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

CECILIA FERNANDES LOREA

Avaliação dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em tumores adrenocorticais da infância: correlação com achados clínicos e biológicos

RIBEIRÃO PRETO

2021

CECILIA FERNANDES LOREA

Avaliação dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em tumores adrenocorticais da infância: correlação com achados clínicos e biológicos

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Programa: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Lorea, Cecília Fernandes

Avaliação dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em tumores adrenocorticais da infância: correlação com achados clínicos e biológicos, Ribeirão Preto, 2021.
117fl.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - Programa Saúde da Criança e do Adolescente.
Versão Original

Orientador: Scrideli, Carlos Alberto

1. Tumor adrenocortical, 2. Carcinoma suprarrenal, 3. Adrenal, 4. Crianças, 5. microRNA, 6. miR-150-5p.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cecília Fernandes Lorea

Avaliação dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em tumores adrenocorticais da infância: correlação com achados clínicos e biológicos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências junto ao Departamento de Puericultura e Pediatria.

Aprovado em _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Ao Otávio pelo apoio incondicional para realização deste trabalho, pelo amor, compreensão e incentivo a todos meus projetos.

Aos nem tão pequenos Amanda e Fábio por serem a razão da minha vida e por entenderem as ausências necessárias para realização desta tese.

Agradecimentos

Em primeiro lugar aos **pacientes** e seus familiares, que são a razão maior deste estudo. Por permitirem inclusão de seus dados.

Ao meu eterno orientador e amigo Professor Dr. **Carlos Alberto Scrideli** pelos sábios conselhos e por guiar meus passos neste e em outros projetos.

À minha família pais, irmãs e sogros por estarem comigo sempre que eu precisei, além do amor e incentivo para realização dos meus sonhos. Em especial à minha irmã Claudia que além de ajudar na revisão deste texto, me instigou com diversas discussões sobre o tema.

À Dra. Regia Caroline Peixoto Lira que tive o prazer de conhecer no início desta minha jornada, pela ajuda, ensinamentos, amizade e apoio enquanto estávamos em Ribeirão Preto.

À Dra Luciana Chain Veronez pela amizade, auxílio e incrível paciência de me repassar conhecimentos imprescindíveis para conclusão desta tese.

À Dra Rosane de Paula Queiroz por estar sempre disposta, sorrindo, distribuindo orientações e sugestões no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Oncologia e Hematologia Pediátrica – FMRP/USP.

À Vera Lúcia de Andrade Hamanaka pela amizade, paciência e por resolver minhas pendências há anos.

Ao mestre e “pai” de todos da oncologia pediátrica de Ribeirão Preto Dr. Luis Gonzaga Tone.

Aos colegas de equipe do Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Oncologia e Hematologia Pediátrica – FMRP/USP pelo agradável convívio e conhecimentos transmitidos, presencial e on-line.

À equipe do HEMOPEL pelo apoio, compreensão.

Aos colegas do ambulatório de Pediatria da Faculdade de Medicina UFPel pelo incentivo e apoio nas minhas ausências.

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo apoio financeiro concedido através do processo número: 2010/07020-9 e 2014/20341-0

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq),
pelo apoio financeiro concedido através do processo número: 471885/2013-4

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de
Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento
001

“Não vá aonde o caminho pode levar, vá
aonde não há caminho e deixe uma trilha.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

LOREA, C. F. **Avaliação dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em tumores adrenocorticais da infância: correlação com achados clínicos e biológicos.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Saúde da Criança e do Adolescente) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Tumores adrenocorticais (TAC) em crianças são neoplasias raras, frequentemente associadas a mutações do *TP53*, que em estádios avançados são comumente fatais. A cirurgia ainda é o padrão ouro para tratamento. A classificação e predição de prognóstico dos TACs pediátricos ainda são um desafio. O papel dos microRNAs (miRNA) no desenvolvimento e progressão do câncer tem sido cada vez mais estudado. O objetivo do presente estudo foi analisar e correlacionar a expressão dos miRNAs miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p com características clínicas e biológicas em TACs pediátricos. A expressão dos miRNAs foi analisada em 68 neoplasias adrenais e 10 amostras de tecido adrenal não neoplásico provenientes de crianças com idade inferior a 18 anos. Testes de Mann-Whitney e modelo de regressão de Cox foram usados para estimar a correlação entre os microRNAs e as variáveis clínicas e biológicas. As curvas de Kaplan Meir e teste de log rank foram usados para estimar a sobrevida geral em 5 anos. Valores de expressão maiores que a mediana dos tecidos não neoplásicos foram considerados hiperexpressos. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como resultados significativos. Nas amostras tumorais encontramos hipoexpressão do miR-214-3p e miR-139-3p e hiperexpressão do miR-34a-5p, miR-708-5p e miR-142-5p quando comparadas com tecido não neoplásico. O miR-214-3p teve menor expressão em tumores maiores ($> 200\text{cm}^3$, $> 100\text{g}$ e $> 200\text{g}$) em relação aos menores. Tumores com volume maior de 200cm^3 também apresentaram uma menor expressão de miR-34a-5p e miR-708-5p. Em tumores com peso maior que 200g em comparação com os menores, os miR-150-5p, miR-142-5p e miR-708-5p foram hipoexpressos. Ao analisarmos o perfil dos miRNAs em relação a classificação histopatológica de Weiss observamos uma maior expressão do miR-139-3p nos TAC classificados como malignos. Uma expressão maior do miR-150-5p foi observada nos pacientes mais jovens (< 3 anos ou < 4 anos) e naqueles que não foram a óbito em decorrência da doença. A sobrevida global (SG) para os pacientes cujos tumores tiveram expressão do miR-150-5p acima da mediana dos controles foi maior do que para o grupo com expressão abaixo

da mediana (92,9% vs 68,7%, $p= 0,028$). Ao excluirmos os pacientes classificados pelo IPACR2 e Sandrini modificado como estadiamento 1 encontramos uma diferença ainda maior em SG (81,3% vs 30%, $p=0,015$ e 80% vs 36,4%, $p= 0,042$, respectivamente) e sobrevida livre de eventos (75% vs 20%, $p=0,009$ e 73,3% vs 27,3%, $p=0,032$, respectivamente). Para avaliarmos o efeito do miR-150-5p em genes comumente associados a tumores adrenais silenciarmos esse miRNA na linhagem adrenal H295A e observamos uma menor expressão de *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNNB1*, e concomitante maior expressão de *DKK3* quando comparado com as células controle não silenciadas. Os resultados encontrados sugerem um papel importante dos miRNAs em TACs de crianças, especialmente o miR-150-5p que demonstrou potencial em auxiliar na definição dos casos de melhor e pior prognóstico.

Palavras-chave: Tumor adrenocortical Carcinoma suprarrenal. Adrenal. Crianças. microRNA. miR-150-5p.

ABSTRACT

LOREA, C. F. **Evaluation of miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p in pediatric adrenocortical tumors.** 2021. Tese (Doutorado em Ciências – Programa de Saúde da Criança e do Adolescente) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Pediatric adrenocortical tumors (ACT) are rare tumors, frequently associated with *TP53* mutations. In advanced stages pediatric ACT have high mortality rates. Surgery is still the gold standard treatment. Pediatric ACTs classification and prognosis represent a challenge. MicroRNA have been studied in regard to cancer development and progression. This study aimed to analyze the miRNA expression in pediatric ACT. MiR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p were analyzed in 68 samples of ACT and 10 sample non-neoplastic of adrenal tissue from children under the age of 18. Mann-Whitney and Cox regression were used to estimate the correlation between microRNAs and the clinical and biological variables. The Kaplan Meier curves, and log rank test were used to estimate 5-year overall survival (OS). Expression values over de median of non-neoplastic tissues were considered hyperexpressed. P-values less than 0.05 were considered statistically significant. In ACT samples we found miR-214-3p and miR-139-3p downregulated and miR-34a-5p, miR-708-5p e miR-142-5p upregulated when compared with non-neoplastic adrenal tissue. In larger tumors ($> 200\text{cm}^3$, $> 100\text{g}$ or $>200\text{g}$) miR-214-3p had lower expression in comparison to smaller tumors. In ACT with larger volumes $>200\text{ cm}^3$ miR-34a-5p and miR-708-5p were also downregulated. When tumors weighted more than 200g we detected a significant lower expression of miR-150-5p, miR-142-5p and miR-708-5p. For Weiss histopathologic classification we observed an upregulation of miR-139-3p in malignant tumors (Weiss >3). A higher expression of miR-150-5p was observed in young patients (<3 years or < 4 years) and in patients that had better prognosis. Patients with overexpressed miR-150-5p had better OS (92.9% vs 68.7%, $p=0.028$). Excluding patients classified as stage 1 of IPACR2 or modified Sandrini classifications a more significant difference in OS (81.3% vs 30%, $p=0.015$ e 80% vs 36.4%, $p= 0,042$, respectively) and EFS (75% vs 20%, $p=0.009$ e 73.3% vs 27.3%, $p=0.032$, respectively) was found. To evaluate miR-150-5p effect in commonly ACT related genes we proceed the knockdown of miR-150-5p in human adrenal NCI-H295A cells. After the knockdown we observed down regulation in *NOTCH1*, *NOTCH2* and *CTNNB1* expression and

upregulation in *DKK3* expression. Our results suggests that miRNAs are important in ACT, specially miR-150-5p that showed a potential in defining patients with better prognosis.

Keywords: Adrenocortical tumor. Adrenocortical carcinoma. Adrenal. Children. microRNA. miR-150-5p.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ilustração da anatomia das glândulas adrenais.

FIGURA 2 – Desenvolvimento das glândulas adrenais.

FIGURA 3 – Esquema da estrutura morfológica e produção de hormônios esteroides pelas diferentes camadas do córtex adrenal.

FIGURA 4 – Linha do tempo das descobertas de microRNA

FIGURA 5– Biogênese do microRNA

FIGURA 6 – Análise de sobrevida de acordo com a idade dos pacientes com TACs.

FIGURA 7 – Análise de sobrevida de acordo com sintomas de virilização, síndrome de Cushing, misto ou ausente de sintomas endócrinos.

FIGURA 8 – Sobrevida livre de eventos de acordo com classificação histopatológica de Weiss.

FIGURA 9 – Análise de sobrevida de acordo com tamanho do tumor.

FIGURA 10 – Análise de sobrevida de acordo com estadiamento.

FIGURA 11 – Expressão relativa dos miRNAs hipoexpressos em adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).

FIGURA 12 – Expressão relativa dos miRNAs hiperexpressos em adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).

FIGURA 13 – Associação da expressão dos miR-150-5p em relação com idade.

FIGURA 14 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p em relação com raça.

FIGURA 15 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-708-5p em relação ao tempo de início dos sintomas até o diagnóstico.

FIGURA 16 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-34a-5p, miR-708-5p em relação ao volume tumoral.

FIGURA 17 – Associação da expressão dos miR-214-3p em relação ao peso tumoral maior ou menor que 100g.

FIGURA 18 – Associação da expressão dos miR-150-5p, miR-214-3p, miR-142-5p, miR-708-5p em relação ao peso tumoral maior ou menor que 200g.

FIGURA 19 – Associação da expressão dos miR-139-3p em relação a classificação histológica de Weiss

FIGURA 20 – Associação da expressão dos miR-150-5p em relação ao desfecho.

FIGURA 21 – Sobrevida global Kaplan Meier realizada com o grupo total de pacientes, comparando mediana miR-150-5p.

FIGURA 22 - Sobrevida global Kaplan Meier realizada com o grupo de pacientes classificados como Weiss maior que 3 (carcinoma), comparando mediana miR-150-5p.

FIGURA 23 – Análise de sobrevida Kaplan Meier realizada com o grupo de pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini e IPACTR2, comparando mediana miR-150-5p.

FIGURA 24 – Sobrevida livre de eventos Kaplan Meier realizada apenas com o grupo de pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini modificado e IPACTR2, comparando mediana miR-150-5p.

FIGURA 25 – Ilustração das 40 vias mais enriquecidas para o miR-150-5p.

FIGURA 26 – Eficiência da transdução dos miRNAs na linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295A.

FIGURA 27 – Efeito da inibição do miR-150-5p na linhagem celular H295A mostrando diminuição da expressão dos genes *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNNB1* quando comparado com controle não silenciado (CT miR-150).

FIGURA 28 – Efeito da inibição do miR-150-5p na linhagem celular H295A mostrando aumento de expressão do genes *DKK3* quando comparado com controle não silenciado (CT miR-150).

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Estadiamentos clínicos propostos para tumores adrenocorticais em crianças.

TABELA 2. Estatísticas descritivas.

TABELA 3 – Frequência dos estadiamentos.

TABELA 4 – Análise de sobrevida livre de eventos e sobrevida global em relação as variáveis clínicas.

TABELA 5 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-214-3p.

TABELA 6 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-139-3p.

TABELA 7 – Sobrevida livre de eventos em 5 anos para o miR-708-5p.

TABELA 8 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-150-5p.

TABELA 9 – Análise univariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

TABELA 10 – Análise multivariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

TABELA 11 – Descrição dos estudos com seus respectivos dados dos casos reportados.

TABELA 12 – Comparativo dos riscos relativos descritos nesta coorte e os descritos na meta-análise de Zambatti.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico

cDNA - ácido Desoxiribonucleico complementar

CIB-UNICAMP – Centro Infantil Boldrini – Universidade Estadual de Campinas

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CO₂ – gás carbônico

CT – *Cycle Threshold*

DEPC – dietil pirocarbonato

DGCR8 - *DiGeorge syndrome critical region gene 8*

DHEA - dehidroepiandrosterona

DHEAS - sulfato de dehidroepiandrosterona

DHT – dihidrotestosterona

DKK3 – Dickkopf3

DNA - ácido Desoxiribonucleico

ENSAT - *European Network for Study of Adrenal Tumors* (Rede Européia de Estudos em Tumores Adrenais)

Exp5 - exportina-5

EGF - fator de crescimento epidermal

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FMRP/USP – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo

IPACTR - *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (Registro Internacional de Tumores Adrenocorticais Pediátricos)

LLA – leucemia linfóide aguda

LLA-B – leucemia linfóide aguda de células B

LLA-pré-B – leucemia linfóide aguda de células pré B

LLA-T – leucemia linfóide aguda de células T

LLC – leucemia linfóide crônica

LOH - perda de heterozigose

Mart1 – melanA

miR - microRNA

miRNA - microRNA

mRNA – RNA mensageiro

NCDB - *National Cancer Data Base*

PCR – reação em cadeia de polimerase

qRT-PCR - reação em cadeia de polimerase quantitativa em tempo real

RISC - *RNA induced silence complex*

RNA - Ácido Ribonucleico

RNAi - RNA de interferência

RNA pol II - RNA polimerase II

rRNA - RNA ribossomal

SBF – soro bovino fetal

SF1 - Fator Esteroidogênico 1

SG – Sobrevida global

SLE – Sobrevida livre de eventos

snoRNA - RNA nucleolar pequeno

STR – *Short Tandem Repeat*

TAC – Tumor Adrenocortical

TREP - Registro Italiano de Tumores Pediátricos Raros

tRNA - RNA de transferência

USP – Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 GLÂNDULAS ADRENAIS.....	25
1.2 TUMOR ADRENOCORTICAL PEDIÁTRICO	29
1.3 MICRORNAs (miRNAs, miRs)	34
2. JUSTIFICATIVA.....	39
3. OBJETIVOS.....	40
3.1 GERAL.....	40
3.2 ESPECÍFICO.....	40
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	41
5. MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 PACIENTES.....	42
5.2 COLETA DE AMOSTRAS E MICRODISSECÇÃO.....	43
5.3 EXTRAÇÃO DE RNA.....	43
5.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO RNA.....	43
5.5 SÍNTESE DE CDNA PARA miRNA E GENE.....	44
5.6 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAs POR qRT-PCR.....	44
5.7 SEQUENCIAMENTO PARA DETECÇÃO DA MUTAÇÃO <i>TP53</i> p.R337H.....	45
5.8 LINHAGEM CELULAR.....	45
5.9 SILENCIAMENTO DO miRNA.....	45
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
7. RESULTADOS.....	47
7.1 ASPECTOS CLÍNICOS.....	47
7.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAs EM TACs E ADRENAIS NÃO NEOPLÁSICAS	55
7.3 ASSOCIAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS miRNAs E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E BIOLÓGICAS	57
7.4 ASSOCIAÇÃO ENTRE A EXPRESSÃO DOS miRNAs COM SG E SLE	64
7.5 ANÁLISE POR MODELO DE RISCO PROPORCIONAL DE COX.....	70
7.6 ANÁLISE DE ENRIQUECIMENTO.....	72
7.7 ANÁLISE DA INIBIÇÃO DO miR-150-5p EM CÉLULAS DE LINHAGEM DE TUMOR ADRENAL H295A.....	73

8. DISCUSSÃO.....	75
8.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS.....	75
8.2 EXPRESSÃO DOS miRNAs.....	79
8.3 EXPRESSÃO DOS GENES NA LINHAGEM H295A APÓS SILENCIAMENTO DO miR-150-5p.....	82
9. CONCLUSÃO.....	86
10. REFERÊNCIAS.....	88
APÊNDICE A.....	101
APÊNDICE B.....	102
APÊNDICE C.....	107
APÊNDICE D.....	108
APÊNDICE E.....	109
APÊNDICE F.....	113
ANEXO A.....	114
ANEXO B.....	115

1. INTRODUÇÃO

1.1 Glândulas Adrenais

As primeiras descrições sobre as glândulas adrenais foram feitas por Galen no segundo século, mas foram definitivamente descritas e ilustradas somente em 1563 por Eustachio, momento no qual ainda não tinham uma função conhecida. Somente em 1855 sua importância foi reconhecida por Thomas Addison e, em 1856 Charles-Edouard Brown-Sequard demonstrou que animais não sobreviviam após adrenalectomia bilateral. As zonas corticais foram identificadas e nomeadas por Arnold em 1886. Desde esta época as adrenais têm sido alvo de diversos estudos (YATES *et al.*, 2013).

As glândulas adrenais são órgãos bilaterais simétricos com cerca de 4g e, aproximadamente, 4 cm de comprimento, 2 cm de altura e 1 cm de espessura. Estão localizadas acima do polo cranial (face posteromedial) dos rins no espaço retroperitoneal e são a fonte de dois tipos de hormônios essenciais: esteroides e catecolaminas (SALES P, 2016). Através da ação destes hormônios, as glândulas adrenais regulam processos metabólicos, imunes, neuronais, cardiovasculares e mentais em resposta a estresse exógeno e outros estímulos; além de regular o balanço de sódio, doenças críticas e inflamação sistêmica. São uma combinação de dois “órgãos” distintos em relação a desenvolvimento e morfologia combinados dentro de uma cápsula única formando a glândula adrenal (Figura 1). A parte central chamada de medula adrenal produz catecolaminas e é embriologicamente de origem neuroectodérmica (crista neural). Já a parte externa, chamada de córtex adrenal, é produtora de esteroides e desenvolve-se do mesoderma intermediário (SUN *et al.*, 2018; XING *et al.*, 2015).

Quanto à irrigação, as glândulas adrenais recebem um dos maiores suprimentos sanguíneos por grama de tecido (XING *et al.*, 2015). A irrigação arterial das adrenais origina-se de, aproximadamente, 12 ramos provenientes da aorta e das artérias frênica, renal, intercostais, entre outras. A drenagem venosa ocorre pela veia adrenal direita, que é curta e desemboca diretamente na cava, e pela veia adrenal esquerda, que é longa e desemboca na veia renal para posteriormente ir a veia cava (SALES, 2016). O sistema linfático subcapsular e medular drena para linfonodos lombares e para-aórticos (YATES *et al.*, 2013). A topografia das adrenais, com sua irrigação encontra-se ilustrada na Figura 1.

Figura 1 - Ilustração da anatomia das glândulas adrenais.

Posição anatômica das adrenais sobre os rins e sua diferença na irrigação, no lado direito a artéria e veia adrenal se originam diretamente na aorta e veia cava. Já a artéria e veia adrenal esquerda originam-se da artéria e veia renal esquerda. Corte transversal da adrenal esquerda em destaque, mostrando o córtex e a medula.

Fonte: Autoria própria, 2020.

As adrenais também são ricamente innervadas e a maioria dos plexos nervosos reside na região capsular. A maior parte de suas fibras origina-se do nervo esplâncnico maior. E este está associado aos plexos abdominais do sistema nervoso simpático autônomo e conta com contribuições parassimpáticas dos nervos vagal e frênico. Os feixes nervosos penetram o córtex geralmente em associação aos vasos sanguíneos. Assim como a vasculatura, a maioria dos nervos pós-gangliônicos terminam na medula (XING *et al.*, 2015).

A adrenal embrionária é um órgão proporcionalmente grande no bebê, correspondendo a cerca de 0,2% do peso corporal total, sendo 80% composta de células da zona fetal (XING *et al.*, 2015). Em humanos a condensação do epitélio celômico para formação da adrenal pode ser detectado com 3-4 semanas de gestação. Estas células proliferam e migram em torno da 4ª a 6ª semanas. Uma primeira coleção de células com formato fino e esférico, irá se diferenciar em um grande órgão acidófilo formando o córtex adrenal fetal (Figura 2). Um

segundo grupo de células basofílicas, menores que o primeiro, o circula e forma o córtex adrenal definitivo, que se move centripetamente e diferencia-se em zona glomerulosa e zona fasciculada. A zona fetal é composta por células grandes eosinofílicas que secretam grandes quantidades de sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), que é convertido na placenta em estrógenos contribuindo para manutenção da gestação normal (LALLI, 2010; YATES *et al.*, 2013).

Imediatamente após o nascimento, o córtex adrenal fetal sofre apoptose resultando na involução da zona fetal, e maturação das zonas glomerulosa e fasciculada (Figura 2) sob a influência da angiotensina II e hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) (LALLI, 2010; XING *et al.*, 2015). Com a apoptose do córtex fetal as glândulas suprarrenais tornam-se menores perdendo aproximadamente um terço do seu peso durante as primeiras 2 a 3 semanas de vida neonatal e somente recuperam o peso de nascimento no fim do segundo ano (MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016). Durante o desenvolvimento embrionário pequenas ilhas de células cromafins são encontradas dentro da adrenal fetal. Somente após o desaparecimento da zona fetal estas células se agrupam em torno da veia central da glândula para formar a medula. A zona reticular começa a se formar entre o córtex fetal e a medula em um processo chamado adrenarca que ocorre entre as idades de 6 a 8 anos em meninas e 7 a 9 anos em meninos. A adrenarca é caracterizada por produção e proliferação aumentada dos andrógenos adrenais (LALLI, 2010; XING *et al.*, 2015).

