UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DEPARTAMENTO DE PUERICULTURA E PEDIATRIA

MARCELO MACHADO CAVALCANTI

A expressão dos marcadores de células-tronco, SF1 e DAX1 no desenvolvimento do córtex adrenal humano e sua associação com a via Wnt/Beta-catenina na tumorigênese adrenocortical

Ribeirão Preto

2017

MARCELO MACHADO CAVALCANTI

A expressão dos marcadores de células-tronco, SF1 e DAX1 no desenvolvimento do córtex adrenal humano e sua associação com a via Wnt/Beta-catenina na tumorigênese adrenocortical

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

Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente

Opção: Investigação em Pediatria

Orientador: Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini

Ribeirão Preto

2017

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 da Publicação

Preparada pela Biblioteca do Serviço de Biblioteca e Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

Universidade de São Paulo

Cavalcanti, Marcelo Machado

A expressão dos marcadores de células-tronco, SF1 e DAX1 no desenvolvimento do córtex adrenal humano e sua associação com a via Wnt/ Beta-catenina na tumorigênese adrenocortical, Ribeirão Preto, 2017

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Saúde da Criança e do Adolescente.

Orientador: Antonini, Sonir R.

1. Tumorigênese Adrenocortical.
2. Embriogênese do Córtex Adrenal.
3. Câncer infantil
4. Células-tronco cancerígenas.

Nome: Marcelo Machado Cavalcanti

Título: A expressão dos marcadores de células-tronco, SF1 e DAX1 no desenvolvimento do córtex adrenal humano e sua associação com a via Wnt/ Beta-catenina na tumorigênese adrenocortical

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

Área de concentração: Saúde da criança e do adolescente

Opção: Investigação em Pediatria

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini Julgamento: _____
Instituição: FMRP- USP Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Julgamento: _____
Instituição: FMRP- USP Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Julgamento: _____
Instituição: FMRP- USP Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Julgamento: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____ Julgamento: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

À minha família, pelo apoio e amor incondicionais que me auxiliaram a sempre seguir em frente.

A todos os amigos e colegas que sempre colaboraram e me motivaram nesta jornada.

Agradecimentos

Antes de tudo, agradeço a Deus, pois em sua sabedoria infinita, ele nos proporciona a oportunidade de crescermos e evoluirmos, com provações necessárias mas que nunca estão acima de nossa capacidade de superá-las. Acredito que somos seres em continua construção e a Ele devemos agradecer por isto.

Em segundo lugar, à minha família, que é meu núcleo, meu cerne e minha força. Sem o apoio e o amor de minha mãe, Juscilene, e meu irmão, Diogo, me seria impossível seguir o caminho traçado.

Ao Rafael Algarte, pelo exemplo em determinação, pelo companheirismo, paciência, motivação e incentivo essenciais para me manter no meu caminho e, por sempre me impulsionar a seguir.

Ao Fernando Topan, amigo e parceiro, por ser meu irmão "postiço" em Ribeirão Preto, sempre me ajudando, motivando e me socorrendo nos momentos difíceis.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, pelos ensinamentos essenciais desde meus primeiros passos na endocrinologia pediátrica como residente, pelo exemplo na prática médica e por todas as oportunidades que me proporcionou de continuar me aperfeiçoando profissionalmente durante o doutorado.

À Dra. Letícia Ferro Leal, pela colaboração e auxílio neste trabalho.

À Dra. Fernanda Borchers Coeli-Lacchini, pela colaboração e auxílio em parte deste trabalho e, também, pelos ensinamentos e pela amizade.

À Dra. Ana Carolina Bueno, pela colaboração e auxílio neste trabalho, pela dedicação ao laboratório e estar sempre disposta a ajudar.

À Profa. Dra. Leandra N. Z. Ramalho, do Departamento de Patologia da FMRP-USP, cuja colaboração e auxílio foram essenciais nas análises de imunoistoquímica.

À técnica de laboratório, Deisy Mara da Silva, do Laboratório de Patologia e Medicina Legal, pelo auxílio na padronização e confecção das imunoistoquímicas.

À equipe do Centro Infantil Boldrini, pela colaboração neste trabalho. Em especial, à Dra. Izilda Aparecida Cardinalli, à Dra. Maria José Mastellarro e ao Prof. Dr. José Andrés Yunes.

Aos grandes amigos que fiz durante esta jornada, que vivenciaram toda esta experiência comigo. À Danila, pela amizade, incentivo, fé e por me ajudar a crescer como pessoa. À Aline, amiga do abraço sincero, pela ternura, paciência, auxílio e incentivo. À Renata e ao Leonardo, por sempre me ajudarem a rir "mesmo que sem querer", ajudando a tornar os dias mais fáceis.

À amiga e atual companheira de trabalho, Ana Cláudia, pela parceria, determinação e disposição em ajudar sempre que precisei.

Aos amigos, Débora, Sílvia, Clarissa, Sabrina, Rogério, Wendy, Ana Tereza, Maíra, Rafael e Mateus do Laboratório de Endocrinologia - Biologia Molecular HC-FMRP-USP pelo apoio e amizade durante esta caminhada.

