pezinho (dissertação de aluna do Curso de Mestrado em Saúde Coletiva da UFPR, em preparação final).

Usamos a biotecnologia (nanomedicina) e publicamos vários artigos com novas ferramentas de rastreamento do TCA e dos hormônios produzidos que não foram citados aqui. Da mesma forma desenvolvemos vários aplicativos (programas de computador) que foram registrados no INPI e foram citados neste memorial.

## 5. ATIVIDADES DE EXTENSÃO

Meu principal trabalho de extensão está inserido dentro das duas coortes (**Serviço de informação à comunidade - COORTES 2006 e 2012**) - Banpesq: 2006027673, atrelado ao projeto de pesquisa "Triagem neonatal, mapeamento da prevalência da mutação *TP53* R337H por município, histórico de câncer, perfil socio-econômico e alterações moleculares associadas com tumores de famílias". Hoje já são mais de 30 mil participantes unidos na mesma base de dados (<http://coorte.ippsys.org>) de 610 famílias, sendo cerca de 25% portadores de R337H e mais de 95% são pessoas que nos procuram sem diagnóstico de câncer, mas apenas para entender o que é e o que pode ser feito para reduzir o risco de câncer. Também importante são as perguntas frequentes sobre o risco de associações com o fumo, o alcoolismo, doenças virais, trabalho na agricultura, etc. Semanalmente damos orientação e educação sobre o significado de ser portador(a) de uma, duas ou mais mutações hereditárias. A comunicação e esclarecimentos para estas pessoas acontece atualmente por meio de grupos whatsapp e telefone. As perguntas mais comuns são sobre risco de câncer em relação ao sexo e à idade, sobre o que fazer para reduzir o risco e outras. Trata-se de um trabalho de orientação e divulgação sobre cuidados, que vai muito além da pesquisa.

Organizei o primeiro Simpósio Internacional sobre Tumores Pediátricos em 2004 com o objetivo de divulgar o recém-inaugurado Centro de Genética Molecular e Pesquisa do Câncer em Crianças (CEGEMPAC-2002) com a participação de 12 estrangeiros e 6 brasileiros palestrantes. Este evento foi organizado com aproximadamente 300 inscritos e aconteceu no auditório principal da FIEP (Avenida das Torres, Curitiba). O último Simpósio internacional (outubro de 2016) foi sobre Imunologia do Tumor de Córtex Adrenal com 11 palestrantes internacionais com financiamentos do St. Jude Children's Research Hospital de Memphis, EUA, do CNRS da França, da Associação Paranaense de Apoio a Criança com Neoplasia e do Instituto de Pesquisa Pelé Pequeno Príncipe. Este evento foi organizado para um pequeno público de pesquisadores (80 inscritos) no Resort Varandas do Mar em São Francisco do Sul, Santa Catarina.



Entre estes dois eventos organizei muitos eventos menores, cursos de escrita científica em inglês, e de revisão sistemática e Meta-Análise.

Revisor de artigos científicos de várias revistas, incluindo principalmente:

1. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism;
2. Plos Medicine;
3. Molecular and Cellular Endocrinology;
4. European Journal of Hematology and Oncology;
5. Pediatric Blood and Cancer
6. Clinical Cancer Research
7. Cancer Research
8. Environmental Health Perspectives

## **6. REFERÊNCIAS (citadas neste memorial)**

Costa TEJ, Gerber VKQ, Ibañez HC, Melanda VS, Parise IZS, Watanabe FM, Pianovski MAD, Fiori CMCM, Fabro ALMR, Silva DBD, Andrade DP, Komechen H, Mendes MC, Carboni E, Kuczynski AP, Souza EN, Paraizo MM, Ibañez MVC, Castilho LM, Cruz AF, Maia TFD, Machado-Souza C, Rosati R, Oliveira CS, Parise GA, Passos JDC, Barbosa JRS, Figueiredo MMO, Lima L, Tormen T, Sabbaga CC, Ávilla SGA, Grisa L, Aranha A, Tosin KCF, Ogradowski KRP, Lima G, Legal EF, Aneqawa TH, Mazzuco TL, Grion AL, Balbinotti JHG, Dammski KL, Melo RG, Filho NK, Custódio G, Figueiredo B. Penetrance of the TP53 R337H Mutation and Pediatric Adrenocortical Carcinoma Incidence Associated with Environmental Influences in a 12-Year Observational Cohort in Southern Brazil. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 16;11(11):1804. doi: 10.3390/cancers11111804.

Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, Grisa L, Parise IZ, Pianovski MA, Fiori CM, Ledesma JA, Barbosa JR, Figueiredo FR, Sade ER, Ibañez H, Arram SB, Stingham ST, Mengarelli LR, Figueiredo MM, Carvalho DC, Avilla SG, Woiski TD, Poncio LC, Lima GF, Pontarolo R, Lalli E, Zhou Y, Zambetti GP, Ribeiro RC, Figueiredo BC. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol*. 2013 Jul 10;31(20):2619-26. doi: 10.1200/JCO.2012.46.3711.

Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, Virolle V, Barbry P, Zambetti GP, Figueiredo BC, Heckert LL, Lalli E. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol*. 2007 Dec;21(12):2968-87. doi: 10.1210/me.2007-0120.

Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, Lacerda L, Pianovski MA, Michalkiewicz E, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Mastellaro MJ, Vianna S, Watanabe F, Sandrini F, Arram SB, Boffetta P, Ribeiro RC. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. 2006 Jan;43(1):91-6. doi: 10.1136/jmg.2004.030551.

Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, Young HM, Haddad BR. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):1116-21. doi: 10.1210/jcem.84.3.5526.

Figueiredo BC, Ribeiro RC, Zambetti G, Haddad B, Pianovsky MD, Pereira RM, DeLacerda L, Sandrini R. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. *Braz J Med Biol Res*. 2000 Oct;33(10):1217-24. doi: 10.1590/s0100-879x2000001000012.

Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, Zambetti G, DeLacerda L, Rodrigues GA, Haddad BR. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):615-9. doi: 10.1210/jc.2004-0942.

Goździewicz AS, Zotti CW, Carvalho IAM, Santos TC, Kulik A, Santi LR, Ogradowski KRP, Dammiski KL, Komechen H, Mendes MC, Souza EN, Paraizo MM, Parise IZS, Parise GA, Grion AL, Custódio C, Mello RG, Figueiredo BC. Psychological impact in mothers after counselling and genetic testing of hereditary TP53 R337H-carrier newborns: a pre-clinical cancer cohort and systematic review study. (Submitted).

Jeffers JR, Pinto EM, Rehg JE, Clay MR, Wang J, Neale G, Heath RJ, Lozano G, Lalli E, Figueiredo BC, Pappo A, Rodriguez-Galindo C, Chen W, Pounds S, Ribeiro RC, and Zambetti GP. The Common Germline TP53-R337H Mutation is Hypomorphic and Confers Incomplete Penetrance and Late Tumor Onset in a Mouse Model. *Cancer Research* (prelo).

Ibañez HC, Melanda VS, Gerber VKQ, Licht OAB, Ibañez MVC, Aguiar Júnior TR, Mello RG, Komechen H, Andrade DP, Picharski GL, Figueiredo DPG, Pianovski MAD, Figueiredo MMO, Custódio G, Parise IZS, Castilho LM, Paraizo MM, Edinger C, Fiori CMCM, Pedrini H, Kiesel Filho N, Fabro ALMR, Fachin RD, Ogradowski KRP, Parise GA, Saldiva PHN, Legal EF, Rosati R, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC, Zambetti GP, Lalli E, Figueiredo BC. Spatial trends in congenital malformations and stream water chemistry in Southern Brazil. *Sci Total Environ*. 2019 Feb 10;650(Pt 1):1278-1291. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.09.061.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1971 Apr;68(4):820-3. doi: 10.1073/pnas.68.4.820.

Lek, M.; Karczewski, K.J.; Minikel, E. V.; Samocha, K.E.; Banks, E.; Fennell, T.; O'Donnell-Luria, A.H.; Ware, J.S.; Hill, A.J.; Cummings, B.B.; et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 2016, 536, 285–291, doi:10.1038/nature19057.