Figura 2 – Desenvolvimento das glândulas adrenais.

- A – 6 semanas de gestação, mostrando o primórdio mesodérmico do córtex embrionário.
 B – 7 semanas de gestação. Em azul, células da crista neural.
 C – 8 semanas de gestação. Córtex fetal e córtex permanente iniciando a encapsular a medula.
 D e E – Processo de encapsulação da medula pelo córtex.
 F – Recém-nascido. Córtex fetal e duas zonas de córtex permanente.
 G – 1 ano. Córtex fetal já muito reduzido.
 H – 4 anos. Padrão adulto das zonas corticais e a redução do volume glandular.
 Fonte: MOORE; PERSAUD; TORCHIA, 2016

O córtex adrenal controla o metabolismo dos eletrólitos e da glicose, as respostas ao estresse e o desenvolvimento sexual através da produção de diferentes classes de hormônios esteroides. Uma característica fundamental do córtex adulto são suas camadas celulares morfologicamente diferentes chamados de zona glomerulosa, zona fasciculata e zona reticular (LALLI, 2010). Cada zona tem suas características histológicas e secretam diferentes tipos de esteroides. A zona glomerulosa localiza-se abaixo da cápsula, correspondendo a 15% do córtex, e é responsável pela produção de mineralocorticoides (aldosterona) que atuam na regulação do influxo de água e sal, relacionado a balanço de eletrólitos e pressão arterial (Figura 3). A zona fasciculada encontra-se abaixo da zona glomerulosa, representando 75% do córtex adrenal. Esta zona é fonte de glicocorticoides (cortisol) que regulam por *feedback* o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, o qual está fortemente envolvido na resposta imune e no metabolismo (Figura 3). A zona reticular separa a zona fasciculada da medula adrenal, é composta por células irregulares produtoras de andrógenos e hormônios precursores (Figura 3) e corresponde a 10% do córtex adrenal (SALES, 2016; SUN *et al.*, 2018; YATES *et al.*, 2013). Já na medula são produzidos os neurotransmissores epinefrina e norepinefrina que atuam no sistema nervoso simpático promovendo resposta rápida ao estresse (SUN *et al.*, 2018).

Figura 3 – Esquema da estrutura morfológica e produção de hormônios esteroides pelas diferentes camadas do córtex adrenal.

DHEA – dehidroepiandrosterona DHEAS – sulfato de dehidroepiandrosterona DHT - di-hidrotestosterona

Fonte: Autoria própria, 2020.

1.2 Tumor adrenocortical pediátrico

Os tumores adrenais foram descritos pela primeira vez em 1865 (Anonymous, 1865). Até o ano de 1937, a mortalidade de crianças no pós-operatório de adrenalectomia era muito alta, devido a insuficiência adrenal aguda. Somente quando o corticoide começou a ser usado o prognóstico destes pacientes melhorou (HAYLES *et al.*, 1966).

Tumores adrenocorticais (TAC) pediátricos são raros, responsáveis por menos de 0,2% de todos os cânceres pediátricos. Por essa razão, há pouco conhecimento sobre sua malignidade e muitos dados são obtidos por estudos realizados em adultos (CIFTCI *et al.*, 2001; SUTTER; GRIMBERG, 2006; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; SBRAGIA *et al.*, 2005; MCATEER *et al.*, 2013; GULACK *et al.*, 2016). Estes tumores têm uma distribuição bimodal com picos na primeira (geralmente menores de 3 anos) e quarta décadas de vida. Raramente ocorre em fetos ou recém-nascidos. A incidência nos Estados Unidos é de 0,2-0,3 casos por milhão, enquanto no Brasil é cerca de 10-15 vezes maior, chegando a 3,4-4,2 casos por milhão, principalmente nos estados de São Paulo e Paraná. Afeta mais frequentemente indivíduos do

sexo feminino em uma razão de 2:1 (CIFTCI *et al.*, 2001; KIRSCHNER, 2006; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; SBRAGIA *et al.*, 2005; MCATEER *et al.*, 2013; DALL'IGNA *et al.*, 2014; BRONDANI; FRAGOSO, 2020).

Os TAC pediátricos aparecem tipicamente durante os primeiros 5 anos de vida (idade média, 3-4 anos), após esse período apresentam um novo pico menos expressivo na adolescência. Geralmente, causam distúrbios endocrinológicos e são diagnosticados 5 a 8 meses após os primeiros sinais ou sintomas. Em aproximadamente 90% dos pacientes, detecta-se virilização isolada (aumento de andrógenos) ou em associação a um aumento de cortisol. O aparecimento de síndrome de Cushing isoladamente é raro, acometendo cerca de 5% dos pacientes (TEINTURIER *et al.*, 1999; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; KIRSCHNER, 2006). Neoplasias não funcionantes são incomuns em crianças, mas podem ser observadas em adolescentes e adultos jovens. As diferenças na histopatologia dos tumores e nas manifestações clínicas que se apresentam em crianças pequenas, adolescentes e adultos sugerem uma provável diferença no local de origem das células mutadas. Nas crianças, considerando que há uma predominância de virilização, suspeita-se que as células neoplásicas tenham origem no córtex adrenal fetal. Este representa 85% do total do córtex adrenal e é responsável pela produção de andrógenos, sofrendo apoptose após nascimento. Nos tumores de adultos, supõe-se que as células neoplásicas surgiram do córtex definitivo (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; BRONDANI; FRAGOSO, 2020). Os carcinomas podem apresentar-se com doença localizada ou com metástases à distância. As metástases usualmente acometem fígado, pulmões, rins e ossos, nessa ordem (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005).

É de conhecimento que o gene *TP53* atua na supressão da tumorigênese adrenal. As mutações germinativas associadas a predisposição ao câncer que contribuem para TAC pediátrico correspondem a aproximadamente 50% dos casos, enquanto no grupo de adultos, esta taxa é de aproximadamente 10% (BRONDANI; FRAGOSO, 2020). Tanto nos pacientes norte-americanos, quanto nos brasileiros há uma associação entre as neoplasias adrenocorticais de crianças e mutações nesse gene. Entretanto, no Brasil, na região de maior incidência, foi observado que existe uma mutação prevalente nesse gene supressor de tumor localizada no éxon 10 do gene *TP53*, mais precisamente no códon 337 onde ocorre a troca de arginina por histidina (*TP53* p.R337H). Nos pacientes norte-americanos as mutações mais frequentes envolvem os éxons 2 ao 8. No entanto, a penetrância dessa mutação brasileira é baixa (FIGUEIREDO *et al.*, 2006; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; MCATEER *et al.*, 2013).

Esta variante p.R337H é encontrada tipicamente em brasileiros e o risco estimado de ocorrência de câncer antes dos 30 anos de idade é de cerca de 15 a 20% comparada com 50% relacionado as mutações clássicas. Entretanto o risco estimado de neoplasia adrenal é maior nesta variante. A neoplasia adrenal representa 8% de todos os tumores apresentados por pessoas com variante p.R337H comparado com 4% em outras mutações clássicas do *TP53* (KRATZ *et al.*, 2017; FREBOURG *et al.*, 2020). Pinto et al. descrevem que a mutação *TP53* p.R337H é encontrada em 78-97% dos pacientes da região sul e sudeste do Brasil (PINTO *et al.*, 2004; MASTELLARO *et al.*, 2018). Existem fortes indícios da existência de um efeito fundador para a variante patogênica *TP53* p.R337H (PINTO *et al.*, 2004; GARRITANO *et al.*, 2010; PASKULIN *et al.*, 2015; SEIDINGER *et al.*, 2020). Com base na estrutura dos haplótipos de *TP53*, sugere-se que a origem dessa mutação seja possivelmente portuguesa devido a um caso encontrado fora do Brasil, o qual possuiu essa mesma estrutura (PASKULIN *et al.*, 2015). A variante p.R337H do *TP53* é excepcionalmente rara fora do Brasil não sendo encontrada no registro italiano de tumores pediátricos raros (TREP) (DALL'IGNA *et al.*, 2014).

Além da variante brasileira p.R337H, demais variantes patogênicas em *TP53* e outras síndromes genéticas de predisposição ao câncer como síndrome Beckwith-Wiedemann, Lynch, neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e polipose adenomatosa familiar aumentam o risco de carcinomas adrenocorticais (RIBEIRO *et al.*, 2000; ELSE; RODRIGUEZ-GALINDO, 2016; HABRA *et al.*, 2020).

Em 2005, o *European Network for Study of Adrenal Tumors* (ENSAT) propôs a realização de exames basais nos pacientes com suspeita de TAC. Os exames para diagnóstico indicados incluem pesquisa de excesso de glicocorticoide (teste de supressão com dexametasona, cortisol livre na urina, cortisol basal, hormônio corticotrófico (ACTH) basal), pesquisa de precursores de esteroides e esteroides sexuais (DHEAS, 17-OH-progesterona, androstenediona, testosterona, metabólitos de esteroides em urina de 24 horas), pesquisa de excesso de mineralocorticoides (potássio sérico, razão aldosterona/renina) e exames de imagem (tomografia ou ressonância magnética de abdome, tomografia de tórax, cintilografia óssea) (www.ensat.org/acc.htm).

O grande desafio em TAC pediátricos é a diferenciação entre adenomas e carcinomas, já que a correlação entre características histológicas, radiológicas, clínicas e comportamento tumoral são discordantes (MCATEER *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2018). Para identificar malignidade, são analisados índices de mitoses, presença de necrose confluenta, mitoses atípicas, peso e tamanho da massa, invasão venosa e capsular, apesar de esses

parâmetros falharem em identificar aquele paciente com doença localizada que irá recair. Hough, Weiss, van Slooten e Wienecke (HOUGH *et al.*, 1979; VAN SLOOTEN *et al.*, 1985; WEISS, 1984; WIENECKE *et al.*, 2003) criaram classificações histopatológicas diferentes para separar essas neoplasias em graus de malignidade, fato que, associado a outros critérios ajuda na decisão terapêutica. Entretanto, essas classificações não podem ser usadas como padrão-ouro no diagnóstico de TAC pediátrico, pois um método pode classificar o paciente diferentemente do outro e nenhum prediz prognóstico (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; SBRAGIA *et al.*, 2005; TEINTURIER, 1999).

A classificação por estadiamento continua sendo o melhor método para definição do prognóstico (TUCCI JR *et al.*, 2005). Atualmente, temos várias propostas de estadiamento descritas e em uso na literatura (Tabela 1). A sobrevida total de 5 anos livre de doença é de 54-74% (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; GULACK *et al.*, 2016). Os dados de sobrevida do *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPACTR) baseados nessa classificação estimam que mais de 90% dos pacientes com estadio I tratados somente com cirurgia sejam sobreviventes a longo prazo (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004), enquanto os classificados como estágio IV, mesmo submetendo-os a tratamentos quimioterápicos intensos, somente 10% sobrevivem (RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005; SANDRINI *et al.*, 1997). Um estudo com 111 pacientes, realizado no período de 1998 e 2011, através do registro nacional de câncer Norte Americano (*National Cancer Data Base – NCDB*) demonstrou que a idade acima de 4 anos, a extensão da doença primária e a presença de doença metastática estão associados a um pior prognóstico (GULACK *et al.*, 2016).

Tabela 1 – Classificações por estadiamento propostos para tumores adrenocorticais em crianças.

a.	SANDRINI modificado	
	I Tumores pequenos ($<200\text{cm}^3$ ou $< 100\text{g}$) e completamente ressecados e normalização dos hormônios após a cirurgia. II Tumores grandes ($\geq 200\text{ cm}^3$ ou $\geq 100\text{g}$) ou ruptura de tumor e normalização dos hormônios após a cirurgia. III Tumores irresssecáveis ou doença residual após a cirurgia ou persistência de níveis hormonais anormais após a cirurgia. IV Doença metastática.	
b.	IPACTR	
	I Tumores completamente ressecados com margens negativas, pesando $\leq 200\text{g}$, sem metástases. II Tumores completamente ressecados com margens negativas, pesando $>200\text{g}$, sem metástases. III Tumores irresssecáveis ou doença residual (residual é definido como presença de tumor micro ou macroscópico após cirurgia). IV Doença metastática ao diagnóstico.	
c.	IPACTR2	
	I Tumores completamente ressecados, tumores pequenos ($< 100\text{g}$ e $<200\text{cm}^3$) com níveis normais de hormônios pós-operatórios. II Tumores completamente ressecados, tumores grandes ($\geq 100\text{g}$ ou $\geq 200\text{cm}^3$) com níveis normais de hormônios pós-operatórios. III Tumores irresssecáveis ou doença residual micro ou macroscópico após cirurgia, ruptura tumoral, pacientes com estadiamento I e II que não normalizaram os níveis hormonais pós cirurgia, pacientes com linfonodos retroperitoneais. IV Metástases a distância.	
d.	ENSAT	
	I T1, N0, M0 II T2, N0, M0 III T1-T2, N1, M0 T3-T4, N0-1, M0 IV T1-4, N0-1, M1	Tumores $\leq 5\text{ cm}$ Tumores $>5\text{cm}$ Envolvimento linfonodal e ou infiltração dos tecidos vizinhos e/ou trombo tumoral em veia cava e/ou veia renal Metástase à distância

a. Estadiamento descrito no artigo RODRIGUEZ-GALINDO *et al.*, 2005, modificado do artigo SANDRINI *et al.*, 1997

b. Estadiamento proposto pelo *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry* (IPACTR) (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004)

c. Estadiamento proposto pelo *International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry 2* (IPACTR2) (RIBEIRO *et al.*, 2012).

d. Estadiamento proposto pelo *European Network for Study of Adrenal Tumors* (ENSAT) (BERRUTI *et al.*, 2012)

Atualmente, a excisão cirúrgica parece ainda representar o padrão ouro de tratamento (BRONDANI; FRAGOSO, 2020). Em estádios avançados pode ser utilizada a quimioterapia, principalmente com as drogas cisplatina, etoposídeo, doxorubicina e mitotano. (DALL'IGNA *et al.*, 2014). O estudo *First International Randomized trial in locally advanced and metastatic adrenocortical carcinoma* (FIRM-ACT) avaliou a combinação de etoposídeo-cisplatina-doxorubicina versus mitotano-streptozotocina e não encontrou diferenças na sobrevida global. (FASSNACHT *et al.*, 2012). A utilização da radioterapia adjuvante pode reduzir a recorrência local, porém tem se mostrado inefetiva em termos de sobrevida global (FASSNACHT *et al.*, 2006; SABOLCH *et al.*, 2011; HABRA *et al.*, 2013). Como muitas das crianças com TAC possuem uma variante germinativa patogênica *TP53*, que predispõe a cânceres em geral, a radiação pode aumentar a incidência de segunda neoplasia (BRONDANI; FRAGOSO, 2020). Apesar dos tratamentos com associação de drogas e radioterapia a sobrevida em 5 anos permanece entre 30-90% (GUPTA *et al.*, 2018). Em busca da melhora da sobrevida para estes pacientes novas terapias estão sendo desenvolvidas e testadas. A necessidade de individualizar os tumores através de suas características moleculares têm se tornado mais evidente.

1.3 MicroRNAs (miRNAs, miRs)

MiRNAs são pequenos RNAs endógenos expressos em seres vivos desde plantas a animais. Estes miRNAs contêm em média 19-29 nucleotídeos e, ao invés de codificar proteínas, interagem com o RNA mensageiro (mRNA) em uma sequência específica regulando assim a expressão de genes em um nível pós-transcricional. Desta forma, os miRNAs são sequências que modulam outros genes codificadores de proteínas (PRODROMALI *et al.*, 2015; CHERRADI, 2016; YING *et al.*, 2018).

O primeiro miRNA foi descoberto em 1993 pelo laboratório Ruvkun e Ambros, quando estudavam o regulador de desenvolvimento *lin-4* no nematódeo *Caenorhabditis elegans* (Figura 4). Originalmente, acreditava-se que fosse um gene codificador de proteína convencional, mas descobriram que *lin-4* não codificava proteína, mas um RNA regulatório de 22 nucleotídeos. Posteriormente, um segundo miRNA foi descoberto o *let-7* que, por ser conservado através de vários organismos, incluindo humanos, abriu um novo panorama de estudos fora da comunidade de nematódeos (HAMMOND, 2015; VISHNOI; RANI, 2017). Após estas descobertas vários grupos iniciaram estudos com miRNA, mostrando sua associação

com câncer e a possibilidade de serem utilizados como fatores prognósticos e de classificação. A Figura 4 ilustra a cronologia das descobertas históricas dos miRNAs.

Figura 4 – Linha do tempo das descobertas dos miRNAs.

1. LEE *et al.*, 1993

4. CALIN *et al.*, 2004.

7. CHEN *et al.*, 2008; MITCHELL *et al.*, 2008.

9. DOGHMAN *et al.*, 2010

2. REINHART *et al.*, 2000

5. LU *et al.*, 2005; HE *et al.*, 2005.

10. YOUSSEF *et al.*, 2011.

3. CALIN *et al.*, 2002.

6. MA *et al.*, 2007.

8. SAITO *et al.*, 2009.

Fonte: Autoria própria, 2020.

A biogênese dos miRNAs em humanos segue um processo de dois passos com evento de clivagem nuclear e citoplasmática, ilustrados na figura 5. No núcleo o miRNA é transcrito pela RNA polimerase II (RNA pol II) gerando um transcrito longo contendo cap5 e uma cauda poli (A) chamado de pri-miRNA. Há uma preferência para a RNA pol II na transcrição dos pri-miRNA. Uma exceção ocorre na transcrição do miR-142 em que a RNA pol III é usada. A regulação transcricional dos miRNAs eventualmente segue um *feedback loop* onde a regulação positiva ou negativa do miRNA hiporregula ou amplifica sua própria expressão. A clivagem nuclear do pri-miRNA é realizada pela Drosha RNase III endonuclease com o cofator DGCR8 (*DiGeorge syndrome critical region gene 8*) gerando o pré-miRNA com cerca de 70 nucleotídeos. Posteriormente, o pré-miRNA é transportado ao citoplasma pela exportina-5 (Exp5). A maturação do pré-miRNA é feita pela RNase III endonuclease Dicer gerando um miRNA de fita dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos que é então incorporado a um complexo multimérico denominado RISC (*RNA-induced silence complex*) que usa as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-

alvo (RICARTE; KIMURA, 2006; VISHNOI e RANI, 2017).

Desde a descoberta do *let-7*, muitos outros miRNAs foram descobertos em diversos organismos, e hoje estão descritos 38.589 miRNAs no genoma humano (dados do miRBase, 11/01/2021, release 22.1: October 2018). Como cada miRNA é predito para regular centenas de genes alvos, os miRNAs possuem um papel crítico no controle da expressão gênica. É estimado que, aproximadamente, 3% do genoma humano seja de miRNAs e que mais de 60% dos genes que codificam proteínas são regulados por eles. Além de cada miRNA poder regular a expressão de diferentes genes, um mRNA pode ser alvo de vários miRNAs. Expressões alteradas de miRNAs estão associadas a diversas patologias, incluindo câncer (PRODROMALI *et al.*, 2015; CHERRADI, 2016).

Figura 5– Biogênese dos microRNAs.

No núcleo o miRNA é transcrito pela RNA pol II gerando pri-miRNA. A clivagem nuclear do pri-miRNA é realizada pela Drosha RNase III endonuclease e o cofator DGCR8 gerando o pré-miRNA que é transportado ao citoplasma pela Exp5. A maturação do pré-miRNA é feita pela RNase III endonuclease Dicer gerando um miRNA que é incorporado ao RISC que usa as proteínas Argonautas como principais componentes. Apenas uma das fitas do duplex de miRNA permanece no complexo RISC para controlar a expressão pós-transcricional de genes-alvo (RICARTE; KIMURA, 2006; VISHNOI; RANI, 2017).

Fonte: Autoria própria, 2020.

As causas da desregulação dos miRNA em câncer não estão bem elucidadas, porém três hipóteses são sugeridas:

- Metade dos miRNAs conhecidos estão localizados em regiões de instabilidade cromossômica associada ao câncer, incluindo regiões de perda de heterozigose (LOH), regiões de amplificação e sítios frágeis;
- Regulação epigenética da expressão dos miRNAs (Hipometilação de DNA, hipermetilação de ilha CpG e perda de modificação de histonas);
- Ocorrência de anormalidades nos genes que processam os miRNAs (CHERRADI, 2016).

Como os miRNAs afetam a expressão de muitos genes e assim alteram a oncogênese, eles representam um alvo terapêutico interessante. Devido a raridade do câncer adrenocortical o entendimento do papel dos miRNAs em sua patogênese é ainda muito limitado. Enquanto algumas neoplasias mais comuns contam com centenas de publicações envolvendo miRNAs, os estudos em TAC publicados são poucos e a maioria deles usa como alvo os TAC na faixa adulta. Assim, os genes alvos validados para miRNAs desregulados em TAC, principalmente na faixa etária pediátrica, são muito escassos.

Artigos estudando miRNAs e tumores adrenocorticais foram publicados pela primeira vez em 2009 por Tömböl *et al.* que estudou 36 tecidos adrenais por bioinformática molecular integrativa descrevendo miRNAs, os alvos tecido-específico e análise das vias potencialmente patogênicas envolvidas na tumorigenese adrenocortical (TÖMBÖL *et al.*, 2009). Em 2010 Doghman *et al.* investigou expressão de mirRNAs em 25 TAC pediátricos (DOGHMAN *et al.*, 2010). Atualmente encontram-se publicados aproximadamente 50 artigos sobre expressão de miRNAs em TAC, sendo que apenas a publicação de Doghman é exclusivamente em pacientes pediátricos.

No presente trabalho estudamos os miR-150-5p, miR-214-3p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p selecionados com base em análises por *array* realizadas previamente pelo nosso grupo de pesquisa (FEDATTO, 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Atualmente, não há métodos seguros que diferenciem TAC benignos e malignos e que predigam prognóstico em crianças, representando um grande desafio a oncologistas, patologistas e profissionais de saúde que lidam com essa patologia, uma vez que essa limitação torna difícil a decisão terapêutica e a informação prognóstica.

Em geral, para tumores benignos, a realização de somente ressecção cirúrgica com margens é curativa e, em tumores malignos, além da ressecção, é necessária a quimioterapia agressiva, muitas vezes sem sucesso.

Nesse contexto, estudos têm buscado marcadores moleculares que se relacionem com prognóstico, principalmente nos casos de estadiamento intermediário. Existem diversos trabalhos associando miRNAs a câncer, alguns sugerindo sua importância como biomarcadores de prognóstico e alvos terapêuticos. A ausência de uma classificação com eficácia satisfatória em predição prognóstica nos TAC, principalmente infantis, motiva a busca de miRNAs como possíveis candidatos a biomarcadores nesta condição.

3. OBJETIVO

3.1 Geral

- Analisar o perfil de expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em amostras dos pacientes com TAC e sua associação entre os níveis de expressão encontrados nas amostras tumorais e os parâmetros clínicos e biológicos.

3.2 Específico

- Caracterizar clinicamente os casos de TAC da nossa coorte;
- Comparar o perfil de expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p entre amostras tumorais e amostras não neoplásicas;
- Associar os níveis de expressão dos miRNAs com as características clínicas e biológicas de TAC;
- Investigar a expressão de genes regulados pelo miR-150-5p após silenciamento deste em linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295A.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Pacientes

Foram revisados os registros de admissão de pacientes com diagnóstico de tumor adrenocortical e idade menor que 18 anos em dois centros de atendimento especializado no estado de SP nas cidades de Ribeirão Preto e Campinas. No Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) foram admitidos 44 pacientes preenchendo esses critérios no período de abril de 1991 a julho de 2017 e 35 pacientes foram identificados nos registros do Centro Infantil Boldrini (CIB) entre junho de 1999 a agosto de 2009, totalizando 79 pacientes (Apêndice A). Destes 79 indivíduos identificados, havia 68 amostras biológicas viáveis armazenadas para análise.

Através de dados de prontuário identificamos investigação clínica e hormonal, com realização prévia de testes bioquímicos, tomografia abdominal computadorizada e/ou imagem por ressonância magnética para definição de diagnóstico, tratamento e estadiamento. Além de tomografia computadorizada do tórax e cintilografia óssea para detecção de metástases.

Para a realização da expressão dos miRNAs foram incluídas amostras de neoplasia adrenal viáveis para análise após microdissecção, previamente coletadas e armazenadas, provenientes de pacientes sem tratamento prévio com diagnóstico de neoplasia adrenal. As amostras de glândulas adrenais sem neoplasia foram obtidas de tecido saudável de crianças assistidas pelo CIB (Apêndice B). As amostras foram obtidas decorrente do tratamento da doença de base, tumor de Wilms, antes de qualquer tratamento. A possível invasão do tumor na glândula adrenal foi excluída por meio de microscopia convencional. Foi realizado microdissecção de todas as amostras para garantir retirada de material necrótico ou não viável para estudo.

As amostras estavam armazenadas nos biorrepositórios localizados no HC-FMRP-USP e no CIB, período de entrada das amostras foi de abril de 1991 a julho de 2017. A participação voluntária atestada em termo de consentimento e aprovação do comitê de ética, sob os números 9374/2003 e 1.75-050809, respectivamente. Aprovação para realização dos estudos de miRNA sob número 4643/2010 (Anexo A).

5.2 Coleta de amostras e microdissecção

As amostras de adrenal foram coletadas em criotubo na ressecção cirúrgica, sendo imediatamente colocadas em nitrogênio líquido. Antes da amostra tumoral ser processada, foi realizado microdissecção no Departamento de Patologia da FMRP-USP para retirada de tecido normal e necrótico garantindo, dessa forma, que o material estudado fosse somente tumor viável. As amostras de adrenais não neoplásicas também passaram por microdissecção para garantir que o material estudado eram células de córtex adrenal histologicamente normais.

5.3 Extração de RNA

O RNA total foi isolado dos tecidos microdissecados macerados (sistema livre de RNase) e linhagens celulares com 80% de confluência utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA; Cat#. 15596-026) e TRIzol®LS Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA; Cat# 10296-010), respectivamente. Para as amostras de TACs mais antigas, o RNA estocado foi extraído pelo kit comercial RNA/DNA/Protein Purification Kit (Norgen Biotek Corporation, ON, Canadá; Cat# 24000), cujo princípio utiliza coluna de afinidade. As amostras foram processadas segundo as especificações dos fabricantes dos reagentes (Anexo B).

5.4 Avaliação da qualidade do RNA

A concentração e pureza do RNA total foi avaliada pelo aparelho NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Scientific, DE, EUA). Para o RNA puro, a razão A (absorbância) A260/A280 deve ser 2,0, embora maior que 1,8 é considerada aceitável. Um outro indicador de pureza é a relação A260/A230, que deve ser cerca de 2,2. Uma razão A260/A230 inferior a 1,8 indica níveis significativos de contaminantes orgânicos, tais como hidratos de carbono, peptídeos, fenol e TRIzol, que absorvem luz a 230 nm.

5.5 Síntese de cDNA para miRNA e gene

O RNA total (100 ng) foi reversamente transcrito com os reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA, #Cat. 4368814) padronizado de acordo com as especificações do fabricante e protocolos do Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Oncologia e Hematologia Pediátrica FMRP/USP (Anexo B).

5.6 Validação da expressão dos miRNAs por qRT-PCR

O nível de expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p nas amostras e a expressão dos genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *IGF1R*, *TP53*, *GSK3B*, *AXIN2*, *VEGF*, *CTNNB1*, *DKK3*, *SMAD3*, *SMAD7*, *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFBRI*, *TGFBRI2* e *MYCC* na linhagem silenciada para o miR-150-5p foram quantificados através da técnica de transcrição reversa seguida pela reação quantitativa em cadeia da polimerase em tempo real (qRT-PCR). Todas as reações foram realizadas no aparelho Quant Studio 12K (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sondas TaqMan® dos miRNAs e genes estudados bem como dos controles endógenos foram adquiridas pelo sistema *on-demand* da Applied Biosystems (Apêndice C).

Para a expressão do miRNA, o volume final para cada reação foi de 10µL, sendo 4,5µL da amostra investigada (diluída 1/10), 5µL de Universal PCR Master Mix (GoTaq® Probe qPCR Master Mix, Promega) e 0,5µL de cada sonda utilizada. Para a expressão gênica, o volume final para cada reação foi de 12µL, sendo 5,4µL da amostra investigada (diluída 1/25), 6µL de Universal PCR Master Mix e 0,6µL de cada sonda utilizada. Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$). Este estudo utilizou o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do miRNA e/ou gene alvo em relação a uma amostra referência (a média dos CTs das amostras não neoplásicas). Como controle endógeno da expressão de miRNA foi utilizado a média geométrica da expressão dos pequenos RNAs RNU44 e RNU48 obtidas para cada amostra. Para os genes foi utilizado o *GUSB* como controle endógeno. A quantificação do miRNA e/ou gene alvo normalizado com os genes endógenos e em relação ao calibrador foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta C_t}$, sendo C_t o ciclo em que o nível de fluorescência alcança um limiar pré-estabelecido (*threshold*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

5.7 Sequenciamento para detecção da mutação *TP53* p.R337H

Utilizando o DNA das amostras realizamos o sequenciamento do éxon 10 do gene *TP53* para identificação da mutação p.R337H. De acordo com as instruções do fabricante, as amostras foram purificadas com Kit *Wizard PCR Preps DNA Purification Sysytem*[®] (Promega, Madison, WI) e sequenciadas por PCR assimétrico usando o *ABI-Prism*[®] *BigDye*[™] *Terminator Cycle Sequenciag Ready Reaction Kit* em um sequenciador *ABI Prism 377 DNA sequencer Apparatus* (Perkin-Elmer Corporation), foram usados os primers 5'- CTG AGG CAC AAG AAT CAC -3' (senso) e 5'- TCC TAT GGC TTT CCA ACC -3' (antisenso) (SANDRINI et al., 2005). Os cromatogramas e sequências foram analisados com os *softwares* *ABI Sequence Analysis* v.3.3 e *Chromas* v.2.3.3 (Technelysium Pty Ltd/www.techenlysium.com.au, Queensland, Australia), respectivamente.

5.8 Linhagem celular

Foi utilizada a linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295A, cuja autenticidade foi confirmada por *Short Tandem Repeat* (STR), a qual foi cultivada em meio RPMI-1640, suplementado com 2% de SBF (Soro Bovino Fetal), 1% ITS (BD Biosciences, Bedford, MA, USA), 100µ/mL penicilina e 100µg/mL estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

5.9 Silenciamento do miRNA

Silenciamento do miR-150-5p foi realizado na linhagem NCI-H295A através de transdução com vetor lentiviral específico de acordo com recomendações do fabricante (MISSION Lenti microRNA Inhibitor HLTUD0242, hsa-miR-150-5p, Sigma-Aldrich St. Louis, Missouri, EUA). Um vetor controle negativo foi também foi transduzido na mesma linhagem para fins de comparação (MISSION Lenti miRNA Inhibitor HLTUD001C, Negative Control 1, Sigma-Aldrich St.Louis, Missouri, EUA). Após transdução, as células foram tratadas com antibiótico Puromicina para selecionar as células, cuja transdução ocorreu de maneira eficiente. Após seleção, o silenciamento do miR-150-5p foi confirmado por qRT-PCR.

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos dados foi realizada com auxílio do programa SPSS 20.0 for Windows (SPSS, Chicago, IL, USA) considerando como resultados significativos valores de $p < 0,05$. Para a análise da comparação da expressão gênica nas diferentes amostras estudadas e as características clínicas e biológicas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. A sobrevida global (SG) foi definida como o período entre a data do diagnóstico (data em que foi realizada cirurgia diagnóstica) até a data do óbito ou do último retorno, e a sobrevida livre de eventos (SLE) foi caracterizada como tempo entre a data do diagnóstico e a data do evento (recidiva) e ou óbito. Ambas foram analisadas utilizando curvas de Kaplan-Meier e as curvas foram comparadas pelo teste de log-rank. O *fold change* (FC) foi dado pela razão entre a mediana de expressão dos tumores e a mediana de expressão dos controles. Para avaliar risco relativo e intervalo de confiança de 95% foi utilizado o modelo de Cox e para determinação da independência dos fatores prognósticos encontrados foi utilizada a análise multivariada por modelo de regressão de Cox.

7. RESULTADOS

7.1 Aspectos clínicos

Foram avaliados os dados clínicos de prontuário de 79 pacientes identificados com diagnóstico de TAC e idade inferior a 18 anos (Apêndice B), sendo que destes 20 eram do sexo masculino (25,3%) e 59 do sexo feminino (74,7%) em uma relação feminino:masculino de 2,95:1. A idade ao diagnóstico (data da primeira cirurgia) variou entre 5 e 187 meses (15,6 anos), com uma mediana de 22 meses (1 ano e 10 meses) e média de 40,7 meses (3 anos e 4 meses), sendo que 75,9% dos pacientes tinham idade inferior a quatro anos. O tempo entre início dos sintomas até a cirurgia variou de 0 a 48 meses (mediana de 5 meses e uma média de 7 meses). Não houve diferença quanto a lateralidade (38 adrenais esquerdas vs 40 direitas). A ressecção cirúrgica foi realizada por videolaparoscopia em apenas cinco pacientes, enquanto os demais foram submetidos a procedimentos abertos. Virilização isolada foi encontrada em 64,1% dos indivíduos (50/78), 3 (3,8%) apresentaram Síndrome de Cushing, 21 (26,9%) foram considerados tumores mistos, e quatro (5,1%) não apresentavam sintomas endócrinos ao diagnóstico. A variante p.R337H estava presente em 85,7% (66/77) dos pacientes. Dos 11 negativos para a variante p.R337H, um paciente tinha diagnóstico de síndrome de Beckwith-Wiedemann, síndrome genética que predispõe a ocorrência de tumores embrionários e é associada a tumores adrenal, e outro paciente tinha outra variante patogênica em *TP53*.

O volume tumoral variou de 0,23 cm³ a 1725,9 cm³ (média de 149,85 cm³ e mediana 39,85 cm³) e o peso tumoral variou de 3,3g a 2350g (média de 165,14g e mediana 54g), sendo que 63/78 (80,8%) tinham volume menor que 200 cm³ e 51/76 (67,1%) tinham peso inferior a 100g, 60/76 (78,9%) inferior a 200g e 68/76 (89,5%) inferior a 400g.

Tabela 2. Estatísticas descritivas.

Variável	Frequência	Mínimo	Máximo	Mediana	Média
Idade (n=79)		5 meses	187 meses (15 anos e 7 meses)	22 meses (1 ano e 10 meses)	40,7 meses (3 anos e 4 meses)
Sexo (n=79)					
Feminino	59 (74,7%)				
Masculino	20 (25,3%)				
Cor (n=79)					
Branco	68 (83,8%)				
Outros	11 (16,2%)				
Tempo de Sintomas (n=70)*		0 meses	48 meses	5 meses	7 meses
Sintomas (n=78)**					
Virilização	50 (64,1%)				
Cushing	3 (3,9%)				
Misto	21 (26,9%)				
Ausente	4 (5,1%)				
Volume (n=78)&		0,23 cm ³	1725,9 cm ³	39,85 cm ³	149,85 cm ³
Peso (n=76)&&		3,3g	2350g	54g	165,14g
p.R337H (n=77)\$					
Presente	66 (85,7%)				
Ausente	11 (14,3%)				

* Não havia registro de tempo de sintomas em 9/79 pacientes

** Não havia registro classificação dos sintomas em 1/79 pacientes

& Não havia registro de volume no anátomo patológico em 1/79 tumores

&& Não havia registro de peso no anátomo patológico em 3/79 tumores

\$ Não foi possível pesquisar a variante patológica p.R337H em 2/79 tumores

Os tumores foram classificados como Weiss maior que três critérios (maligno) ou menor que três dos nove critérios estabelecidos (benigno), e estadiamento segundo Sandrini modificado e IPACTR2 (MICHALKIEWICZ et al., 2004; RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005, WEISS, 1984), conforme a tabela abaixo.

Tabela 3. Frequência dos estadiamentos.

Estadiamento	1	2	3	4
Weiss**	<3	13/73 (16,5%)	>3	60/73 (82,2%)
Sandrini	48/79 (60,8%)	20/79 (25,3%)	3/79 (3,8%)	8/79 (10,1%)
IPACTR2	48/79 (60,8%)	17/79 (21,5%)	6/79 (7,6%)	8/79 (10,1%)

*** Não foi possível classificar por Weiss em 6/79 tumores

Dos 79 prontuários revisados, oito pacientes (10,1%) apresentavam metástases ao diagnóstico. Destes, apenas dois não foram a óbito em decorrência da doença, sendo que um deles recidivou dez meses após a primeira cirurgia. O tempo de seguimento dos pacientes em

remissão clínica variou de 7 a 288 meses com média 127,5 meses (10 anos e 7 meses) e mediana de 119 meses (9 anos e 11 meses). Recidiva ocorreu em 16/79 pacientes (20,3%) e óbito ocorreu em 14/79 pacientes (17,7%). Dos 14 óbitos, de acordo com a classificação de Sandrini modificada, três eram pacientes com classificação I, cinco com classificação II e seis com classificação IV. Destes, apenas um paciente (com estadio Sandrini II) teve óbito decorrente de complicações pós-operatórias, os demais foram em decorrência da evolução da neoplasia. Ocorreu recidiva antes do óbito em todos os pacientes, exceto 2 pacientes estadio Sandrini IV que permaneceram com doença ativa desde o diagnóstico e no paciente que foi a óbito no pós-operatório. O tempo entre a cirurgia inicial e a recidiva variou entre 3 e 53 meses com mediana de 7 meses e média de 12 meses. Dos pacientes que foram a óbito o tempo de sobrevida variou de 7 a 23 meses com mediana de 6,5 meses e média de 7,7 meses.

A sobrevida global em 5 anos no grupo de pacientes analisados foi de 82% e a sobrevida livre de eventos foi de 76%. Quando colocamos como pontos de corte em crianças menores de três anos e menores de quatro anos, estes parâmetros mostram-se associados a melhor sobrevida (Tabela 4 e Figura 6). Dados como sexo, cor, tempo de sintomas até o diagnóstico, ou presença da variante p.R337H não foram associados a diferença no tempo de sobrevida nesta coorte (Tabela 4). Pacientes com sintomas virilizantes tiveram melhor prognóstico do que os pacientes com Cushing para SLE e SG (Tabela 4 e Figura 7). A classificação histológica de Weiss benigno ou maligno (3 ou mais critérios) mostrou uma pior SLE para os classificados como malignos, mas não obteve diferença estatística para SG (Tabela 3 e Figura 8). Quanto ao tamanho do tumor, a estratificação dos pacientes entre aqueles com tumores maiores ou menores que 200cm³, 100g, 200g ou 400g todos foram estatisticamente significativos para SLE e SG, sendo os tumores menores associados com melhor prognóstico (Tabela 3 e Figura 9). Os estadiamentos Sandrini modificado e IPACTR2 demonstraram que estadios 1 possuem melhor prognóstico que os demais seguido do estadiamento 2 e 4, os pacientes classificados como estadiamento 3 tiveram SLE e SG de 100% que não era o esperado (Tabela 4 e Figura 10).

Tabela 4 – Análise de sobrevida livre de eventos e sobrevida global em relação as variáveis clínicas.

Variáveis Clínicas	Nº de casos (%)	SLE	Valor <i>p</i>	SG	Valor <i>p</i> [#]
Idade (n=79)			0,002		0,002
≤ 3 anos	56 (70,9%)	85,6%		91%	
> 3 anos	23 (29,1%)	52,2%		60,9%	
Idade (n=79)			0,001		0,000
≤ 4 anos	60 (76%)	84,8%		91,6%	
> 4 anos	19 (24%)	47,4%		52,6%	
Sexo (n=79)			0,218		0,736
Feminino	59 (74,7%)	79,3%		82,6%	
Masculino	20 (25,3%)	65%		80%	
Cor (n=79)			0,613		0,438
Branco	68 (83,8%)	74,7%		80,5%	
Outros	11 (16,2%)	81,8%		90,9%	
Tempo de Sintomas (n=70)*			0,944		0,215
< 4 meses	27 (38,6%)	74,1%		74,1%	
≥ 4 meses	43 (61,4%)	73,9%		85,7%	
Sintomas (n=78)**			0,016		0,000
Virilização	50 (64,1%)	85,8%		91,7%	
Cushing	3 (3,9%)	33,3%		33,3%	
Misto	21 (26,9%)	61,9%		66,7%	
Ausente	4 (5,1%)	75%		100%	
Weiss (n=73)***			0,032		0,081
<3 critérios	13 (17,8%)	100%		100%	
≥3 critérios	60 (82,2%)	69,7%		78,2%	
Volume (n=78)&			0,003		0,001
<200 cm ³	63 (80,8%)	82,4%		88,6%	
≥200 cm ³	15 (19,2%)	45,7%		53,3%	
Peso (n=76)&&			0,000		0,000
<100g	51 (67,1%)	88%		96%	
≥100g	25 (32,9%)	51,7%		56%	
Peso (n=76)&&			0,000		0,000
≤200g	60 (78,9%)	84,8%		91,5%	
>200g	16 (21,1%)	42,9%		50%	
Peso (n=76)&&			0,004		0,003
≤400g	68 (89,5%)	80,7%		86,6%	
>400g	8 (10,5%)	33,3%		50%	
p.R337H (n=77)\$			0,187		0,103
Presente	66 (85,7%)	72,5%		78,4%	
Ausente	11 (14,3%)	90,9%		100%	
Sandrini modificado (n=79)			0,000		0,000
1	46 (58,2%)	89,1%		93,3%	
2	22 (27,9%)	67%		76,8%	
3	3 (3,8%)	100%		100%	
4	8 (10,1%)	12,5%		25%	
IPACTR2 (n=79)			0,000		0,000
1	46 (58,2%)	89,1%		93,3%	
2	19 (24,1%)	61,5%		73%	
3	6 (7,6%)	100%		100%	
4	8 (10,1%)	12,5%		25%	

Log-Rank

* Não havia registro de tempo de sintomas em 9/79 pacientes

** Não havia registro classificação dos de sintomas em 1/79 pacientes

*** Não foi possível classificar por Weiss em 6/79 tumores

& Não havia registro de volume no anátomo patológico em 1/79 tumores

&& Não havia registros de peso no anátomo patológico em 3/79 tumores

\$ Não foi possível pesquisar a variante patológica p.R337H em 2/79 tumores

Figura 6 – Análise de sobrevida de acordo com a idade dos pacientes com TACs.

- Sobrevida livre de eventos para pacientes com idade maior ou menor que 3 anos.
- Sobrevida global para pacientes com idade maior ou menor que 3 anos.
- Sobrevida livre de eventos para pacientes com idade maior ou menor que 4 anos.
- Sobrevida global para pacientes com idade maior ou menor que 4 anos.

Figura 7 – Análise de sobrevida de acordo com sintomas de virilização, síndrome de Cushing, misto ou ausente de sintomas endócrinos.

- a. Sobrevida livre de eventos de acordo com sintomas de virilização, síndrome de Cushing, misto ou ausente de sintomas endócrinos.
- b. Sobrevida global de acordo com sintomas de virilização, síndrome de Cushing, misto ou ausente de sintomas endócrinos.

Figura 8 – Sobrevida livre de eventos de acordo com classificação histopatológica de Weiss.

Sobrevida livre de eventos de acordo com classificação histopatológica de Weiss separando em menor ou maior que 3 critérios.

Figura 9 – Análise de sobrevida de acordo com tamanho do tumor.

g.

h.

- Sobrevida livre de eventos para tumores maior ou menor que 200cm³.
- Sobrevida global para tumores maior ou menor que 200cm³.
- Sobrevida livre de eventos para tumores maior ou menor que 100g.
- Sobrevida global para tumores maior ou menor que 100g.
- Sobrevida livre de eventos para tumores maior ou menor que 200g.
- Sobrevida global para tumores maior ou menor que 200g.
- Sobrevida livre de eventos para tumores maior ou menor que 400g.
- Sobrevida global para tumores maior ou menor que 400g.

Figura 10 – Análise de sobrevida de acordo com estadiamento.

a.

b.

c.

d.

- Sobrevida livre de eventos de acordo com estadiamento Sandrini modificado.

- b. Sobrevida global de acordo com estadiamento Sandrini modificado.
- c. Sobrevida livre de eventos de acordo com estadiamento IPACR2.
- d. Sobrevida global de acordo com estadiamento IPACR2.

7.2 Avaliação da expressão dos miRNAs em TACs e adrenais não neoplásicas

Para a avaliação da expressão dos miRNAs foram usadas 68 amostras tumorais e 10 amostras de adrenais não neoplásicas como descrito na subseção 5.1 - Pacientes. Com exceção do miR-150-5p, encontramos diferença estatística entre os níveis de expressão dos demais miRNAs estudados quando comparados tumores e adrenais não neoplásicas (controle) (Apêndice C). Foi evidenciada uma hipoeexpressão do miR-214-3p e miR-139-3p (Figura 11) e hiperexpressão de miR-34a-5p, miR-708-5p e miR-142-5p (Figura 12) nas amostras tumorais quando comparadas com o controle não neoplásico.