Letouzé E, Rosati R, Komechen H, Doghman M, Marisa L, Flück C, de Krijger RR, van Noesel MM, Mas JC, Pianovski MA, Zambetti GP, Figueiredo BC, Lalli E. SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012 Jul;97(7):E1284-93. doi: 10.1210/jc.2012-1184. Epub 2012 Apr 26.

Letouzé E, Sow A, Petel F, Rosati R, Figueiredo BC, Burnichon N, Gimenez-Roqueplo AP, Lalli E, de Reyniès A. Identity by descent mapping of founder mutations in cancer using high-resolution tumor SNP data. *PLoS One*. 2012;7(5):e35897. doi: 10.1371/journal.pone.0035897.

Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, Mendonca BB, Castro M, Liberatore R Jr, Watanabe C, Lancellotti CL, Rocha MN, Melo MB, Monte O, Calliari LE, Guerra-Junior G, Baptista MT, Sbragia-Neto L, Latronico AC, Moreira A, Tardelli AM, Nigri A, Taymans SE, Stratakis CA. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. *J Med Genet*. 2004 May;41(5):354-9. doi: 10.1136/jmg.2004.018978.

Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science*. 1990 Nov 30;250(4985):1233-8. doi: 10.1126/science.1978757.

Marigo C, Muller H & Davies JNP (1968). Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. *Journal of the National Cancer Institute*, 43: 1231-1240.

Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol*. 2004 Mar 1;22(5):838-45. doi: 10.1200/JCO.2004.08.085.

Surakhy M, Wallace M, Bond E, Grochola LF, Perez H, Di Giovannantonio M, Zhang P, Malkin D, Carter H, Parise IZS, Zambetti G, Komechen H, Paraizo MM, Pagadala MS, Pinto EM, Lalli E, Figueiredo BC, Bond GL. A common polymorphism in the retinoic acid pathway modifies adrenocortical carcinoma age-dependent incidence. *Br J Cancer*. 2020 Apr;122(8):1231-1241. doi: 10.1038/s41416-020-0764-3.

Pereira RM, Michalkiewicz E, Sandrini F, Figueiredo BC, Pianovski M, França SN, Boguszewski MC, Costa O, Cat I, Lacerda Filho Ld, Sandrini R. [Childhood adrenocortical tumors]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Oct;48(5):651-8. doi: 10.1590/s0004-27302004000500010.

Paskulin DD, Giacomazzi J, Achatz MI, Costa S, Reis RM, Hainaut P, dos Santos SE, Ashton-Prolla P. Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. *PLoS One*. 2015 Nov 30;10(11):e0143262. doi: 10.1371/journal.pone.0143262. eCollection 2015.

Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, Zancanella P, Figueiredo BC. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Jul;47(1):56-60. doi: 10.1002/pbc.20624.

Pinto EM, Figueiredo BC, Chen W, Galvao HCR, Palmero EI, Fragoso MCBV, Achatz MI, Savage S, Ashton-Prolla P, Ribeiro EMSF, Hamilton KV, Volc SM, Andrade KC, Diekmann Y, Thomas MG, Korbonits M, Yeager M, Rodriguez-Galindo C, Salvador H, Fuster-Soler JL, Lavarino C, Felix G, Costa TEJB, Chantada G, Odone Filho V, Brugières L, Vaur D, Else T, Stoffel EM, Pappo A, Letouze E, Latronico AC, Mendonca BB, Almeida MQ, Brondani VB,

Bittar CM, Soares EWS, Lima RS, Ramos CRN, Komechen H, Paraizo MM, Parise IXS, Clay M, Murphy AJ, Lalli E, Zhang J, Wang J, Fiori CMCM, Nichols KE, Rampersaud E, Wu G, Ribeiro RC, Zambetti GP. XAF1 as a Modulator of TP53 p.R337H-Driven Tumorigenesis: The Effect of a Genetic Modifier on Cancer Susceptibility. *Science Advances* 2020 Jun 24;6(26):eaba3231. doi: 10.1126/sciadv.aba3231.

Parise IZS, Parise GA, Noronha L, Surakhy M, Woiski TD, Silva DB, Costa TEB, Del-Valle MHCP, Komechen H, Rosati R, Ribeiro MG, Nascimento ML, Souza JA, Andrade DP, Paraizo MM, Galvão MMR, Barbosa JRS, Barbosa ML, Custódio GC, Figueiredo MMO, Fabro ALMR, Bond G, Volante M, Lalli E, Figueiredo BC. The Prognostic Role of CD8+ T Lymphocytes in Childhood Adrenocortical Carcinomas Compared to Ki-67, PD-1, PD-L1, and the Weiss Score. *Cancers (Basel)*. 2019 Nov 5;11(11):1730. doi: 10.3390/cancers11111730.

Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004 Oct;48(5):647-50. doi: 10.1590/s0004-27302004000500009.

Pinto EM, Chen X, Easton J, Finkelstein D, Liu Z, Pounds S, Rodriguez-Galindo C, Lund TC, Mardis ER, Wilson RK, Boggs K, Yergeau D, Cheng J, Mulder HL, Manne J, Jenkins J, Mastellaro MJ, Figueiredo BC, Dyer MA, Pappo A, Zhang J, Downing JR, Ribeiro RC, Zambetti GP. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat Commun*. 2015 Mar 6;6:6302. doi: 10.1038/ncomms7302.

Pinto EM, Faucz FR, Paza LZ, Wu G, Fernandes ES, Bertherat J, Stratakis CA, Lalli E, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, Zambetti GP. Germline Variants in Phosphodiesterase Genes and Genetic Predisposition to Pediatric Adrenocortical Tumors. *Cancers (Basel)*. 2020 Feb 22;12(2):506. doi: 10.3390/cancers12020506.

Pinto EM, Ribeiro RC, Figueiredo BC, Zambetti GP. TP53-Associated Pediatric Malignancies. *Genes Cancer*. 2011 Apr;2(4):485-90. doi: 10.1177/1947601911409745.

Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, Mastellaro MJ, West AN, Kriwacki R, Zambetti GP. Germline TP53 R337H mutation is not sufficient to establish Li-Fraumeni or Li-Fraumeni-like syndrome. *Cancer Lett*. 2007 Mar 18;247(2):353-5; author reply 356-8.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA, Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Jul 31;98(16):9330-5. doi: 10.1073/pnas.161479898.

Rosati R, Cerrato F, Doghman M, Pianovski MA, Parise GA, Custódio G, Zambetti GP, Ribeiro RC, Riccio A, Figueiredo BC, Lalli E. High frequency of loss of heterozygosity at 11p15 and IGF2 overexpression are not related to clinical outcome in childhood adrenocortical tumors positive for the R337H TP53 mutation. *Cancer Genet Cytogenet*. 2008 Oct;186(1):19-24. doi: 10.1016/j.cancergencyto.2008.05.010.

Sandrini R, Ribeiro R & DeLacerda L (1997). Extensive personal experience: childhood adrenocortical tumors. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82: 2027-2031.

Tank ES, Kay R. Neoplasms associated with hemihypertrophy, Beckwith-Wiedemann syndrome and aniridia. *J Urol*. 1980 Aug;124(2):266-8. doi: 10.1016/s0022-5347(17)55401-4.

Tosin KCF. Monitoramento observacional pelos pais de crianças portadoras da mutação *TP53* R337H. Dissertação de Mestrado, Dep. Saúde Coletiva, Universidade Federal do Paraná, 2020.

West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, Oliveira Filho AG, Malkin D, Lalli E, Ribeiro R, Zambetti GP. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2007 Jan 15;67(2):600-8. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-06-3767.

Young Jr JL, Percy CL, Asire AJ, Berg JW, Cusano MM, Gloeckler LA, Horm JW, Lourie Jr WI, Pollack ES & Shambaugh EM (1981). Cancer incidence and mortality in the United States, 1973-77. *National Cancer Institute Monograph*, 57: 1-5, 59-137.

Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, Ferman S, Piovezan GC, Lichtvan LL, Voss SZ, Stingham ST, Callefe LG, Parise GA, Santana MH, Figueiredo BC. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2006 Aug;28(8):513-24. doi: 10.1097/01.mph.0000212965.52759.1c.