Figura 11 – Expressão relativa dos miRNAs hipoeexpressos em adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).

Figura 12 – Expressão relativa dos miRNAs hiperexpressos em adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).

* não foi possível calcular o *fold change*, a mediana de expressão do controle foi 0.

- a. Expressão relativa do miR-34a-5p (log-2) adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).
 b. Expressão relativa do miR-708-5p (log-2) adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).
 c. Expressão relativa do miR-142-5p (log-2) adrenais neoplásicas versus controle (adrenais não neoplásicas).

7.3 Associação da expressão dos miRNAs e características clínicas e biológicas

Analizamos por Mann-Whitney a associação entre a expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p e as características clínicas e biológicas dos participantes (Apêndice E). Considerando a presença da variante *TP53* p.R337H, estadiamento Sandrini, recidiva, sexo, diâmetro maior ou menor 5 cm e presença de metástases não encontramos diferença na expressão destes miRNAs.

Em relação a idade, foi encontrada maior expressão do miR-150-5p em pacientes menores que 3 (Figura 13a) ou 4 de idade (Figura 13b) quando comparados com os de maior idade ($p=0,027$ e $p=0,035$, respectivamente). Quando analisado raça, encontramos

hipoexpressão relativa dos miR-150-5p (figura 14a), miR-214-3p (Figura 14b) e miR-142-5p (Figura 14c) em pacientes brancos em relação aos demais ($p=0,037$; $p=0,035$ e $p=0,23$; respectivamente).

Quanto ao tempo de início de sintoma até o diagnóstico (data da cirurgia) encontramos os miR-214-3p (Figura 15a) e miR-708-5p (Figura 15b) hiperexpressos nos pacientes que referiam sintomas há mais de 4 meses quando comparados com os que levaram menos tempo para o diagnóstico ($p=0,003$ e $p=0,02$, respectivamente).

Tumores $>200\text{cm}^3$ apresentaram menor expressão do miR-214-3p (Figura 16a), miR-34a-5p (Figura 16b) e miR-708-5p (Figura 16c) ($p=0,027$; $p=0,041$; $p=0,016$; respectivamente) em relação a tumores menores. Além disso, tumores com peso $>100\text{g}$ (Figura 17) exibiram menor expressão do miR-214-3p ($p=0,022$). Utilizando o ponto de corte $>200\text{g}$, observamos menor expressão de miR-150-5p (Figura 18a), miR-214-3p (Figura 18b), miR-142-5p (Figura 18c) e miR-708-5p (Figura 18d) ($p=0,035$; $p=0,01$; $p=0,028$; $p=0,016$; respectivamente) em comparação com os tumores pesando mais que 200g. Separando em tumores com peso maior que 400 gramas não encontramos diferenças nas expressões dos miRNAs.

Para classificação histológica de Weiss houve maior expressão do miR-139-3p ($p=0,05$) no grupo maligno (Weiss ≥ 3 critérios) (Figura 19). Uma expressão menor do miR-150-5p foi observada em pacientes que foram a óbito ($-2,92\text{-fold}$, $p=0,017$) (Figura 20), não sendo encontrado diferença com outros miRNAs.

Figura 13 – Associação da expressão dos miR-150-5p em relação com idade.

- Hipoexpressão do miR-150-5p em pacientes com idade superior a 3 anos.
- Hipoexpressão do miR-150-5p em pacientes com idade superior a 4 anos.

Figura 14 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p em relação com raça.

- a. Hipoeexpressão do miR-150-5p em pacientes brancos.
- b. Hipoeexpressão do miR-214-3p em pacientes brancos.
- c. Hipoeexpressão do miR-142-5p em pacientes brancos.

Figura 15 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-708-5p em relação ao tempo de início dos sintomas até o diagnóstico.

- a. Hiperexpressão do miR-214-3p em pacientes com intervalo entre início dos sintomas e diagnóstico maior que 4 meses.
- b. Hiperexpressão do miR-708-5p em pacientes com intervalo entre início dos sintomas e diagnóstico maior que 4 meses.

Figura 16 – Associação da expressão dos miR-214-3p, miR-34a-5p, miR-708-5p em relação ao volume tumoral.

c.

- a. Hipoexpressão do miR-214-3p em tumores maiores que 200cm³.
- b. Hipoexpressão do miR-34a-5p em tumores maiores que 200cm³.
- c. Hipoexpressão do miR-708-5p em tumores maiores que 200cm³.

Figura 17 – Associação da expressão dos miR-214-3p em relação ao peso tumoral maior ou menor que 100g.

Hipoexpressão do miR 214-3p em tumores maiores que 100g.

Figura 18 – Associação da expressão dos miR-150-5p, miR-214-3p, miR-142-5p, miR-708-5p em relação ao peso tumoral maior ou menor que 200g.

- a. Hipoexpressão do miR-150-5p em tumores maiores que 200g.
 b. Hipoexpressão do miR-214-3p em tumores maiores que 200g.
 c. Hipoexpressão do miR-142-5p em tumores maiores que 200g.
 d. Hipoexpressão do miR-708-5p em tumores maiores que 200g.

Figura 19 – Associação da expressão dos miR-139-3p em relação a classificação histológica de Weiss.

Hiperexpressão do miR-139-3p em tumores classificados como apresentando mais que 3 critérios na avaliação de Weiss (malignos).

Figura 20 – Associação da expressão dos miR-150-5p em relação ao desfecho.

Hipoexpressão do miR-150-5p em pacientes que foram a óbito.

7.4 Associação entre a expressão dos miRNAs com SG e SLE

Para análise de associação da expressão dos miRNAs com SG e SLE realizamos Kaplan Meier e teste log rank, sendo considerado como evento óbito e/ou recidiva e a expressão dos miRNAs como acima ou abaixo da mediana dos controles não neoplásicos.

Não foi possível realizar análise de sobrevida em alguns grupos estudados porque continham menos de cinco participantes acima ou abaixo da mediana. Para o miR-34a-5p, o grupo de expressão menor que a mediana dos controles tinham menos que cinco casos. Para o miR-142-5p a mediana do controle foi 0, ficando todos os tumores acima da mediana dos controles.

Ao analisarmos o miR-214-3p para as coortes variáveis total de pacientes, classificação histológica de Weiss acima de 3 critérios e pacientes classificados como estadiamento Sandrini e IPACR2 2, 3 e 4, não foram encontradas diferenças estatísticas (Tabela 5). Para o miR-139-3p somente foi possível realizar análise de sobrevida usando o número total de pacientes, não sendo encontrada diferença estatística (Tabela 6). Já para o miR-708-5p, a coorte com tumores classificados como expressão abaixo da mediana tiveram menor do que cinco participantes não sendo possível análise para as coortes estadiamento Sandrini 2 e 3 e IPACR2 2, 3 e 4, e 2 e 3, apesar de ser possível analisar para as demais variáveis. No entanto, não observamos diferenças estatísticas (Tabela 7).

Como descrito na tabela 8 e figuras 21-24, para o miR-150-5p, sua menor expressão foi associada a desfechos desfavoráveis. Ao separar os pacientes por estadiamento Sandrini modificado e IPACR2 retirando os classificados como estadio 1, esse perfil de expressão é mantido, sendo observada menor SLE e SG em neoplasias com hipoexpressão do miR-150-5p (Figura 23, Tabela 8). Ao separar apenas os estadiamentos 2 e 3 (estádios intermediários) pelo modelo IPACR2 e Sandrini modificado (Figura 24, Tabela 8) permanecemos com diferença em SLE, já SG não mantém a diferença estatística ($p=0,06$).

Tabela 5 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-214-3p.

Variável	SLE em 5anos		Valor de p	SG em 5anos		Valor de p
	< mediana controle	> mediana controle		< mediana controle	> mediana controle	
Total de Pacientes (n=68)	79,6 ±5,8%	66,7 ±11,1%	0,27	83,7±5,3%	77,8±9,8%	0,56
Pacientes Weiss>3 (n=55)	76,4 ±6,5%	50 ±14,4%	0,07	81,3±6%	66,7±13,6%	0,27
Pacientes estadio Sandrini 2,3 e 4 (n=28)	62,9±10,5%	33,3±19,2	0,25	67,4±10,2%	50±20,4%	0,40
Pacientes estadio Sandrini 2 e 3 (n=17)	**			**		
Pacientes estadio IPACTR2 2, 3 e 4 (n=28)	62,9±10,5%	33,3±19,2	0,25	67,4±10,2%	50±20,4%	0,40
Pacientes estadio IPACTR2 2 e 3 (n=20)	**			**		

** - Não foi possível análise estatística (< 5 casos no grupo de expressão maior que a mediana dos controles)

Tabela 6 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-139-3p.

Variável	SLE em 5anos		Valor de p	SG em 5anos		Valor de p
	< mediana controle	> mediana controle		< mediana controle	> mediana controle	
Total de Pacientes (n=65)	74,2±5,7%	100%	0,18	81,1±5,1%	100%	0,26
Pacientes Weiss>3 (n=53)	**			**		
Pacientes estadio Sandrini 2,3 e 4 (n=25)	**			**		
Pacientes estadio Sandrini 2 e 3 (n=17)	**			**		
Pacientes estadio IPACTR2 2, 3 e 4 (n=25)	**			**		
Pacientes estadio IPACTR2 2 e 3 (n=17)	**			**		

** - Não foi possível análise estatística (< 5 casos no grupo de expressão maior que a mediana dos controles)

Tabela 7 – Sobrevida livre de eventos em 5 anos para o miR-708-5p.

Variável	SLE em 5anos		Valor de p	SG em 5anos		Valor de p
	< mediana controle	> mediana controle		< mediana controle	> mediana controle	
Total de Pacientes (n=65)	75±15,3%	76,9±5,6%	0,86	75±15,3%	83,9±4,9%	0,51
Pacientes Weiss>3 (n=53)	66,7±19,2%	72,1±6,6%	0,73	66,7±19,2%	80,7±5,8%	0,40
Pacientes estadio Sandrini 2,3 e 4 (n=27)	60±21,9%	58,4±10,6%	0,96	60±21,9%	67±10,2%	0,78
Pacientes estadio Sandrini 2 e 3 (n=17)	**			**		
Pacientes estadio IPACR2 2, 3 e 4 (n=27)	**			**		
Pacientes estadio IPACR2 2 e 3 (n=17)	**			**		

** - Não foi possível análise estatística (< 5 casos no grupo de expressão menor que a mediana dos controles)

Tabela 8 – Sobrevida livre de eventos e sobrevida global em 5 anos para o miR-150-5p.

Variável	SLE em 5anos		Valor de p	SG em 5anos		Valor de p
	< mediana controle	> mediana controle		< mediana controle	> mediana controle	
Total de Pacientes (n=68)	64,5±9,5%	83,3±5,8%	0,11	68,7±9,2%	92,9±4,6%	0,028
Pacientes Weiss>3 (n=55)	55,7±11,1%	79,4±6,9%	0,098	61±10,8%	88,2±5,5%	0,023
Pacientes estadio Sandrini 2,3 e 4 (n=28)	27,3±13,4%	76,5±10,3%	0,015	36,4±14,5%	82,4±9,2%	0,022
Pacientes estadio Sandrini 2 e 3 (n=20)	42,9±18,7%	92,3±7,4%	0,021	57,1±18,7%	92,3±7,4%	0,06
Pacientes estadio IPACR2 2, 3 e 4 (n=28)	27,3±13,4%	76,5±10,3%	0,015	36,4±14,5%	82,4±9,2%	0,022
Pacientes estadio IPACR2 2 e 3 (n=20)	42,9±18,7%	92,3±7,4%	0,021	57,1±18,7%	92,3±7,4%	0,06

Figura 21 – Sobrevida global Kaplan Meier realizada com o grupo total de pacientes, comparando mediana miR-150-5p.

Sobrevida global relacionando mir-150-5p acima ou abaixo da mediana dos controles com grupo total de pacientes analisados.

Figura 22 – Sobrevida global Kaplan Meier realizada com o grupo de pacientes classificados como Weiss maior que 3 (carcinoma), comparando mediana miR-150-5p.

Sobrevida global relacionando mir-150-5p acima ou abaixo da mediana dos controles em tumores classificados como maligno pelos critérios de Weiss.

Figura 23 – Análise de sobrevida Kaplan Meier realizada com o grupo de pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini modificado e IPACR2, comparando mediana miR-150-5p.

- a. Sobrevida livre de eventos relacionando mir-150-5p acima ou abaixo da mediana dos controles em pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini modificado e IPACR2.
- b. Sobrevida global relacionando mir-150-5p acima ou abaixo da mediana dos controles em pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini modificado 2, 3 e 4 e IPACR2.

Figura 24 – Sobrevida livre de eventos Kaplan Meier realizada apenas com o grupo de pacientes classificados como estadiamento 2, 3 e 4 por Sandrini modificado e IPACR2, comparando mediana miR-150-5p.

a.

a. Sobrevida livre de eventos relacionando mir-150-5p acima ou abaixo da mediana dos controles em pacientes classificados como estadiamento 2 e 3 por Sandrini modificado e IPACR2.

7.5 Análise por modelo de risco proporcional de Cox

O modelo de riscos proporcionais de Cox foi ajustado para os dados de SLE e SG (Tabela 9). Encontramos aumento de risco para recidiva e óbito em pacientes maiores de 3 anos e maiores de 4 anos, volume do tumor maior 200cm³, peso tumoral maior 100g, maior 200g e maior 400g, presença de metástase ao diagnóstico, recidiva da doença.

Analizamos o miR-150-5p que possui um maior risco para desfecho desfavorável se comparado com os tumores a expressão do miR-150-5p abaixo da mediana dos controles.

Tabela 9 – Análise univariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

Variáveis	SLE		SG	
	RR IC (95%)	Valor <i>p</i>	RR IC (95%)	Valor <i>p</i>
Idade (n= 79)	3,804	0,004	4,825	0,005
> 3 anos	1,528 – 9,471		1,615 – 14,416	
Idade (n= 79)	4,231	0,002	6,578	0,001
> 4	1,714 – 10,446		2,198 – 19,679	
Sexo	1,778	0,227	1,220	0,737
Feminino	0,7 – 4,517		0,382 – 3,890	
Volume (n= 78)	3,615	0,006	5,281	0,002
>200 cm ³	1,450 – 9,016		1,844 – 15,126	
Diâmetro (n=78)	3,19	0,028	4,76	0,017
>5cm	1,13 – 8,97		1,36 – 17,09	
Peso (n= 76)	5,114	0,001	14,231	0,001
≥100g	1,914 – 13,662		3,147 – 64,347	
Peso (n= 76)	4,677	0,001	7,536	0,000
>200g	1,847 – 11,843		2,453 – 23,150	
Peso (n= 76)	4,054	0,008	4,891	0,009
>400g	1,440 – 11,411		1,497 – 15,982	
Metástase (n= 79)	8,671	0,000	10,918	0,000
Presente ao diag	3,254 – 23,109		3,708 – 32,148	
Recidiva (n= 79)	51,36	0,000	19,433	0,000
Presente	14,053 – 187,723		5,368 – 70,355	
Weiss (n= 73)	28,5	0,186	27,75	0,278
≤3 critérios	0,199 – 4079,40		0,069 – 11190,95	
miR-150-5p (n= 68)	2,18	0,122	3,5	0,041
< mediana controle	0,81 – 5,86		1,05 – 11,63	

RR – risco relativo; IC95% - intervalo de confiança de 95%; SLE – sobrevida livre de eventos; SG – sobrevida global

A análise multivariada foi realizada com as variáveis que foram significativamente associadas a SG ou SLE (Tabela 10), encontramos apenas aumento de risco de óbito ou de evento em pacientes que apresentaram metástases ao diagnóstico. E aumento de risco de óbito em pacientes que tinham tumores com peso maior ou igual a 100g.

Tabela 10 – Análise multivariada, com risco relativo e intervalo de confiança de 95%, para sobrevida livre de eventos e sobrevida global.

Variáveis	SLE		SG	
	RR IC (95%)	Valor <i>p</i>	RR IC (95%)	Valor <i>p</i>
Idade (n= 79) > 4 anos	1,519 0,49 – 4,71	0,469	1,23 0,32 – 4,77	0,765
Volume (n= 78) >200 cm ³	1,14 0,33 – 3,94	0,830	1,323 0,37 – 4,78	0,669
Peso (n= 76) ≥100g	3,289 0,8 – 13,56	0,100	10,83 1,69 – 69,36	0,012
Metástase (n= 79) Presente ao diag	6,601 2,15 – 20,22	0,001	6,5 1,82 – 23,23	0,004

RR – risco relativo; IC95% - intervalo de confiança de 95%; SLE – sobrevida livre de eventos;
SG – sobrevida global

7.6 Análise de enriquecimento

Uma vez que a expressão do miR-150-5p nas amostras tumorais foi aquela que mais apresentou associações e implicações clínicas para os TAC pediátricos, realizamos uma análise de enriquecimento de vias com os alvos preditos desse miRNA para melhor entender as possíveis funções reguladas por ele. Para tanto, utilizamos a plataforma *on-line miRWalk* e identificamos 2456 potenciais genes alvos do miR-150-5p. Um total de 79 vias foram significativamente enriquecidas por esse grupo de genes, sendo as vias de sinalização Ras, do hormônio tireoide, de resistência endócrina e de resistência ao inibidor de EGFR as *top 4* mais enriquecidas (Figura 25). Destacamos ainda as vias de desenvolvimento Wnt e Notch encontradas como enriquecidas e potenciais alvos do miR-150-5p, as quais são foco de estudo do nosso grupo de pesquisa. Na figura 22, estão ilustradas as 40 vias mais enriquecidas.

Figura 25 – Ilustração das 40 vias mais enriquecidas para o miR-150-5p.

7.7 Análise da inibição do miR-150-5p em células de linhagem de tumor adrenal H295A

Após a transdução lentiviral da linhagem celular foi possível observar o silenciamento de 53.8% do miR-150-5p na H295A, (Figura 26). Esses resultados foram validados através da técnica de qRT-PCR, após coleta de células que tiveram seu RNA extraído e o cDNA sintetizado. Para o silenciamento, o fabricante fornece uma planilha para avaliar a eficiência desse silenciamento, medida em porcentagem. Este silenciamento foi realizado em apenas um experimento, e devem ser vistos com cuidado.

Figura 26 – Eficiência da transdução dos miRNAs na linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295A.

CT miR-150 – Expressão do miR-150-5p nas células da linhagem H295A não transduzidas.
 miR-150i - Expressão do miR-150-5p nas células da linhagem H295A transduzidas.

Após o silenciamento do miR-150-5p, avaliamos a expressão dos genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *TP53*, *GSK3B*, *AXIN2*, *CTNNB1* e *DKK3*, por PCR quantitativa em tempo real (Apêndice F). Observamos uma diminuição da expressão do *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNNB1* quando comparado com as células controle não silenciadas (Figura 27). Além disso, observamos um aumento de expressão de *DKK3* (Figuras 28). Consideramos aumento ou diminuição da expressão quando o resultado foi duas vezes maior ou menor que o controle não silenciado.

Figura 27 – Efeito da inibição do miR-150-5p na linhagem celular H295A mostrando diminuição da expressão dos genes *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNNB1* quando comparado com controle não silenciado (CT miR-150).

Em laranja representado a queda na expressão dos genes *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNNB1* após o silenciamento do miR-150-5p na linhagem celular H295A.

Figura 28 – Efeito da inibição do miR-150-5p na linhagem celular H295A mostrando aumento de expressão do gene *DKK3* quando comparado com controle não silenciado (CT miR-150).

Em laranja representado o aumento na expressão do gene *DKK3* após o silenciamento do miR-150-5p na linhagem celular H295A.

8. DISCUSSÃO

Tumores adrenocorticais pediátricos são neoplasias raras e, em estádios avançados, são frequentemente fatais (MASTELLARO *et al.*, 2018), apresentando um grande desafio em sua classificação principalmente nos estádios intermediários (MCATEER *et al.*, 2013; GUPTA *et al.*, 2018). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes evolutivamente conservados, que regulam a expressão gênica no nível pós transcricional, estando envolvidos nos processos e desenvolvimento e proliferação tumoral. Este estudo se propôs a analisar o perfil de expressão dos miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p em amostras dos pacientes com TAC e sua associação entre os níveis de expressão encontrados nas amostras tumorais e os parâmetros clínicos e biológicos.

8.1 Variáveis clínicas

Observamos idade média de aparecimento da doença de 40,7 meses, mediana de 22 meses e 75,9% dos pacientes com idade inferior a 4 anos, com predomínio de crianças do sexo feminino (74,3%). Esses achados são semelhantes aos descritos na literatura, na qual observa mediana de 19,5 a 60 meses (maioria 2 anos) e predomínio do sexo feminino 1,6:1 a 3,3:1 (Tabela 11) (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006; BOER, 2008; GHAZI *et al.*, 2013; MASTELLARO *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2019 WU *et al.*, 2019; ZEKRI *et al.*, 2020; PICARD *et al.*, 2019; ZAMBATTI *et al.*, 2021).

A mediana de tempo entre aparecimento dos sintomas e o diagnóstico foi de 5 meses com média de 7 meses e maior frequência de pacientes com sintomas virilizantes, isolados ou mistos, (91%) dados que também corroboram as publicações disponíveis (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; MARQUES-PEREIRA *et al.*, 2006; BOER, 2008;; GHAZI *et al.*, 2013; MASTELLARO *et al.*, 2018; MONTEIRO *et al.*, 2019 WU *et al.*, 2019; ZEKRI *et al.*, 2020; PICARD *et al.*, 2019; ZAMBATTI *et al.*, 2021).

Em relação a variante patogênica p.R337H ela estava presente em 85,7% das amostras. Revisando estudos de diversos países, alguns elencados na tabela 11, vemos que a presença elevada dessa variante nos tumores somente é descrita em indivíduos brasileiros. Esta variante é frequente na população brasileira pediátrica também em associação a outras neoplasias como: carcinoma de plexo coróide (~63,6%), neuroblastoma (8,4%), osteossarcoma (7,3%) (CUSTODIO *et al.*, 2011; FEITOSA *et al.*, 2020; PINTO; ZAMBETTI, 2020; VOLC *et al.*, 2020). A penetrância estimada de TAC em crianças menores de 5 anos portadoras da

variante *TP53* p.R337H foi de 3,4%. E o risco estimado de câncer na vida de 40% com um aumento de risco para câncer de 3,9 vezes nas famílias afetadas (COSTA *et al.*, 2019). Mas ainda uma variante causadora de doença presente em aproximadamente 0,3% da população dos estados brasileiros São Paulo, Paraná e Santa Catarina (CUSTODIO *et al.*, 2013; COSTA *et al.*, 2019; SEIDINGER *et al.*, 2020).

Encontramos associação significativa entre tumores maiores, peso maior 100g, maior 200g e maior 400g, volume maior 200cm³ com prognóstico desfavorável. De forma semelhante ao encontrado em nosso trabalho, essa associação foi feita em diversas publicações e por este motivo incorporadas como critérios de estadiamento (ZAMBATTI *et al.*, 2021). Em nossa série, a presença de idade inferior a 3 anos ou inferior a 4 anos foi um fator associado a um bom prognóstico como em outras coortes (ZAMBATTI *et al.*, 2021).

Quanto a sobrevida geral dos pacientes estudados, encontramos sobrevida em 5 anos de 82%, sendo melhor para pacientes classificados com estadiamentos menores Sandrini modificado (93,6%, 74,4%, 100%, 25%) e IPACTR2 (93,6%, 69,7%, 100%, 25%), o fato de os pacientes classificados como estadiamento 3 terem uma sobrevida superior aos demais provavelmente deve-se ao fato de a amostra ser pequena para esta classificação.

Estes resultados clínico-laboratoriais tomados em conjunto demonstram que a amostra estudada se comporta de maneira semelhante ao descrito para os TAC pediátricos no Brasil e no mundo.

Na tabela 11 estão descritas algumas das publicações encontradas com a respectivas características clínicas dos casos descritos.

Tabela 11 – Descrição dos estudos com seus respectivos dados dos casos reportados.

Estudo	Número de participantes	Período do estudo	Local do estudo	Idade	Relação F:M	Sintomas	Tempo sintomas	p.R337H	Sobrevida
Marques-Pereira <i>et al.</i> , 2006	125	1966-2005	Curitiba, PR, Brasil	Mediana 3,2 anos	2,6:1	51% virilização 42,4% misto	Média de 11 meses		
Monteiro <i>et al.</i> , 2019	13	2004-2015	Belo Horizonte, MG, Brasil	Mediana 2 anos	3,3:1	77% virilizante	Mediana meses		SG 92,3%
Michalkiewicz <i>et al.</i> , 2004 IPACTR 1	254	1990-2001	Internacional 80% Brasil (sudeste)	Mediana 3,2 anos 60% < 4a	1,6:1	10% não funcionantes Maioria virilização	36,5% mais que 6 meses	2/3 dos casos	SLE 54,2% SG 54,7%
Ribeiro <i>et al.</i> , 2012 IPACTR 2	67	2002-2011						28,8% TP53 wild	
Wu <i>et al.</i> , 2019	13	2009-2018	Hangzhou, China	Mediana 22 meses	2,25:1	61,5% virilização 23% misto 7,7% Cushing		Nenhum. 6 com outras mutações TP53	
Ghazi <i>et al.</i> , 2013	7	20 anos	Tehran, Iran		2,5:1	71,4% virilização	Entre 4 meses e 1 ano		
Mastellaro <i>et al.</i> , 2018	137	1982-2014	Campinas, SP, Brasil	88% < 5 anos	2:1	72,8% virilização 17,5% misto 2,9% Cushing, 6,8% não funcionantes		90,5%	Estadio I – 95,7% Estadio II – 75% Estadio III – 55% Estadio IV – 25%
Boer, 2008	14	1987-2008	Porto Alegre, RS, Brasil	Mediana 19,5 meses	2,5:1	71,4% virilização 7,1% Cushing 14,3% misto 7,1% não funcionantes	Média 9 meses		
Zekri <i>et al.</i> , 2020	18	2007-2016	Cairo, Egito	Mediana 48,5 meses	1,6:1	89% Tumores funcionantes Mais frequente virilização			SLE 52,4% SG 66,3%
Picard <i>et al.</i> , 2019	95	2000-2018	França	Mediana 5 anos	2,4:1	88% funcionantes 75% com excesso de andrógeno			SLP 82% SG 86%

Recentemente foi publicado uma meta-análise (ZAMBATTI *et al.*, 2021) avaliando TAC pediátricos em 42 artigos em um total de 1006 pacientes com resultados de risco relativo (RR) semelhantes ao do nosso estudo. Esta revisão sistemática confirma as publicações anteriores que idade menor que 4 anos, ressecção total, diâmetro do tumor menor que 5 cm, volume menor que 200cm³, peso menor que 100g e menor que 400g, e menores estadiamentos ao diagnóstico se correlacionam com prognóstico (ZAMBATTI *et al.*, 2021). Dados comparativos dos dados deste estudo com meta-análise de Zambatti encontram-se na tabela 12 (60 pacientes da meta-análise são os mesmos desta coorte).

Tabela 12 – Comparativo dos riscos relativos descritos nesta coorte e os descritos na meta-análise de Zambatti.

Variáveis	Presente estudo (n=79)		Zambatti (n=1006)	
	RR IC 95%	Valor de <i>p</i>	RR IC 95%	Valor de <i>p</i>
Idade > 4 anos	4,231 1,714 – 10,446	0,002	3,07 2,35 – 4,02	<0,00001
Sexo Feminino	1,778 0,7 – 4,517	0,227	1,21 0,94 – 1,55	0,14
Volume >200 cm³	3,615 1,450 – 9,016	0,006	3,37 1,93 – 5,88	<0,0001
Maior diâmetro > 5 cm	3,19 1,13 – 8,97	0,028	2,98 1,56 – 5,67	0,0009
Peso >100g	5,114 1,914 – 13,662	0,001	5,46 3,24 – 9,20	<0,00001
Peso >400g	4,054 1,440 – 11,411	0,008	4,29 3,19 – 5,78	<0,00001

RR – risco relativo IC95% - intervalo de confiança de 95%

Fonte: resultados próprios e ZAMBATTI *et al.*, 2021.

8.2 Expressão dos miRNAs

Nossos resultados demonstram hipoexpressão do miR-214-3p em neoplasias adrenocorticais em relação a amostras adrenais não tumorais. Achado semelhante ao nosso foi publicado em 2009 por Tömböl *et al.*, no qual o miR-214-3p foi observado como hipoexpresso em carcinomas adrenocorticais em adultos quando comparado com córtex adrenal normal, com adenoma inativo e com adenoma produtor de cortisol (TÖMBÖL *et al.*, 2009). A hipoexpressão do miR-214-3p em tumores maiores que 200cm³, maiores que 100g ou maiores que 200g identificada no presente estudo está em concordância com os dados publicados em estudo anterior por Feinmesser *et al.* Nessa pesquisa foram incluídos 51 tumores de pacientes com idades entre 0 e 79 (maioria adultos), sendo também observado menor expressão do miR-214-3p em tumores que possuíam critérios de malignidade pela classificação de Weiss, associados a metástases a distância e a pior desfecho (FEINMESSER *et al.*, 2015). No entanto, esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,062$) em nossa análise.

Comparando adrenais neoplásicas com tecido adrenal não neoplásico observamos que o miR-34a-5p está significativamente hiperexpresso nos tumores comparado com adrenais não neoplásicas, e hipoexpresso em tumores > 200cm³. Um estudo em pacientes adultos mostrou o miR-34a-5p significativamente hipoexpresso em carcinomas adrenais se comparados com adenomas classificados pelo escore de Weiss e em tumores associados com metástases a distância (FEINMESSER *et al.*, 2015). Não encontramos diferença significativa de expressão do miR-34a-5p nos pacientes pediátricos quando utilizamos o escore de Weiss para classificação de tumor maligno ou benigno.

Em nosso estudo observamos que miR-139-3p encontrou-se hipoexpresso nos TAC em comparação a adrenais não tumorais e nos tumores classificados como Weiss maligno (maior que 3 critérios) em comparação com benignos por Weiss. Schmitz *et al.*, comparando carcinoma adrenal com adenoma e tecido adrenal normal mostrou associação da menor expressão deste mesmo com carcinomas adrenais, corroborando nosso resultado. O mesmo trabalho descreveu ainda que a expressão do miR-139-3p não se mostrou capaz de prever prognóstico, fato também de acordo com os resultados encontrados em nossa coorte (SCHMITZ *et al.*, 2011).

O envolvimento do miR-142-5p tem sido repetidamente reportado em vários tipos de câncer. Foi observado hiporregulado em câncer de pâncreas (YAO *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2020), câncer cervical (GUO *et al.*, 2020), câncer de ovário (LIU *et al.*, 2020), câncer gástrico (ZHANG; ZHANG; HOU, 2020) e relatado hiperexpresso em carcinoma colorretal

(ISLAM *et al.*, 2018), câncer de mama (YU *et al.*, 2019) e melanoma (XU *et al.*, 2020). Foi demonstrado que miR-142-5p pode regular a proliferação celular e apoptose através da inibição da via MAPK (YAO *et al.*, 2019) e via PI3K/AKT (ZHU J *et al.*, 2020) em câncer pancreático. Zhu W *et al.* em estudo de linhagem celular de carcinoma pulmonar resistente ao gefitinib (inibidor de tirosina-quinase que tem como alvo a via EGFR) mostrou que a hiperexpressão do miR-142-5p pode reverter a resistência ao gefitinib e promover apoptose (ZHU W *et al.*, 2020). Em câncer colorretal a expressão do miR-142-5p foi maior em tecido e células cancerígenas quando comparado com controles, sendo ela associada a um aumento significativo de proliferação celular, formação de colônia e migração celular (ISLAM *et al.*, 2018). Um estudo em câncer gástrico mostrou que o silenciamento do NNT-AS1 bloqueou a sinalização Wnt/ β -catenina via miR-142-5p/SOX4 promovendo apoptose (ZHANG; ZHANG; HOU, 2020). No entanto, a relação do miR-142-5p em TACs pediátricos não foi previamente descrita. Identificamos sua expressão aumentada em TAC em menores de 18 anos em relação a adrenais não neoplásicas. Além disso, esta hiperexpressão não teve relação com sintomatologia do paciente, produção hormonal ou sobrevida.

O miR-708-5p foi observado hipoexpresso em tumores maiores e mais pesados ($>200\text{cm}^3$ e $>200\text{g}$) em relação aos menores e de menor peso. Entretanto, esse miRNA está hiperexpresso em TAC se compararmos com amostras de adrenais não neoplásicas. Não há descrição deste miRNA em adrenal. Em linhagens celulares de câncer de cólon o miR-708-5p foi encontrado hiporegulado comparado com linhagem celular de epitélio colônico normal; e ao estudar a interação do miR-708-5p com a via Wnt Yu *et al.* Encontraram que a hiperexpressão deste miRNA suprimia a atividade da *CTNNB1*-WT, e reduzia os níveis de mRNA e proteína (YU *et al.*, 2020). Wu *et al.* também encontraram uma hipoexpressão do miR-708-5p em tecido de câncer colorretal e em linhagem celular. Em estudos funcionais encontraram que a redução do miR-708-5p foi crucial para aceleração da proliferação celular, formação de colônia, migração e invasão. Além disso, o mesmo estudo mostrou também que a expressão do EGFR aumentava com o inibidor de miR-708-5p (WU *et al.*, 2020). Yang *et al.* demonstrou a hipoexpressão do miR-708-5p em câncer de próstata e um aumento da expressão deste após tratamento de linhagens celulares com metilformina, o que resultou em apoptose (YANG *et al.*, 2015). Menor expressão do o miR-708-5p foi reportada em linhagens celulares imortalizadas de câncer de pulmão em comparação com células de pulmão não tumorais (MONTELEONE; LUTZ, 2020). Em osteossarcoma, tanto em tecidos tumorais, quanto em linhagem celular, o miR-708-5p foi descrito como hiporregulado em comparação com controles

normais. Sua hiperexpressão leva a supressão da migração celular e invasão e aumento de apoptose (SUI *et al.*, 2019). Para sarcoma de Ewing, o miR-708-5p está diminuído nos tecidos tumorais e ainda mais em linhagens celulares, apesar de não estar relacionado a variáveis prognósticas (ROBERTO *et al.*, 2019). Já em leucemia linfóide aguda (LLA) de criança, esse mesmo miRNA aparece como hiperexpresso em comparação a medula óssea normal com heterogeneidade de expressão quando separados os subtipos de leucemia linfóide aguda (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Outros estudos também demonstram esta diferença de expressão entre os subtipos de LLA. Monteleone e Lutz em sua revisão colocam que o miR-708-5p é observado como hiperexpresso em LLA-B e LLA-pré-B, e hipoexpresso em LLA-T, em leucemia linfóide crônica (LLC) aparece menos expresso em indivíduos com LLC do que nos controles saudáveis. Em carcinoma urotelial de bexiga o miR-708-5p tem uma expressão aumentada na ordem de 25 vezes em relação a amostras normais. Além disso, sua inibição reduz crescimento tumoral em modelo animal. Em contraste, o miR-708-5p é hipoexpresso em tumor de mama, sarcoma de Ewing, glioblastoma multiforme, carcinoma hepatocelular, câncer de ovário, câncer de próstata e carcinoma de células renais, sendo em todos descrito que seu aumento reduziria migração, invasão e aumentaria apoptose (MONTELEONE; LUTZ, 2017). Comparando o tecido de adenocarcinoma ductal pancreático pareado com tecidos adjacentes não cancerígenos a expressão do miR-708-5p mostrou-se significativamente mais alta em tecidos tumorais do que os não tumorais, sendo este achado também reproduzido quando estudado linhagens de células pancreáticas neoplásicas e células pancreáticas normais. Esta hiperexpressão do miR-708-5p foi inversamente relacionada a sobrevida global (HUANG *et al.*, 2019).

Apenas um artigo descreve o miR-150-5p em tecido adrenal, porém em pacientes adultos. Nele a expressão do miR-150-5p está significativamente elevada em tecido de mielolipoma adrenal e em amostras séricas se comparado com carcinoma adrenal em estudo por qRT-PCR. Neste mesmo estudo, é descrito que a expressão deste miRNA pode diferenciar mielolipoma adrenal e adrenocarcinoma (DECMANN *et al.*, 2018). Este dado pode corroborar nosso achado que miR-150-5p aparece hipoexpresso em pacientes com pior prognóstico.

O miR-150-5p é um miRNA relacionado ao câncer e sua expressão tem sido descrita como aberrante em vários cânceres. Em câncer colorretal foi observado hipoexpresso e negativamente correlacionado com estadiamento e sobrevida global, atuando na proliferação, migração, invasão celular e angiogênese (CHEN *et al.*, 2018). Também em câncer colorretal, o miR-150-5p exossomal circulante sérico está diminuído nos pacientes com neoplasia em

comparação com indivíduos normais e é sugerido como um potencial biomarcador diagnóstico, pois consegue diferenciar sujeitos normais dos com câncer colorretal (ZHAO *et al.*, 2019; ZOU *et al.*, 2019). Em colangiocarcinoma, o miR-150-5p foi descrito como hipoexpresso e sua expressão regulando, *in vitro*, crescimento, proliferação, migração celular e invasão em células de colangiocarcinoma. Este mesmo estudo encontrou que expressão do miR-150-5p está relacionada com nível de CA19-9, podendo ser um marcador sérico para diagnóstico precoce (WU *et al.*, 2016). Em todos os subtipos de leucemia mielomonocítica juvenil e em leucemias mieloides agudas, foi observada hipoexpressão do miR-150-5p (LEONCINI *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2012). Em outras neoplasias como no linfoma T, no câncer pancreático, esofágico, colorretal, carcinoma hepatocelular o miR-150 encontra-se hipoexpresso. Em contraste, nos cânceres gástricos, mama, pulmão o miR-150 encontra-se hiperexpresso (WANG *et al.*, 2015). Wu *et al.* encontrou mir-150-5p hiperexpresso em tecido tumoral de pacientes com câncer de pulmão não pequenas células e em linhagem celular desta neoplasia se comparado com tecido normal ou com linhagem de células pulmonares normais. Mostrou ainda aumento da proliferação e migração celular em células com hiperexpressão do miR-150-5p (WU *et al.*, 2020). Em melanoma o miR-150-5p inibe a proliferação, invasão e metástase via efeito Warburg mediado por SIX1 (YANG *et al.*, 2019). Como oncogene, miR-150-5p promove proliferação celular de carcinoma cervical via *SRCINI* (ZHU; HAN, 2019). A redução da expressão do miR-150-5p em câncer de próstata foi capaz de predizer prognóstico desfavorável (YU *et al.*, 2018), como encontramos em nossa coorte de pacientes pediátricos com tumores adrenais.

8.3 Expressão dos genes na linhagem H295A após silenciamento do miR-150-5p

A via de sinalização Wnt é frequentemente ativada e aberrante em tumores adrenocorticais (CHENG *et al.*, 2017; LOFTI *et al.*, 2018). A inibição da via Wnt/ β -catenina possui um efeito anti-proliferativo, pro-apoptótico e anti-esteroidogênico em linhagens celulares de carcinoma adrenocortical (LEAL *et al.*, 2015). Alterações somáticas afetando a atividade da via Wnt- β -catenina foram identificadas em 41% dos casos de carcinomas adrenocorticais adultos (KAMILARIS *et al.*, 2020). Em 94 amostras de neoplasia adrenal e lesões metastáticas de pacientes com idades entre 11 e 79 anos, Darabi *et al.* encontraram mutação nos genes *TP53* (36%) e *CTNNB1* (19%) (DARABI *et al.*, 2021). Em estudo anterior

do nosso grupo com 62 pacientes pediátricos com TAC, mutações ativadoras de *CTNNB1* foram encontradas em somente 4 casos (6%), todos apresentando também mutação no *TP53* (LEAL *et al.*, 2011).

Em carcinomas adrenais é reportado um acúmulo inapropriado nuclear e/ou citoplasmático de β -catenina (BONNET-SERRANO; BERTHERAT, 2017). Também encontramos em estudo prévio do nosso grupo acumulação difusa de β -catenina em 71% dos TAC, sendo presente mesmo em TAC sem mutação para *CTNNB1* (LEAL *et al.*, 2011). As mutações do *CTNNB1* estão associadas a um prognóstico ruim em adultos e crianças com tumores adrenocorticais (MERMEJO *et al.*, 2014; DARABI *et al.*, 2021). Liu *et al.* em 16 amostras de pacientes adultos com diagnóstico de carcinoma adrenocortical separou a expressão de *CTNNB1* em acima ou abaixo de 30% e encontrou que a expressão mais elevada de *CTNNB1* foi associada com pior sobrevida global (LIU *et al.*, 2018), fato não encontrado no estudo de Leal *et al.* com tumores pediátricos (LEAL *et al.*, 2011).

Em nosso estudo, foi observado menor expressão de *CTNNB1* após silenciamento do miR-150-5p na linhagem de carcinoma adrenal H295A. Outros estudos também apresentam resultado semelhante demonstrando que a β -catenina é um alvo direto do miR-150-5p. Em câncer colorretal o miR-150-5p está significativamente hipoexpresso e possui uma correlação inversa com a β -catenina inativando a via Wnt/ β -catenina (HE *et al.*, 2020). Fato também descrito em carcinoma hepatocelular, onde o miR-150-5p atua diretamente sobre a β -catenina regulando-a negativamente, e assim induzindo apoptose e crescimento tumoral (CUI *et al.*, 2020). Outro estudo em células de glioma mostra a expressão de *CTNNB1* diminuída pela hiperexpressão de miR-150-5p (TIAN *et al.*, 2020). O mesmo resultado foi demonstrado em estudo com câncer de pulmão não pequenas células (DAI *et al.*, 2019). Zhou *et al.* estudando o RNA longo não codificante PART1 em câncer colorretal relata que o silenciamento do PART1 pode reduzir a expressão do *CTNNB1* via hiper-regulação do miR-150-5p e miR-520h, levando assim a uma inibição da sinalização Wnt/ β -catenina e suprimindo a progressão do câncer colorretal (ZHOU *et al.*, 2020).

Estudo que avaliava efeito do miR-150-5p descreve achados que o nível plasmático de miR-150-5p está aumentado em pacientes com infarto cerebral se comparado com controles saudáveis. Neste estudo em modelo animal (ratos), a expressão do miR-150-5p foi aumentada e esta alteração resultou redução da expressão de *TP53* e aumento na expressão de *c-Myc*, *Ccnd1*, *Ctnnb1* e *Survivin* (SUN *et al.*, 2020).

O gene *DKK3* tem sido relatado como hipoexpresso em vários cânceres, tais como estômago, colorretal, pulmão, bexiga, próstata, cérvix uterina e mama (PEI *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2020; STEWART, 2014; KARDOONI *et al.*, 2018; GONDKAR *et al.*, 2019; Li *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2009; SHAIRESH *et al.*, 2021). Cheng *et al.*, encontraram uma menor expressão de *DKK3* em 6 dos 7 carcinomas adrenais estudados em contraste com a expressão robusta encontrada em córtex adrenal normal, sugerindo ação do *DKK3* como supressor de tumor em tecidos adrenais humanos. Foi relatada também uma relação inversa entre a β -catenina e o *DKK3* (CHENG *et al.*, 2017), achado de acordo com os nossos resultados. Em estudo prévio do nosso grupo com tumores adrenocorticais pediátricos também foi encontrado hipoexpressão do *DKK3* em tumores comparando com adrenais normais e sua relação inversa com expressão do *CTNNB1* (LEAL *et al.*, 2011). No presente estudo encontramos aumento de expressão do *DKK3* e diminuição da expressão da *CTNNB1* quando inibimos o miR-150-5p na linhagem adrenal. No entanto, não foi encontrada na literatura associação direta no *DKK3* com miR-150-5p.

Ronchi *et al.*, em estudo usando *SNP array* em tumores adrenocorticais encontrou que a via de sinalização Notch era a mais frequentemente alterada em ambos carcinoma e adenoma adrenocortical, seguida por alterações da via Wnt/ β -catenina (RONCHI *et al.*, 2013). A via de sinalização Notch regula as decisões de destino celular durante o desenvolvimento embrionário e vida adulta, controlando neurogênese, angiogênese, apoptose, ciclo celular, proliferação e diferenciação (CAPACCIONE; PINE, 2013). O Notch é um receptor transmembrana, como um domínio extracelular que processa repetições do fator de crescimento epidermal (EGF) e um domínio intracelular contendo uma sequência de localização nuclear, um domínio módulo associado RBP-Jkappa, um região C-terminal PEST e 7 repetições *ankryin*. Existem quatro receptores (Notch1, Notch2, Notch3, Notch4) e seis ligantes (Jagged1, Jagged2, Delta-like1, Delta-like3, Delta-like4, homólogo do Delta-like1) identificados (RONCHI *et al.*, 2015). A hiper-regulação do ligante Notch, Jagged1 (JAG1), em uma variedade de cânceres implica na ativação ligante-dependente da via de sinalização Notch. Em carcinoma adrenocortical o *JAG1* foi encontrado hiper-regulado em comparação com tecido normal e tecido adenomatoso aumentando a proliferação celular e a agressividade do carcinoma adrenocortical em células Y1 murinas (SIMON; GIORDANO; HAMMER, 2012). Ronchi *et al.* também encontraram a proteína Jagged1 hiperexpressa em neoplasia adrenal. O Jagged1 foi negativamente correlacionado com tamanho tumoral e mostrou maior expressão em estádios

iniciais e com baixo número de metástases. Em análise multivariada o Jagged1 teve impacto independente na sobrevida global (RONCHI *et al.*, 2015).

A via Wnt tem uma relação de *crosstalk* com a via Notch. Existem evidências que a interação direta entre β -catenina e TCF ativa Notch em câncer colorretal através da regulação da expressão do Jagged1. A interação da β -catenina com o Notch-1 leva a uma diminuição da ubiquitinação do Notch-1, causando aumento de expressão do Hes-1, que está associado a tumorigênese. A perda do Notch-1 leva a ativação da β -catenina e aumenta sua atividade transcricional, sugerindo que o Notch ameniza a resposta mediada por β - catenina/Wnt (KRISHNAMURTHY; KURZROCK, 2018).

Em nosso estudo, evidenciamos uma de redução do *NOTCH1* e *NOTCH2* juntamente com a redução de expressão do miR-150-5p, que corrobora os resultados de Grubelnik *et al.* em carcinoma oral de células escamosas, que descreve a correlação do *NOTCH1* com o miR-150-5p e miR-34a-5p. Este mesmo estudo mostrou que a expressão do miR-150-5p está significativamente correlacionada com a expressão do miR-34a-5p. A hipoeexpressão do miR-150-5p em carcinoma esofágico de células escamosas estava associada a invasão linfática, metástases linfonodais e pior prognóstico em carcinoma oral de células escamosas o miR-150-5p foi correlacionado com tamanho do tumor e metástases em linfonodos (GRUBELNIK *et al.*, 2020).

Vale ressaltar que nosso estudo possui algumas limitações importantes. Primeiramente como é um tumor raro, o número de casos estudados é relativamente pequeno para algumas das análises realizadas. Segundo, nos estudos funcionais, devido às limitações impostas pela pandemia de SARS-Covid-2 neste período, foi possível a realização de apenas um experimento para os estudos funcionais, no qual obtivemos um silenciamento menor do que o considerado adequado para *knockdown* do miR-150-5p. Por estes motivos os resultados devem ser vistos com cautela. Portanto, apesar da demonstração de resultados promissores associando miR-150-5p e as via Wnt e Notch (vias com alteração previamente descritas em tumores adrenais), são necessários novos experimentos para a validação destes resultados.

9. CONCLUSÃO

Neste estudo procuramos apresentar o perfil de expressão de diversos miRNAs nos tumores adrenocorticais de crianças e os correlacionamos com a patogênese e sobrevida. Vimos que nossa amostra é semelhante as amostras de pacientes pediátricos brasileiros com tumores adrenocorticais o que a torna representativa para estudos desta natureza. Demonstramos que vários miRNAs possuem expressão desregulada nesses tumores e alguns deles estão correlacionados com patogênese e sobrevida.

As características clínicas dos casos analisados neste estudo mostram uma predominância de pacientes do sexo feminino (74,7%), idade inferior a 4 anos (76%), sintomas de virilização pura (64,1%), com 94,1% dos tumores com função endócrina. Nossa SG mostrou-se de 93,6% para estadios 1 classificados por Sandrini ou IPACR2 e de 88% para os casos que foram tratados apenas com cirurgia total sem realização de quimioterapia e que não apresentavam metástase ao diagnóstico.

Todos os miRNAs estudados (miR-214-3p, miR-150-5p, miR-142-5p, miR-708-5p, miR-34a-5p e miR-139-3p), exceto o miRNA-150-5p apresentaram diferença estatística entre amostras tumorais e adrenais não neoplásicas. Sendo os miR214-3p e 139-3p hipoexpresso em tumores adrenais e miR-34a-5p, miR-142-5p e miR-708-5p hiperexpressos.

Os níveis de expressão dos miRNAs em relação as características clínicas e biológicas mostraram-se diferentes em alguns aspectos. O miR-150 5p apresentou aumento de expressão em pacientes menores que 3 anos ou menores que 4 anos, em tumores menores que 200g e menor expressão em pacientes que foram à óbito. O miR-214-3p foi hipoexpresso em tumores grandes, maiores que 200cm³ ou maiores que 100g ou maiores que 200g. Já o miR-34a-5p e o miR-142-5p tiveram sua expressão diminuída apenas em tumores maiores que 200g. O miR-139-3p foi associado a tumores com características malignas pela classificação histológica de Weiss. E o miR-708-5p foi hipoexpresso em tumores maiores que 200cm³ ou maiores que 200g.

O miR-150-5p esteve associado a SG. Observamos que pacientes cujos tumores tiveram expressão do miR-150-5p acima da mediana dos controles foi significativamente maior do que para o grupo com expressão abaixo da mediana (92,4% vs 68,7%, $p=0,028$). Ao excluirmos os pacientes classificados pelo IPACR2 e Sandrini modificado como estadiamento 1 encontramos uma diferença ainda maior em SG (82,4% vs 36,4%, $p=0,022$) e SLE (76,5% vs 27,3%, $p=0,015$). Ao analisarmos apenas os estadios 2 e 3 classificados por IPACR2 e

Sandrini modificado, observamos que a SLE se mantém significativamente diferente entre os grupos de expressão do miR-150-5p acima e abaixo da mediana dos controles. Os pacientes com miR-150-5p hiperexpresso possuem uma melhor SLE (92,3% vs 42,9%, $p=0,021$), mas a SG não é estatisticamente diferente (92,3% vs 57,1%, $p=0,06$)

Nesta análise em especial o miR-150-5p nos chamou atenção por parecer identificar pacientes de pior prognóstico quando separamos os estadiamentos mais difíceis da tomada de decisão (estádios 2 e 3), sugerindo que a expressão do miR-150-5p seja um candidato potencial a ser usado como marcador prognóstico nestes casos.

Ao silenciar o miR-150-5p na linhagem celular de carcinoma adrenocortical H295A, estudamos sua correlação com alguns genes das vias Wnt e Notch, ambas vias descritas como desreguladas em TAC, e encontramos os diminuição da expressão do *NOTCH1*, *NOTCH2* e *CTNMB1* quando comparado com as células controle não silenciadas e o aumento de expressão de *DKK3*. Entretanto, repetição dos experimentos é necessária para confirmação dos resultados (em realização).

10. REFERÊNCIAS

- Anomymous. General melasma and short hair over the entire body of a child of three years, with conversion of the left supra-renal capsule into a large malignant tumor; the external organs of generation resembling that of adult life. **Lancet** v.1, p 175, 1865.
- BERRUTI A, BAUDIN E, GELDERBLOM H, HAAK HR, PORPOIGLIA F, FASSNACHT M, PENTHEROUDAKIS G. Adrenal cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology** v. 23, supplement 7, p. 131-138, 2012.
- BOER SC. **Aspectos clínicos e diagnósticos em 30 pacientes com carcinoma adrenocortical**. Dissertação de mestrado UFRS, 2008.
- BONNET-SERRANO F, BERTHERAT J. Genetics of tumors of the adrenal cortex. Genetics of tumors of the adrenal cortex. **Endocrine-Related Cancer** v. 25, n. 3, p. 131-152, 2017.
- BRONDANI VB, FRAGOSO MCBV. Pediatric adrenocortical tumor – review and management update. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes** v. 27, n. 3, 177-186, Jun 2020.
- CALIN GA, DUMITRU CD, SHIMIZU M, BICHI R, ZUPO S, NOCH EM, ALDLER H, RATTAN S, KEATING M, RAI K, RASSENTI L, KIPPS T, NEGRINI M, BULLRICH F, CROCE CM. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 99, n. 24, p. 15524-15529, 2002.
- CALIN GA, SEVIGNANI C, DUMITRU CD, HYSLOP T, NOCH E, YENDAMURI S, SHIMIZU M, RATTAN S, BULLRICH F, NEGRINI M, CROCE C. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 101, n. 9, p.2999-3004, março 2004.
- CAPACCIONE KM, PINE SR. The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival. **Carcinogenesis** v. 34, n. 7, p. 1420-1430, Jul 2013.
- CHEN X, BA Y, MA L, CAI X, YIN Y, WANG K, GUO J, ZHANG Y, CHEN J, GUO X, LI Q, LI X, WANG W, ZHANG Y, JIANG X, YANG X, XU C, ZHENG P, ZHANG J, LI R, ZHANG H, SHANG X, GONG T, NING G, WANG J, ZEN K, ZHANG J, ZHANG CY. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. **Cell Res** v.18, n. 10, p. 997-1006, Out 2008.
- CHEN X, XU X, PAN B, ZENG K, XU M, LIU X, HE B, PAN Y, SUN H, WANG S. MiR-150-5p suppresses tumor progression by targeting VEGFA in colorectal cancer. **Aging (Albany NY)** v. 10, n. 11, p. 3421-3437, Nov 2018.
- CHENG JY, BROWN TC, MURTHA TD, STENMAN A, JUHLIN CC, LARSSON C, HEALY JM, PRASAD ML, KNOEFEL WT, KRIEG A, SCHOLL UI, KORAH R, CARLING T. A novel FOXO1-mediated dedifferentiation blocking role for DKK3 in adrenocortical carcinogenesis. **BioMed Central Cancer** v. 17, n. 164, p. 1-13, 2017.

CHERRADI N. MicroRNAs as a potential biomarkers in adrenocortical cancer: progress and challenges. **Front Endocrinol (Lausanne)** v. 6, p. 195, Jan 2016.

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

COSTA TEJ, GERBER VKQ, IBAÑEZ HC, MELANDA VS, PARISE IZS, WATABE FM, PIANOVSKI MAD, FIORI CMCM, FABRO ALMR, da SILVA DB, ANDRADE DP, KOMECHEN H, MENDES MC, CARBONI E, KUCZYNSKI AP, SOUZA EN, PARAIZO MM, IBAÑEZ MVC, CASTILHO LM, CRUZ AF, da MAIA TF, MACHADO-SOUZA C, ROSATI R, OLIVEIRA CS, PARISE GA, PASSOS JDC, BARBOSA JJRS, FIGUEIREDO MMO, LIMA L, TORMEN T, SABBAGA CC, ÁVILA SGA, GRISA L, ARANHA A, TOSIN KCF, OGRADOWSKI KRP, LIMA G, LEGAL EF, ANEGAWA TH, MAZZUCO TL, GRION A, BALBINOTTI JHG, DAMMSKI KL, MELO RG, KIESEL FILHO N, CUSTÓDIO G, FIGUEIREDO BC. 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)** v.11, n. 11, 1804, Nov 2019.

CUI X, JIANG X, WEI C, XING Y, TONG G. Astagaloside IV supresses development of hepatocellular carcinoma by regulation miR-150-5p/ β -catenin axis. **Environmental toxicology and pharmacology** v. 78, 2020.

CUSTODIO G, TAQUES GR, FIGUEIREDO BC, GUGELMIN ES, FIGUEIREDO MMO, WATANABE F, PONTAROLO R, LALLI E, TORRES LFB. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline *TP53* R337H mutation in southern Brazil. **PLoS One** v. 6, n. 3, e18015, Mar 2011.

CUSTODIO G, PARISE GA, KIESEL FILHO N, KOMECHEN H, SABBAGA CC, ROSATI R, GRISA L, PARISE IZS, PIANOVSKI MAD, FIORI CMCM, LEDESMA JÁ, BARBOSA JRS, FIGUEIREDO FRO, SADE ER, IBAÑEZ H, ARRAN SBI, STINGHEN ST, MENERELLI LR, FIGUEIREDO MMO, CARVALHO DC, AVILA SGA, WOISKI TD, PONCIO LC, LIMA GFR, PONTAROLO R, LALLI E, ZHOU Y, ZAMBETTI G, 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** v. 31, n. 20, p. 2619-2626, Jul 2013.

DAI FQ, LI CR, FAN XQ, TAN L, WANG RT, JIN H. MiR-150-5p inhibits non-small-cell lung cancer metastasis and recurrence by targeting HMGA2 and β -catenin signaling. **Mol Ther Nucleic Acids** v. 16, p. 675-685, Jun 2019.

DALL'IGNA P, VIRGONE C, DE SALVO GL, BERTORELLE R, INDOLFI P, DE PAOLI A, BUFFA P, CONTE M, ESPOSITO G, INSERRA A, CANDIOTTO C, D'ONOFRIO V, BOLDRINI R, FERRARI A, BISOGNO G, ALAGGIO R, CECCHETTO G. Adrenocortical tumors in Italian children: Analysis of clinical characteristics and P53 status. Data from national registries. **Journal of Pediatric Surgery** v. 49, p. 1367-1371, 2014.

DARABI S, BRAXTON DR, EISENBERG BL, DEMEURE MJ. Molecular genomic profiling of adrenocortical cancers in clinical practice. **Surgery** v. 169, n. 1, p. 138-144, Jan 2021.

DECMANN A, PERGE P, NYÍRO G, DARVASI O, LIKÓ I, BORKA K, MICSIK T, TÓTH Z, BANCOS I, PEZZANI R, IACOBONE M, PATÓCS A, IGAZ P. MicroRNA Expression Profiling in Adrenal Myelolipoma. **The Journal of clinical Endocrinology & metabolism** vol 103, issue 9, pages 35522-30, Sep 2018.

DOGHMAN M, WAKIL AE, CARDINAUD B, THOMAS E, WANG J, ZHAO W, VALLE MHCP, FIGUEIRDO BC, ZAMBETTI GP, LALLI E. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. **Cancer Research** v. 70, n. 11, p. 4666-4675, Jun 2010.

ELSE T, RODRIGUES-GALLINDO C. 5th international ACC symposium: hereditary predisposition to childhood ACC and the associated molecular phenotype: 5th international ACC symposium session: not just for kids! **Horm Cancer** v. 7, n. 1, p. 36-39, fev 2016.

FASSNACHT M, HAHNER S, POLAT B, KOSCHKER AC, KENN W, FLENTJE M, ALLOLIO B. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** v. 91, n. 11, p. 4511-4504, 2006.

FASSNACHT M, TERZOLO M, ALLOLIO B, BAUDIN E, HAAK H, BERRUTI A, WELIN S, SCHADE-BRITTINGER C, LACROIX A, JARZAB B, SORBYE H, TORPY DJ, STEPAN V, SCHTEINGART DE, ARLT W, KROISS M, LEBOULLEUX S, SPERONE P, SUNDIN A, HERMSEN I, HAHNER S, WILLENBERG HS, TABARIN A, QUINKLER M, FOUCHARDIERE C, SCHLUMBERGER M, MANTERO F, WEISMANN D, BEUSCHLEIN F, GELDERBLOM H, WILMINK H, SENDER M, EDGERLY M, KENN W, FOJO T, MULLER H, SKOGSEID B. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. **N Engl J Med** v. 366, n. 23, p.2189-2197, 2012.

FEDATTO, PF. **Papel dos microRNAs nos tumores adrenocorticais pediátricos**. 2014. Tese (Doutorado em Ciências), Programa Saúde da criança e do adolescente, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

FEINMESSER M, BENNBASSAT C, MEIRI E, BENJAMIN H, LEBANONY D, LEBENTHAL Y, VRIES L, DROOZD T, SPECTOR Y. Specific microRNAs differentiate adrenocortical adenomas from carcinomas and correlate with Weiss histopathology system. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology** v. 23, n.7, p. 522-531, agosto 2015.

FEITOSA JAS, CHAGAS PF, SOUSA GR, QUEIROZ RGP, CRUZEIRO GAV, TONE LG, BORGES KS, VALERA ET. Frequency of the *TP53* p.R337H mutation in brazilian cohort of pediatric patients with solid tumors. **Mol Biol Rep** v. 47, n. 8, p. 6439-6443, agosto 2020.

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

FREBOURG T, LAGERCRANTZ SB, OLIVEIRA C, MAGEHEIM R, EVANS DG. Guidelines for the Li-Fraumeni and heritable TP53-related cancer syndromes. **Eur J Hum Gent** v. 28, n. 10, p. 1379-1386, Out 2020.

GARRITANO S, GEMIGNANI F, PALMERO EL, OLIVIER M, MARTEL-PLANCHE G, CALVEZ-KELM FL, BRUGIÈRES L, VARGAS FR, RENZO RB, ASHTON-PROLLA P, TAVTIGIAN SV, HAINAUT P, ACHATZ MIW. Detailed haplotype analysis at the *TP53* locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat** v. 31, p. 143-150, fev 2010.

GHAZI AAM, MOFID D, SALEHIAN MT, AMIRBAIGLOO A, ZARE K, JAFARI B, RAHIMI F. Functioning adrenocortical tumors in children-secretory behavior. **J Clin Res Pediatr Endocrinol** v.5, n.1, p.27-32, 2013.

GONDKAR K, PATEL K, OKALY GVP, NAIR B, PANDEY A, GOWDA H, KUMAR P. Dickkopf Homolog 3 (*DKK3*) acts as a potential tumor suppressor in gallbladder cancer. **Front Oncol** 9:1121, outubro 2019.

GRUBELNIK G, BOŠTJANČIČ E, GROŠEKJ A, ZIDAR N. Expression of NANOG and its regulation in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Research International** Jul 2020.

GULACK BC, RIALON KL, ENGLUM BR, KIM J, TALBOT LJ, ADIBE OO, RICE HE TRACY ET. Factors associated with survival in pediatric adrenocortical carcinoma: An analysis of the National Cancer Data Base (NCDB). **J Pediatr Surg** v. 51, n. 1, p. 172-177, Jan 2016.

GUO J, TANG T, LI J, YANG Y, QUAN Y, ZHANG L, HUANG W, ZHOU M. Overexpression of miR-142-5p suppresses the progression of cervical cancer through targeting PIK3AP1 expression. **Mol Cell Biol** MCB.00363-20, Dez 2020.

GUPTA N, RIVERA M, NOVOTNY P, RODRIGUES V, BANCOS I, LTEIF A. Adrenocortical carcinoma em children: A clinicopathological analysis of 41 patients at Mayo Clinic from 1950 to 2017. **Horm Res Paediatr** v. 90, p. 8-18, 2018.

HABRA MA, EJAS E, FENG L, DAS P, DENIZ F, GRUBBS EG, PHAN A, WAGUESPACK SG, AYALA-RAMIREZ M, JIMENEZ C, PERRIER ND, LEE JE, VASSILOPOULOU-SELLIN R. a Retrospective cohort abalysis of the efficacy of adjuvant radiotherapy after primary surgical resection in pacientes with adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab** v.98, n.1, p. 192-197, 2013.

HABRA MA, SUKKARI MA, HASAN A, ALBOUSEN Y, ELSHESHTAWI MA, JIMENEZ C, CAMPBELL M, KARAM JA, GRAHAM PH, HATIA RI, PHAN AT, VARGHESE J, HASSAN MM. Epidemiological risk factors for adrenocortical carcinoma: a hospital-based case-control study. **Int J Cancer** v. 146, n. 7, p. 1836-1840, abril 2020.

HAMMOND SM. An overview of microRNAs. **Adv Drug Deliv Rev** v. 87, p. 3-14, Jun 2015.

HAYLES AB, HAHN HB, SPRAGUE RG, BAHN RC, PRIESTLEY JT. Hormone-secreting tumors of the adrenal cortex in children. **Pediatrics** v. 37, p. 19-25, 1966.

HE L, THOMPSON JM, HEMANN MT, HERNAN-MONGE E, MU D, GOODSON S, POWERS S, CORDOON-CARDO C, LOWE SW, HANNON GJ, HAMMOND S. A micro-RNA polycistron as a potencial human oncogene. **Nature** v. 435, n. 7043, p. 828-833, jun 2005.

HE Z, DANG J, SONG A, CUI X, MA Z ZHANG Y. The involvement of miR-150/ β -catenin axis in colorectal cancer progression. **Biomedicine & Pharmacotherapy** v. 121, Jan 2020.

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

HUANG S, GUO H, CAO Y, XIONG J. Mir-708-5p inhibits the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma by targeting Sirt3. **Pathol Res Pract** v. 215, n. 4, p. 794-800, Abril 2019.

ISLAM F, GOPALAN V, VIDER J, LU CT, LAM AKY. MiR-142-5p act as an oncogenic microRNA in colorectal cancer: clinicopathological and functiona insights. **Exp Mol Pathol** v. 104, n.1, p. 98-107, Fev 2018.

JIANG X, HUANG H, LI Z, LI Y, WANG X, GURBUXANI S, CHEN P, HE C, YOU D, ZHANG S, WANG J, ARNOVITZ S, ELKAHLOUN A, PRICE C, HONG GM, REN H, KUNJAMMA RB, NEILLY MB, MATTHEWS J, XU M, LARSON RA, LE BEAU MM, SLANY RK, LIU PP, LU J, ZHANG J, HE C, CHEN J. Blockade of miR-150 maturation by *MLL*-fusion/*MYC*/*LIN-28* is required for *MLL*-associated leukemia. **Cancer Cell** v. 22, n. 4, p. 524-535, Oct 2012.

KAMILARIS, CDC, HANNAH-SHMOUNI F, STRATAKIS CA. Adrenocortical tumorigenesis: Lessons from genetics. **Best practice & research clinical endocrinology & metabolism** v. 34, n.3, 2020.

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

KRATZ CP, ACHATZ MI, BRUGIERES L, FREBOURG T, GARBER JE, GREER MLC, HANSFORD JR, JANEWAY KA, KOHLMANN WK, McGEE R, MULLIGHAN CG, ONEL K, PAJTLER KW, PFISTER SM, SAVAGE SA, SCHIFFMAN JD, SCHNEIDER KA, STRONG LC, EVANS DGR, WASSERMAN JD, VILLANI A, MALKIN D. Cancer screening recommendations for individuals with Li-Fraumeni syndrome. **Clin Cancer Res** v. 23, n. 11, e38-e45, Jun 2017.

KRISHNAMURTHY N, KURZROCK R. Targeting the Wnt/ β -catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. **Cancer Treat Rev** v. 62, p.50-60, Jan 2018.

LALLI E. Adrenal cortex ontogenesis. **Best practice & Research Endocrinology & Metabolism** v. 24, p. 853-864, 2010.

KARDOONI H, GONZALEZ-GUALDA E, STYLIANAKIS E, SAFFARAN S, WAXMAN J, KYPTA RM. CRISPR-mediated reactivation of DKK3 expression attenuates TGF- β signaling in prostate cancer. **Cancers (Basel)** v. 10, n. 6, 165, junho 2018.

LEAL LF, MERMEJO LM, RAMALHO LZ, MARTINELLI CE, YUNES JA, SEIDINGER AL, MASTELLARO MJ, CARDINALI IA, BRANDALISE SR, MOREIRA AC, TONE LG, SCRIDEI CA, CASTRO M, ANTONINI SR. Wnt/ β -catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** v. 96, n. 10, p. 3106-3114, out, 2011.

LEAL LF, BUENO AC, GOMES DC, ABDUCH R, CASTRO M, ANTONINI SR. Inhibition of the Tcf/ β -catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis. **Oncotarget** v. 6, n. 40, p. 43016-43032, Dez 2015.

LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell** v 75, n. 5, p. 843-854, 1993.

LEE EJ, JO M, RHO SB, PARK K, YOO YN, PARK J, CHAE M, ZHANG W, LEE JH. Dkk3, downregulated in cervical cancer, functions as a negative regulator of beta-catenin. **Int J Cancer** v. 124, n. 2, p. 287-297, janeiro 2009.

LEONCINI PP, BERTAINA A, PAPAIOANNOU D, FLOTHO C, MASETTI R, BRESOLIN S, MENNA G, SANTORO N, ZECCA M, BASSO G, NIGITA G, VENEZIANO D, PAGOTTO S, D'OVIDIO K, ROTA R, DORRANCE A, CROCE CM, NIEMEYER C, LOCATELLI F, GARZON R. MicroRNA fingerprints in juvenile myelomonocytic leukemia (JMML) identified miR-150-5p as a tumor suppressor and potential target for treatment. **Oncotarget** v. 7, n. 34, p. 55395–55408, 2016.

LI Y, LI H, WEI X. Long noncoding RNA LINC00261 suppresses prostate cancer tumorigenesis through upregulation of GATA6-mediated DKK3. **Cancer cell Int** 20:474, setembro 2020.

LIU S, DING G, ZHOU Z, FENG C. β -catenin-driven adrenocortical carcinoma is characterized with immune exclusion. **Onco Target Ther** v. 11, p. 2029-2036, Abril 2018.

LIU H, CHEN R, KANG F, LAI H, WANG Y. KCNQ1OT1 promotes ovarian cancer progression via modulation of miR-142-5p/CAPN10 axis. **Mol genet Genomic Med** v.8, n.2, e1077, Fev 2020.

LIVAK KJ, SCHMITTGEN TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. **Methods** v. 25, p.402-408, 2001.

LOFTI CFP, KREMER JL, PASSAIA BS, CAVALCANTE IP. The human adrenal cortex: growth control and disorders. **Clinics (São Paulo)** v.73, suppl1, e 473s, Set 2018.

LU J, GETZ G, MISKA EA, ALVAREZ-SAAVEDRA E, LAMB J, PECK D, SWEET-CORDERO A, EBERT BL, MAK RH, FERNANDO AA, DOWNING JR, JACKS T,

HORVITZ HR, GOLUB TR. MicroRNA expression. Profiles classify human cancers. **Nature** v. 435, n. 7043, p. 834-838, Jun 2005.

MA L, TERUYA-FEDSTEIN J, WEINBERG R. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. **Nature** v. 449, n. 7163, p. 682-688, outubro 2007.

MARQUES-PEREIRA R, DELACERDA L, LACERDA H, MICHALKIEWICZ E, SANDRINI F, SANDRINI R. Childhood adrenocortical tumors: a review. **Hereditary cancer in clinical practice** v.4, n.2, p. 81-89, 2006.

MASTELLARO MJ, RIBEIRO RC, OLIVEIRA-FILHO AG, SIDINGER AL, CARDINALI IA, MIRANDA ECM, AGUIAR SS, BRANDALISE SR, YUNES JÁ, BARROS-FILHO AA. Adrenocortical tumors associated with the *TP53* p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. **J Pediatr** v.94, n.4, p. 432-439, 2018.

McATEER JP, HUACO JA, GOW KW. Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: A Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study. **J Pediatr Surg** v. 48, p. 1025-1031, 2013.

MERMEJO LM, LEAL LOBO FRONTAL, COLLI LM, FRAGOSO MCBV, LATRONICO AC, TONE LG, SCRIDEI CA, TUCCI S, MARTINELLI CE, YUNES JA, MASTELLARO MJ, SEIDINGER AL, BRANDALISE SR, MOREIRA AC, RAMALHO LN, ANTONINI SR, CASTRO M. Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumors. **Clinical Endocrinology** v. 81, p. 503-510, 2014.

MICHALKIEWICZ E, SANDRINI R, FIGUEIREDO B, MIRANDA ECM, CARAN E, OLIVEIRA-FILHO AG, MARQUES E, PIANOVSKI MAD, LACERDA L, CRISTOFANI LM, JENKINS J, RODRIGUEZ-GALINDO C, RIBEIRO R. Clinical and Outcome Characteristics of Children with Adrenocortical Tumors: A Report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol** v. 22, n. 5, p. 838-845, mar 2004.

MITCHELL OS, PARKIN RK, KROH EM, FRITZ BR, WYMAN SK, POGOSOVA-AGADJANYAN EL, PETERSON A, NOTEBOOM J, O'BRIAN KC, ALLEN A, LIN DW, URBAN N, DRESCHER CW, KNUDSEN BS, STIREWALT DL, GENTLEMAN R, VESSELLA RL, NELSON OS, MARTIN DB, TEWARI M. Circulation microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A** v. 105, n. 30, p. 10513-10518, jul 2008.

MONTEIRO NML, RODRIGUES KES, VIDIGAL PVT, OLIVEIRA BM. Carcinoma Adrenal em crianças: estudo longitudinal em Minas Gerais, Brasil. **Ver Paul Pediatr** v.31, n. 1, p. 20-26, 2019.

MONTELEONE NJ, LUTZ CS. MiR-708-5p: a microRNA with emerging roles in cancer. **Oncotarget** v. 8, n.41, p. 71292-71216, Ago 2017.

MONTELEONE NJ, LUTZ CS. MiR-708-5p enhances erlotinib/paclitaxel efficacy and overcomes chemoresistance in lung cancer cells. **Oncotarget** v. 11, n. 51, p. 4699-4721, Dez 2020.

MOORE KL, PERSAUD TVN, TORCHIA MG. **Embriologia Clínica**. 10ª ed. Elsevier, 2016. 708p. ISBN 978-85-352-8503-1.

OLIVEIRA JC, SCRIDEI CA, BRASSESCO MS, YUNES JÁ, BRANDALISE SR, TONE LG. MiR-708-5p is differentially expressed in childhood acute lymphoblastic leukemia but not strongly associated to clinical features. **Pediatr Blood Cancer** v. 62, n. 1, p. 177-178, Jan 2015.

PASKULIN DD, GIACOMAZZI J, ACHATZ MI, COSTA S, REIS RM, HAINAUT P, SANTOS SEB, 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** v. 10, n. 11, e0143262, 2015.

PEI Y, TANG Z, CAI M, YAO Q, XIE B, ZHANG X. The E2F3/miR-125a/DKK3 regulatory axis promotes the development and progression of gastric cancer. **Cancer Cell Int** 19:212, Ago 2019.

PICARD C, ORBACH D, CARTON M, BRUGIERES L, RENAUDIN K, AUBERT S, DIJOU F. Revisiting the role of pathological grading in pediatric adrenal cortical tumors: results from a national cohort study with pathological review. **Mod Pathol** v.32, n.4, p. 546-559, abril 2019.

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

PINTO E, ZAMBETTI GP. What 20 years of research has taught us about the *TP53*p.R337H mutation. **Cancer** v.26, n.21, p.4678-4686, nov 2020.

PRODROMALI E, KORPETINO A, GIANNOPOULOU E, VLOTINO E, CHATZIATHANASIADOU M, PAPACHRISTOU NI, SCOPA CD, PAPADAKI H, KALOFONOS HP, PAPACHRISTOU DJ. Expression of microRNA regulators Drosha, Dicer and Ago2 in non-small cell lung carcinomas. **Cell Oncol** v.38, p.307-317, 2015.

REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, PASQUINELLI AE, BETTINGER JC, ROUGVIE AE, HORVITZ HR, RUVKUN G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing on *Caenorhabditis elegans*. **Nature** v. 403, n.6772, p. 901-906, 2000.

RIBEIRO RC, MICHALKIEWICZ EL, FIGUEIREDO BC, DELACERDA L, SANDRINI F, PIANOVSKY MD, SAMPAIO G, SANDRINI R. Adrenocortical tumors in children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 33, p. 1225-1234, 2000.

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

RIBEIRO RC, PINTO EM, ZAMBETTI GP, RODRIGUEZ-GALINDO C. The International

Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: Contributions to clinical biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology** v.351, p.37-43, 2012.

RICARTE FILHO JCM, KIMURA ET. MicroRNAs: Nova classe de reguladores gênicos envolvidos na função endócrina e câncer. **Arq Bras Endocrinol Metab** v.50, n.6, p. 1102-1107, 2006.

ROBERTO GM, VIEIRA GM, DELSIN LEA, SILVA MO, HAKIME RG, ENGEL EE, SCRIDELI CA, TONE LG, BRASSESCO MS. MiR-708-5p is inversely associated with EWS/FLI1 Ewing sarcoma but does not represent a prognostic predictor. **Cancer Genet** v. 230, p. 21-27, Jan 2019.

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

RONCHI C, SBIERA S, LEICH E, HENZEL K, ROSENWALD A, ALLOLIO B, FASNATCH M. Single nucleotide polymorphism array profiling of adrenocortical tumors – evidence for an adenoma carcinoma sequence? **PLoS One** v. 8, n. 9, e73959, Set 2013.

RONCHI C, SBIERA S, ALTIERI B, STEINHAEUER S, WILD V, BEKTESHI M, KROISS M, FASSNACHT M, ALLOLIO B. Notch1 patchway in adrenocortical carcinomas: correlations with clinical outcome. **Endocr Relat Cancer** v. 22, n. 4, p. 531-543, Ago 2015.

SABOLCH A, FENG M, GRIFFITH K, HAMMER G, DOHERTY G, BEN-JOSEF E. Adjuvant and definitive radiotherapy for adrenocortical carcinoma. **Int J Radiation Oncology Biol Phys** v.80, n.5, p. 1477-1484, 2011.

SAITO Y, SUZUKI H, TSUGAWA H, NAKAGAWA I, MATSUZAKI J KANAI Y, HIBI T. Chromatin remodeling at Alu repeats by epigenetic treatment activates silenced microRNA-512-5p with downregulation of Mcl-1 in human gastric cancer cells. **Oncogene** v. 28, n. 30, p. 2738-2744, jul 2009.

SALES P. **O Essencial em endocrinologia**. São Paulo, Roca, 2016.

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

SANDRINI F, VILLANI DP, TUCCI S, MOREIRA AC, CASTRO M, ELIAS LLK. Inheritance of R337H *p53* gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. **Horm Metab Res** v. 37, p. 231-235, 2005.

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

SCHMITZ KJ, HELWIG J, BERTRAM S, SHEU SY, SUTTORP AC, SEGGEWIB J, WILLSCHER E, WALZ MK, WORM K, SCHMID KW. Differential expression of

microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumors. **J Clin Pathol** v.64, n.6, p. 529-535, Jun 2011.

SHAILESH H, SIVEEN KS, SIF S. Protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) activates WNT/ β -catenin signaling in breast cancer cells via epigenetic silencing of DKK1 and DKK3. **J Cell Mol Med** v. 25, n. 3 p. 1583-1600, fevereiro 2021.

SEIDINGER AL, CAMINHA IP, MASTELARO MJ, GABETTA CS, NOWILL AE, PINHEIRO VRP, YUNES JA. TP53 p.Arg337His geographic distribution correlates with adrenocortical tumor occurrence. **Mol Genet Genomic Med** v.8, n.9, e1168, Set 2020.

SIMON DP, GIORDDANO TJ, HAMMER GD. Upregulated JAG1 enhances cell proliferation in adrenocortical carcinoma. **Clin Cancer Res** v. 18, n. 9, p. 2452-2464, Maio 2012.

STEWART DJ. Wnt signaling pathway in non-small lung cancer. **J Natl Cancer Inst** v. 106, n. 1, djt356, Jan 2014.

SUI C, LIU D, HU Y, ZHANG L. MicroRNA-708-5p affects proliferation and invasion of osteosarcoma cells by targeting URGCP. **Exp Ther Med** v. 17, n. 3, p. 2235-2241, Mar 2019.

SUN N, WU Y, NANBA K, SBIERA S, KIRCHER S, KUNZKE T, AICHLER M, BEREZOWSKA S, REIBETANZ J, RAINEY W, FASSNACHT M, WALCH A, KROISS M. High-Resolution tissue mass spectrometry imaging reveals a refined functional anatomy of human adult adrenal gland. **Endocrinology** v. 159, n. 3, p. 1511—1524, 2018.

SUN JD, LI XM, LIU JL, LI J, ZHOU H. Effects of miR-150-5p on cerebral infarction rats by regulating the Wnt signaling pathway via p53. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** v. 24, n. 7, p. 3882-3891, Abril 2020.

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

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

TIAN W, ZHU W, JIANG J. miR-150-5p suppresses the stem cell-like characteristics of glioma cells by targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Cell Biology International** v. 22, p. 1156-1167, 2020.

TÖMBÖL Z, SZABÓ PM, MOLNÁR V, WIENER Z, TÖLGYESI G, HORÁNYI J, RIESZ P, REISMANN P, PATÓCS A, LIKO I, GAILLARD RC, FALUS A, RÁCZ K, IGÁZ P. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction and pathway analysis. **Endocrine-Related Cancer** v. 16, p.895-906, 2009.

TUCCI JR S, MARTINS ACP, SUAID HJ, COLOGNA AJ, REIS RB. The impact of tumor

stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. **J Urol** v. 174, n. 6, p. 2338-2342, dez 2005.

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

VISHNOI A, RANI S. MiRNA biogenesis and regulation of diseases: An overview. In: Rani S. (eds) **MicroRNA Profiling. Methods in Molecular Biology**, vol 1509. Humana Press, New York, NY, 2017.

VOLC SM, RAMOS CRN, GALVÃO HCR, FELICIO OS, COELHO AS, BERARDINELLI GN, CAMPACCI N, SABATO CS, ABRAHAO-MACHADO LF, SANTANA IVV, CAMPANELLA N, LENGERT AH, VIDAL DO, REIS RM, DANTAS CF, COELHO RC, BOLDRINI E, SERRANO SV, PALMERO EI. The brazilian T53 mutation (R337H) and sarcomas. **PLoS One** v. 15, n. 1, e0227260, Jan 2020.

WANG F, REN X, ZHANG X. Role of microRnA in solid tumors (Review). **Oncology Letters** v. 10, p. 11-16, 2015.

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

WIENECKE JA, THOMPSON LDR, HEFFESS CS. Adrenal cortical neoplasms en the pediatric population: A clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **Am J Surg Pathol** v. 27, p. 867-881, 2003.

WU X, XIA M, CHEN D, WU F, LV Z, ZHAN Q, JIAO Y, WANG W, CHEN G, AN F. Profiling of downregulated blood-circulating miR-150-5p as a novel tumor marker for cholangiocarcinoma. **Tumour Biol** v. 37, n. 11, p. 15019–15029, 2016.

WU X, XU J, WANG J, GU W, ZOU C. Childhood adrenocortical tumor. A clinical and immunohistochemical study of 13 cases. **Medicine (Baltimore)** v. 98, n.46, e17921, 2019.

WU X, CUI F, CHEN Y, ZHU Y, LIU F. Long-non-coding RNA LOXL1-AS1 enhances colorectal cancer proliferaton, migration and invasion through miR-708-5p/CD44-EGFR axis. **Onco Targets Ther** v., p. 7615-7627, Ago 2020.

XING Y, LERARIO A, RAINEY W, HAMMER G. Development of adrenal cortex zonation. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 44, n. 2, p. 243-274, Jun 2015.

XU Y, WANG L, JIANG L, ZHANG X. Novel microRNA biomarkers, miR-142-5p, miR-550a, miR-1826, and miR-1201 were identified for primary melanoma. **J Comput Biol** v. 27, n. 5 p. 815-824, Mai 2020.

YANG J, WEI J, WU Z, GUO Y, LI X. Metformin induces ER stress-dependent apoptosis through miR-708-5p/NNAT pathway in prostate cancer. **Oncogenesis** v. 4, n. 6, e158, Jun 2015.

YANG X, ZHAO H, YANG J, MA Y, LIU Z, LI C, WANG T, YAN Z, DU N. MiR-150-5p

regulates melanoma proliferation, invasion and metastasis via SIX1-mediated Warburg effect. **Biochem Biophys Res Commun** v. 515, n. 1, p. 85-91, Jul 2019.

YAO R, XU L, WEI B, QIAN Z, WANG J, HUI H, SUN Y. MiR-142-5p regulates cancer cell proliferation and apoptosis by regulation of RAP1A. **Pathol Res Pract** v. 215, n. 6, 152416, Jun 2019.

YATES R, KATUGAMPOLA H, CAVLAN D, COGGER K, MEIMARIDOU E, HUGHES C, METHERELL L, GUASTI L, KING P. Adrenocortical development, maintenance, and disease. **Curr Top Dev Biol** v. 106, p. 239-312, 2013.

YING SY, CHANG DC, LIN SLL. The Micro RNA. In: Ying SY. (eds) MicroRNA Protocols. **Methods in Molecular Biology**, vol 1733. Humana Press, New York, NY, 2018.

YOUSSEF YM, WHITE NMA, GRIGULL J, KRIZOVA A, SAMY C, MEJIA-GUERRERO S, EVANS A, YOUSEF GM. Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. **Eur Urol** v. 59, n. 5, p. 721-730, maio 2011.

YU J, FENG Y, WANG Y, AN R. Aryl hydrocarbon receptor enhances the expression of miR-150-5p to suppress in prostate cancer progression by regulation MAP3K12. **Arch Biochem Biophys** v. 654, p. 47-64, Set 2018.

YU W, LI D, ZHANG Y, LI C, ZHANG C, WANG L. MiR-142-5p acts as a significant regulator through promoting proliferation, invasion, and migration in breast cancer modulated by targeting SORBS1. **Technol Cancer Res Treat** v 18, 1533033819892264, Jan-Dez 2019.

YU Y, CHANG Z, HAN C, ZHUANG L, ZHOU C, QI X, PENG Z. Long non-coding RNA MINCR aggravates colon cancer via regulation of miR-708-5p-mediated Wnt/ β -catenin pathway. **Biomed Pharmacother** v. 129, :110292, Set 2020.

ZAMBATTI E, DUCI M, DE CORTI F, GAMBA P, DALL'IGNA P, GHIDINI F, VIRGONE C. Clinical prognostic factors in pediatric adrenocortical tumors: A meta-analysis. **Pediatr Blood Cancer** v.68, n.8, e28836, março 2021.

ZEKRI W, HAMMAD M, RASHED WM, AHMED G, ELSHAFIE M, ADLY MH, ELBORAI Y, ABDALLA B, TAHA H, ELKINAAE N, REFAAT A, YOUNIS A, ALFAAR A. The outcome of childhood adrenocortical carcinoma in Egypt: a model from developing countries. **Pediatric Hematology and Oncology**, v.37, n.3, p. 198-210, 2020.

ZHANG J, ZANG K, HOU Y. Long non-coding RNA NNT-AS1 knockdown represses the progression of gastric cancer via modulating the miR-142-5p/SOX4/Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Mol Med Rep** v.22, n.2, p.687-696, Ago 2020.

ZHAO Y, SONG X, NIU L, TANG Y, SONG X, XIE L. Circulating exosomal miR-150-5p and miR-99b-5p as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. **Front Oncol** v. 9, 1129, Out 2019.

ZHAO S, HAO C, ZHAO E, JIAN H, ZHENG H. The suppressing effects of DKK3 expression

on aggressiveness and tumorigenesis of colorectal cancer. **Front Oncol**, 10:600322, novembro 2020.

ZHOU T, WU L, MA, N, TANG F, ZONG Z, CHEN S. LncRNA PART1 regulates colorectal cancer via targeting miR-150-5p/miR-520h/CTNNB1 and activating Wnt/ β -catenin pathway. **Int J biochem Cell Biol** 118:105637, Jan 2020.

ZHU J, HAN S. MiR-150-5p promotes the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of cervical carcinoma cells via targeting SRCIN1. **Pathol Res Pract** v. 215, n. 4, p. 738-747, Abril 2019.

ZHU W, WANG JP, MENG QZ, ZHU F, HAO XF. MiR-142-5p reverses the resistance to gefitinib through targeting HOXD8 in lung cancer cells. **Eur Rev Med Pharmacol Sci** v. 24, n. 8, p. 4306-4313, Abril 2020.

ZHU J, ZHOU L, WEI B, QIAN Z, WANG J, HUI H, SUN Y. miR-142-5p inhibits pancreatic cancer cell migration and invasion by targeting PIK3CA. **Mol Med Rep** v. 22, n. 3, p. 2085-2092, Set 2020.

ZOU SL, CHEN YL, GE ZZ, QU YY, CAO Y, KANG ZX. Downregulation of serum exosomal miR-150-5p is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. **Cancer Biomark** v. 26, n. 1, p. 69-77, 2019.

APÊNDICE A

Descrição das sondas dos miRNAs e genes utilizadas neste estudo.

Gene / miRNA	Código	Catálogo	Empresa
hsa-miR-139-3p	RT0023/3	PN4427975	ThermoFisher
hsa-miR-150-5p	RT000473	PN4427975	ThermoFisher
hsa-miR-708-5p	RT002341	PN4427975	ThermoFisher
hsa-miR-34a-5p	RT000426	PN4427975	ThermoFisher
hsa-miR-214-3p	RT002306	PN4427975	ThermoFisher
hsa-miR-142-5p	RT002248	PN4427975	ThermoFisher
RNU44	RT001094	PN4427975	ThermoFisher
RNU48	RT001006	PN4427975	ThermoFisher
<i>GUS</i>	Hs00939627_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>NOTCH1</i>	Hs01062014_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>NOTCH2</i>	Hs01050702_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>DKK3</i>	Hs00247429_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>CTNNB1</i>	Hs00355049_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>TP53</i>	Hs01034249_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>AXIN2</i>	Hs06110344_m1	PN4331182	ThermoFisher
<i>GSK3B</i>	Hs01047719_m1	PN4331182	ThermoFisher

APÊNDICE B

Descrição dos pacientes com tumor adrenal.

ID	Idade	Sexo	Cor	Tempo Sintoma	Sintoma	Tamanho (cm ³)	Peso (g)	p.R337H	Sandrini*	IPACR2	Weiss >3	Recidiva	Status	OS	EFS
7	22	F	NB	12	Viriliz	6,28	10	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	173	173
54	101	F	B	48	Viriliz	527,18	580	Sim	2	2	Sim	Sim	Óbito	20	20
58	27	M	B	12	Viriliz	78,81	80	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	274	274
94	23	M	B	6	Viriliz	36,61	30	NR	1	1	NR	Não	Vivo	162	162
105	11	M	B	4	Viriliz	41,19	25,9	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	101	101
133	101	F	B	0	Ausente	451,87	280	Sim	3	3	NR	Não	Vivo	288	288
148	20	M	B	22	Viriliz	36,24	60	Sim	1	1	Sim	Sim	Vivo	152	7
150	137	F	B	6	Ausen	1725,9	2350	Não	2	2	Sim	Sim	Vivo	218	53
164	95	F	B	3	Misto	191,29	230	Sim	4	4	Sim	Sim	Óbito	15	7
171	92	F	B	4	Viriliz	284,51	380	Sim	4	4	Sim	Sim	Óbito	29	9
195	13	M	B	4	Viriliz	28,11	40	Não	1	1	Não	Não	Vivo	206	206
209	85	F	B	9	Viriliz	0,94	3,3	Não	1	1	Não	Não	Vivo	202	202
235	28	F	B	20	Misto	423,63	377	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	262	262
351	18	F	B	6	Viriliz	2,35	5	NR	1	1	Não	Não	Vivo	182	182
360	14	M	B	5	Viriliz	76,88	121	Sim	2	2	NR	Não	Vivo	215	215
361	36	F	B	NR	Viriliz	14,06	16	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	177	177
383	18	F	B	8	Viriliz	39,23	35	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	246	246
387	185	M	B	14	Cushing	585,76	703	Sim	4	4	Sim	Sim	Óbito	8	8
525	33	M	NB	2	Cushing	1059,08	828	Sim	4	4	Sim	Sim	Óbito	7	5

NR -Não realizado/Não referido

Os tempos estão em meses.

* Sandrini modificado (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005)

ID	Idade	Sexo	Cor	Tempo Sintoma	Sintoma	Tamanho (cm ³)	Peso (g)	p.R337H	Sandrini*	IPACTR2	Weiss >3	Recidiva	Status	OS	EFS
545	34	M	B	NR	Viriliz	26,65	28,5	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	227	227
686	22	F	B	9	Viriliz	16,57	20	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	16	16
698	145	F	B	3	Cushing	82,37	53	Não	1	1	Não	Não	Vivo	174	174
799	66	F	B	2	Misto	376,56	351	Sim	4	4	Sim	Sim	Óbito	15	6
922	23	F	B	2	Viriliz	11,71	39	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	174	174
950	5	F	B	NR	Viriliz	91,79	153	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	176	176
1023	14	M	B	6	Viriliz	15,79	20	Sim	1	1	NR	Não	Vivo	174	174
1116	40	F	B	NR	Viriliz	18,83	15	Não	1	1	Não	Não	Vivo	163	163
1340	82	M	B	24	Misto	59,62	108	Sim	2	2	Sim	Sim	Óbito	7	4
1393	21	F	B	10	Viriliz	56,48	84	Sim	2	2	Não	Sim	Vivo	11	11
1455	18	F	B	9	Viriliz	125,52	151	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	120	120
1525	34	F	B	10	Misto	3,77	9	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	131	131
1825	57	F	B	12	Misto	6,98	14	Não	1	1	Sim	Não	Vivo	105	105
1993	21	F	NB	4	Viriliz	36,61	41	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	101	101
2049	15	F	B	NR	Misto	15	NR	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	84	84
2329	157	F	B	0	Ausente	16,11	154	Não	2	2	Não	Não	Vivo	83	83
2451	15	M	B	2	Viriliz	36,59	50	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	58	58
2461	18	F	B	6	Misto	17,57	19	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	65	65
2575	9	F	B	0	Ausente	11,13	9	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	53	53
2591	18	F	NB	3	Misto	57,53	77	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	57	57

NR -Não realizado/Não referido

Os tempos estão em meses.

* Sandrini modificado (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005)

ID	Idade	Sexo	Cor	Tempo Sintoma	Sintoma	Tamanho (cm ³)	Peso (g)	p.R337H	Sandrin [†] *	IPACTR2	Weis >3	Recidiva	Status	OS	EFS
2637	25	F	B	2	Misto	16,24	71	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	54	54
2711	35	F	B	2	Misto	520,12	402	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	39	39
14606	18	F	B	1	Misto	56,01	50	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	36	36
16007	16	F	B	3	Viriliz	15,08	16	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	99	99
17903	21	M	B	5	Ausente	196,58	75	Não	4	4	Sim	Não	Vivo	153	153
1825	57	F	B	12	Misto	6,99	14	Não	1	1	Sim	Não	Vivo	105	105
18903	24	F	B	NR	Viriliz	1,67	17	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	153	153
23407	12	F	B	4	Viriliz	17,79	40	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	113	113
26406	92	F	B	24	Viriliz	73,22	102	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	125	125
29091	14	M	NB	6	Misto		7	Sim	4	4	Sim	Sim	Vivo	166	10
32804	10	F	B	3	Viriliz	40,27	50	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	147	147
35104	29	F	B	15	Viriliz	0,23	40	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	50	50
38701	16	F	B	1	Misto	192,82	150	Sim	2	2	Sim	Não	Óbito	0	0
39499	111	F	B	6	Misto	527,18	520	Sim	2	2	Sim	Sim	Óbito	9	3
40007	15	F	B	3	Viriliz	12	70	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	109	109
41003	119	M	B	2	Viriliz	164,75	155	Sim	2	2	Sim	Sim	Óbito	21	9
41203	187	F	B	24	Viriliz	596,22	634	Não	2	2	Sim	Não	Vivo	133	133
41503	17	F	B	3	Misto	344,2	395	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	140	140
44608	22	F	B	2	Misto	52	84	Sim	1	1	Sim	Sim	Óbito	28	23

NR -Não realizado/Não referido

Os tempos estão em meses.

* Sandrini modificado (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005)

ID	Idade	Sexo	Cor	Tempo Sintoma	Sintoma	Tamanho (cm³)	Peso (g)	p.R337H	Sandrini*	IPACR2	Weiss >3	Recidiva	Status	OS	EFS
47009	16	F	B	1	Viriliz	58,25	68	Sim	2	3	Sim	Não	Vivo	80	80
48705	19	F	B	2	Misto	456,67	228	Sim	3	3	Sim	Não	Vivo	130	130
48708	13	F	NB	1	Viriliz	28,87	25	Sim	2	3	Sim	Não	Vivo	94	94
53201	17	F	B	14	Viriliz	13,71	15	Sim	1	1	Sim	Sim	Vivo	179	3
5705	13	F	B	7	Viriliz	47,07	35	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	133	133
5908	12	M	B	2	Viriliz	109,83	102	Sim	2	2	Sim	Não	Vivo	66	66
59603	12	F	B	9	Viriliz	13,69	15	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	120	120
61301	13	F	NB	7	Viriliz	107,93	120	Não	2	2	Sim	Não	Vivo	172	172
63205	19	F	B	2	Misto	313,8	340	Sim	4	4	Sim	Não	Óbito	7	7
68705	25	F	NB	6	Viriliz	39,43	65	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	123	123
70203	10	F	B	2	Viriliz	15,32	35	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	153	153
74099	44	F	NB	2	Viriliz	40,27	20	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	203	203
74804	52	M	B	4	Viriliz	621,75	810	Sim	2	3	Sim	Não	Vivo	143	143
76202	5	M	B	1	Misto	17,42	20	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	148	148
76602	10	F	NB	1	Viriliz	11,44	20	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	149	149
81108	38	F	B	5	Viriliz	0,45	6	Sim	1	1	Sim	Não	Vivo	90	90
8202	29	F	B	6	Viriliz	49,57	80	Sim	1	1	Sim	Sim	Óbito	16	3
84001	64	F	B	6	Viriliz	34,29	55	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	174	174
9600	17	F	NB	10	Viriliz	25,52	20	Sim	1	1	Não	Não	Vivo	186	186

NR -Não realizado/Não referido

Os tempos estão em meses.

* Sandrini modificado (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005)

ID	Idade	Sexo	Cor	Tempo Sintoma	Sintoma	Tamanho (cm³)	Peso (g)	p.R337H	Sandrini*	IPACTR2	Weiss >3	Recidiva	Status	OS	EFS
100	13	M	B	NR	Misto	NR	NR	NR	3	3	NR	Não	Vivo	241	241
200	46	M	B	8	Viriliz	37,94	44	Sim	2	2	Sim	Sim	Vivo	144	39
300	78	F	B	NR	NR	13,47	NR	Sim	1	1	NR	Sim	Óbito	44	5

NR -Não realizado/Não referido
Os tempos estão em meses.
* Sandrini modificado (RODRIGUEZ-GALINDO et al., 2005)

APÊNDICE C

Tabela com dados das amostras adrenais sem neoplasia

ID	Idade em meses	Doença de base
10305	65	Tu Wilms
23405	64	Tu Wilms
24805	57	Tu Wilms
32305	43	Tu Wilms
33804	5	Tu Wilms
44905	27	Tu Wilms
61003	1	Tu Wilms
67106	27	Tu Wilms
73103	51	Tu Wilms
78104	24	Tu Wilms

APÊNDICE D

Expressão relativa dos miR em neoplasias adrenais versus adrenais não neoplásicas (Mann-Whitney).

MicroRNA	Mediana expressão (mínimo e máximo)		Valor de <i>p</i>
	Tumor	Controle	
miR-150-5p	1,10 (0,00-466,38)	0,80 (0,24-6,96)	0,492
miR-214-3p	0,39 (0,04-56,61)	0,93 (0,55-1,88)	0,008
miR-34a-5p	12,77 (1,83-1.271,58)	0,8 (0,24-6,24)	0,000
miR-139-3p	0,15 (0,01-32,22)	2,8 (0,84-24,34)	0,000
miR-708-5p	2,04 (0,12-125.928,36)	0,67 (0,30-3,66)	0,047
miR-142-5p	1,06 (0,15-1.038,76)	0,00 (0,00-12,46)	0,000

APÊNDICE E

Análise dos miR-150-5p, miR-214-3p e miR-34a-5p, miR-139-3p, miR-142-5p e miR-708-5p
por Mann-Whitney

	miR-150-5p		miR-214-3p		miR-34a-5p	
	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor
Idade	< 3 anos	0,027	0,40 (0,04 – 38,43)	0,749	11,60 (1,83 – 182,75)	0,148
	> 3 anos		0,37 (0,06 – 56,61)		31,66 (3,57 – 1271,58)	
Idade	< 4 anos	0,035	0,39 (0,04 – 38,43)	0,819	11,19 (1,83 – 182,75)	0,077
	> 4 anos		0,37 (0,06 – 56,61)		35,03 (3,57 – 1271,58)	
Cor	Branco	0,037	0,36 (0,04 – 56,61)	0,035	12,7 (1,83 – 1271,58)	0,373
	Não Branco		2,47 (0,92 – 30,77)		30,31 (3,79 – 80,13)	
Sexo	Masculino	0,467	0,46 (0,15 – 38,43)	0,606	12,72 (3,57 – 166,7)	0,739
	Feminino		1,2 (0,12 – 466,38)		12,77 (1,83 – 1271,587)	
Tempo de sintomas	< 4 meses	0,532	1,06 (0,19 – 22,85)	0,003	10,46 (1,92 – 63,61)	0,184
	> 4 meses		1,37 (0 – 466,38)		16,01 (1,83 – 12,71,58)	

	miR-139-3p		miR-142-5p		miR-708-5p	
	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor
Idade	< 3 anos	0,14 (0,01 – 7,83)	0,941	0,465	2,65 (0,3 – 125928,49)	0,095
	> 3 anos	0,16 (0,03 – 32,22)	0,6 (0,01 – 1038,76)		1,58 (0,12 – 111,97)	
Idade	< 4 anos	0,14 (0,01 – 7,83)	0,566	0,201	2,9 (0,12 – 125928,49)	0,598
	> 4 anos	0,25 (0,03 – 32,22)	0,71 (0,01 – 1038,76)		1,54 (0,13 – 139,76)	
Cor	Branco	0,13 (0,01 – 32,22)	0,382	0,023	1,88 (0,12 – 125928,49)	0,086
	Não Branco	0,194 (0,03 – 2,83)	2,18 (0,89 – 51,21)		3,93 (1,47 – 22,22)	
Sexo	Masculino	0,18 (0,03 – 3,29)	0,848	0,693	1,47 (0,4 – 56,48)	0,738
	Feminino	0,14 (0,01 – 32,22)	1,13 (0,06 – 1038,76)		2,4 (0,12 – 125928,49)	
Tempo de sintomas	< 4 meses	0,13 (0,01 – 2,47)	0,134	0,333	1,65 (0,13 – 19,91)	0,020
	> 4 meses	0,19 (0,03 – 32,22)	1,12 (0,01 – 1038,76)		3,11 (0,4-125928,49)	

		miR-150-5p		miR-214-3p		miR-34a-5p	
		Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor
Volume	< 200 cm ³	1,32 (0 – 466,38)	0,069	0,48 (0,06 – 56,61)	0,027	13,8 (1,83 – 1271,58)	0,041
	> 200 cm ³	0,73 (0,05 – 2,72)		0,27 (0,04 – 0,89)		6,3 (1,92 – 118,42)	
Peso	< 100 g	1,32 (0 – 466,38)	0,136	0,49 (0,06 – 56,61)	0,022	13,14 (1,83 – 1153,77)	0,342
	> 100 g	0,76 (0,05 – 43,18)		0,24 (0,04 – 19,14)		10,38 (1,92 – 1271,58)	
Peso	< 200 g	1,32 (0-466,38)	0,034	0,49 (0,06 – 56,61)	0,01	13,44 (1,83 – 1271,58)	0,081
	> 200 g	0,7 (0,05 – 2,72)		0,24 (0,04 – 0,89)		6,87 (1,92 – 118,42)	
Peso	< 400 g	1,37 (0 – 466,38)	0,056	0,47 (0,06 – 56,61)	0,078	12,84 (1,83 – 1271,58)	0,195
	> 400 g	0,69 (0,05 – 2,45)		0,26 (0,04 – 0,89)		7,75 (1,92 – 118,42)	
p.R337H	Presente	1,06 (0 – 466,38)	0,671	0,38 (0,04 – 56,61)	0,544	12 (1,83 – 1271,58)	0,342
	Ausente	1,71 (0,21 – 8,79)		0,56 (0,13 – 2,19)		30,31 (3,73 – 54,88)	
Weiss	< 3	1,06 (0,05 – 135,62)	0,907	0,37 (0,04 – 19,14)	0,062	11,19 (1,92 – 1271,58)	0,182
	≥ 3	1,42 (0-466,38)		0,7 (0,07 – 56,61)		33,52 (1,83 – 1153,77)	
Óbito	Não	1,4 (0 – 466,38)	0,017	0,39 (0,04 – 56,61)	0,552	12,7 (1,83 – 1271,58)	0,450
	Sim	0,48 (0,05 – 33,26)		0,33 (0,06 – 2,1)		22,12 (3,57 – 169,53)	

	miR-139-3p		miR-142-5p		miR-708-5p	
	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor	Mediana (min-máx)	p-valor
Volume	< 200 cm ³	0,15 (0,03 – 32,22)	0,394	0,064	3 (0,12 – 125928,49)	0,016
	> 200 cm ³	0,13 (0,01 – 1,76)			1,36 (0,13 – 8,81)	
Peso	< 100 g	0,15 (0,03 – 32,22)	0,175	0,132	2,97 (0,12 – 125928,49)	0,060
	> 100 g	0,11 (0,01 – 7,03)			1,49 (0,13 – 139,76)	
Peso	< 200 g	0,15 (0,03 – 32,22)	0,306	0,028	2,97 (0,12 – 125928,49)	0,016
	> 200 g	0,12 (0,01 – 1,76)			1,39 (0,13 – 8,81)	
Peso	< 400 g	0,14 (0,01 – 32,22)	0,94	0,119	2,9 (0,12 – 125928,49)	0,152
	> 400 g	0,20 (0,02 – 1,76)			1,42 (0,4 – 8,17)	
p.R337H	Presente	0,13 (0,01 – 32,22)	0,063	0,215	2,64 (0,13 – 125928,49)	0,342
	Ausente	0,78 (0,09 – 3,29)			1,47 (0,12 – 34,59)	
Weiss	< 3	0,13 (0,01 – 7,03)	0,050	0,645	2 (0,13 – 139,76)	0,076
	≥ 3	0,69 (0,03 – 32,22)			14,15 (0,12 – 125928,49)	
Óbito	Não	0,14 (0,01 – 32,22)	0,930	0,376	2,05 (0,12 – 125928,49)	0,766
	Sim	0,20 (0,03 – 2,47)			4,17 (0,13 – 42,59)	

APÊNDICE F

Efeito da inibição do miR-150 na linhagem celular H295A

ANEXO A

Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br

USP - RIBEIRÃO
assistência - ensino - pesquisa

Ribeirão Preto, 23 de julho de 2010

Ofício nº 2436/2010
CEP/MGV

Prezado Professor,

O trabalho intitulado **“ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8380/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. CARLOS ALBERTO SCRIDEI
 Depto. de Puericultura e Pediatria

ANEXO B

Protocolos utilizados no Laboratório de Biologia Molecular da Unidade de Oncologia e Hematologia Pediátrica – FMRP/USP

Água tratada com DEPC

Acrescentar dietilpirocarbonato (DEPC) ao volume de água desejado para uma concentração final de 0,1%.

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

Extração de RNA com TRIzol®

O RNA total é isolado dos tecidos microdissecados macerados (sistema livre de RNase) e linhagens celulares com 80% de confluência utilizando TRIzol® Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA; Cat#. 15596-026) e TRIzol®LS Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA; Cat# 10296-010), respectivamente.

Para as amostras de tecido adiciona-se 1 mL do TRIzol® Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) para cada 50-100 gramas de tecido, para as linhagens celulares 0,75 mL do TRIzol®LS Reagent (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, EUA) para cada 0,25 mL de suspensão celular com aproximadamente 1×10^6 células. As amostras são homogeneizadas, incubadas em temperatura ambiente por cinco minutos para permitir a completa dissociação dos complexos nucleoproteicos. Então é adicionado 200 uL de clorofórmio (Merck, AL) e homogeneizados vigorosamente com as mãos por quinze segundos, incubadas por 3 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 12.000g por 15 minutos a 4°C.

Neste sistema, o RNA permanece exclusivamente na fase aquosa incolor, que é retirado com cuidado, evitando a interfase, e transferido para um novo tubo ao qual é adicionado 500 uL de álcool isopropílico 100% (Merck, AL) e homogeneizado por inversão. As amostras são incubadas em temperatura ambiente por 10 minutos. Após esse tempo, são submetidas a centrifugação por dez minutos a 12.000g a 4°C, o sobrenadante é desprezado e o precipitado lavado com 1 mL de etanol 75% em água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1% (ambos Merck, AL). As amostras são submetidas a uma nova centrifugação por dez minutos a 7.500g a 4°C. O sobrenadante desprezado e o precipitado de RNA seco à temperatura ambiente sendo após ressuspendido em 20 uL de água DEPC 0,1% e estocados a -80° C.

Extração de RNA com RNA/DNA/Protein Purification Kit

Segundo o fabricante, o RNA/DNA/Protein Purification Kit purifica todos os tamanhos de RNAs, desde grandes RNAs (como RNA mensageiro e ribossomal) quanto os pequenos RNAs (como os miRNAs e RNAs silenciadores). O fabricante ainda indica que o RNA resultante é de alta integridade e pode ser aplicado nos ensaios de expressão por qRT-PCR e microarranjo de miRNA.

Resumidamente, no máximo 10 mg de tecido são macerados com auxílio de nitrogênio líquido e adicionados 600 uL de solução de lise. Com auxílio de uma seringa com agulha de 25 gauge (calibre) o lisado foi homogeneizado 10 vezes e transferido para um tubo. O lisado é centrifugado por dois minutos a 14.000 xg para retirada de fragmentos celulares. O sobrenadante transferido para um novo tubo.

O volume do lisado é mensurado, adicionado igual volume de etanol 70% e homogeneizado por 10 segundo em vórtex. Essa solução é então aplicada na coluna e centrifugada por 1-2 minutos a 14.000g. Após aplica-se 400 uL de Solução de Lavagem na coluna e centrifuga-se novamente por 1-2 minutos a 14.000g, este procedimento é repetido 2 vezes. Posteriormente a coluna é alocada em um tubo de 1,7 mL fornecido pelo fabricante e foi adicionado 50 uL da Solução de Eluição e centrifugado por mais 1-2 minutos a 14.000g. Uma segunda eluição é realizada. E a solução após pronta é estocada a -80° C.

Síntese de cDNA para miRNA

O RNA total (100 ng) foi reversamente transcrito com os reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA, #Cat. 4368814) padronizado para uma reação: 2 µL de 10X RT Buffer, 0,25 µL de 25X dNTP Mix (100 mM), 0,25 µL de RNase Out, 1,5 µL de *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (50 U/µL) (*MultiScribe™ MuLV*) e 0,5 µL de cada *primer* (oligonucleotídeo iniciador) específico de transcrição reversa *stem-loop* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada miRNA de estudo (apêndice A). Água ultrapura foi utilizada em quantidade suficiente para volume final de 20 µL.

As temperaturas utilizadas para a síntese de cDNA foram 30 minutos à 16°C, 30 minutos à 42°C, 5 minutos à 85°C e 60 minutos à 4°C.

Síntese de cDNA para gene

O RNA total (100 ng) foi reversamente transcrito com os reagentes do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA, #Cat. 4368814) padronizado para uma reação: 2,5 uL de 10X RT Buffer, 1 uL de 25X dNTP Mix (100 mM), 1,25 uL de *MultiScribe® Reverse Transcriptase* (50 U/μL) (MultiScribe™ MuLV) e 2,5 uL de cada primer (oligonucleotídeo iniciador) específico de transcrição reversa stem-loop (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para cada gene de estudo (apêndice A). Água ultrapura foi utilizada em quantidade suficiente para volume final de 25 uL.

As temperaturas utilizadas para a síntese de cDNA foram 30 minutos à 16°C, 30 minutos à 42°C, 5 minutos à 85°C e 60 minutos à 4°C.