Ao Prof. Dr. Ayrton Moreira, pela inestimável contribuição em minha formação como endocrinologista pediátrico e por ser um grande exemplo de motivação, dedicação e amor à ciência e à medicina.

À Profa. Dra Margaret de Castro, pelos ensinamentos em minha formação como endocrinologista pediátrico, na pesquisa e pelo exemplo em dedicação e competência.

À Dra. Paula Elias, sempre humilde e generosa, pelos ensinamentos na minha formação médica e pelo exemplo profissional.

À Dra. Livia Mermejo, pela simpatia e cordialidade, pelos ensinamentos e por ter me dado a honra de tê-la na minha banca de qualificação.

À Profa. Dra. Lucila L. K. Elias, por sua calma e simpatia, sempre solicita e interessada, contribuiu imensamente para este trabalho na minha banca de qualificação e na minha formação médica com seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli, pela contribuição neste trabalho desde meu processo de seleção para doutorado direto no Programa de Pós-graduação em Saúde da Criança e do Adolescente, na banca de qualificação e agora na banca de defesa.

Aos amigos do Laboratório de Endocrinologia - Imunoensaios, José Roberto, Mara e Adriana, pelos ensinamentos no meu primeiro contato com laboratório ainda durante residência em endocrinologia pediátrica. E também, à Helen e Maria Fernanda, pela amizade.

Às secretárias do Departamento de Puericultura e Pediatria, em especial à Ana Lúcia, Sandra e Vera Lúcia, por todo o suporte necessário durante o período de pós-graduação.

À Ana Paula, que apesar do curto tempo em que estamos em contato, foi essencial para que eu mantivesse o foco em minhas metas.

Finalmente, à CAPES, Cnpq e FAPESP, pelo apoio financeiro durante o processo de pós-graduação.

"De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro."

Fernando Sabino

Cavalcanti, M.M. **A expressão dos marcadores de células-tronco, SF1 e DAX1 no desenvolvimento do córtex adrenal humano e sua associação com a via Wnt/ Beta-catenina na tumorigênese adrenocortical.** 2017. 203 f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

Introdução: DAX1 (*NR0B1*), SF1 (*NR5A1*) e a via Wnt controlam o desenvolvimento de células progenitoras/tronco adrenais. NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 estão envolvidos na manutenção de células-tronco e têm papel em vários cânceres de diferentes tecidos. Ainda não está claro se esses fatores de transcrição interagem para promover a tumorigênese adrenocortical.

Objetivo: Nos tumores adrenocorticais (TAC): avaliar o ganho de material genômico e a expressão de RNAm e proteica de DAX1 e SF1; avaliar a expressão de RNAm e proteica de marcadores de células-tronco (NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3). No desenvolvimento do córtex adrenal: avaliar a expressão proteica desses genes. *In vitro*: avaliar a interação entre a via Wnt/Beta-catenina e a expressão de *NANOG*.

Pacientes e Métodos: Pâncreas de 30 córtices adrenais fetais humanos (20-38 semanas de gestação) e 14 pós-natais. Pacientes com TAC: 96 crianças/adolescentes (81% do sexo feminino, idade mediana de 1,6 anos [0,4 a 15,6 anos]) e 18 adultos (10 adenomas e 8 carcinomas, 89% do sexo feminino e idade mediana de 42,5 anos [21-66 anos]). Tecidos adrenais normais (controles para qPCR e MLPA): 13 crianças (idade mediana de 3 anos) e 13 adultos (mediana de idade de 48 anos). A expressão proteica de SF1, DAX1, STAT3, NANOG e OCT4 foi avaliada por imunohistoquímica nos TAC e nos córtices adrenais fetais e pós-natais. A expressão de RNAm de *NR0B1*, *NR5A1*, *STAT3*, *NANOG* e *POU5F1* (OCT4) foi avaliada por qPCR nos TAC. Ganho ou perda de material genômico de *NR0B1* e *NR5A1* foi avaliada por MLPA nos TAC. *In vitro*, a expressão de NANOG (qPCR) foi avaliada em células adrenais H295 antes e após inibição da via Wnt/Beta-catenina com a substância PNU-74654.

Resultados: Em adrenais fetais com 20 e 25 semanas de gestação detectou-se marcação intensa de SF1, DAX1, SOX2 e OCT4 na região subcapsular e marcação leve a moderada e difusa de STAT3 e NANOG. Após as 31 semanas e no período pós-natal, a marcação intensa de SF1 persistiu, porém a marcação de DAX1, STAT3, NANOG e OCT4 diminuiu ou desapareceu. Nos TAC, a marcação nuclear de SF1 foi positiva em 67% das amostras pediátricas e em 19% das amostras de adultos. Ganho de material genômico do *NR5A1* foi observado em 71% dos TAC pediátricos e 33% de TAC adultos. Porém observou-se hipoexpressão do RNAm do *NR5A1* em 84% dos TAC pediátricos. Nenhum ganho de material genômico ou aumento da expressão do RNAm do *NR0B1* foi observado nos TAC pediátricos. Porém em 45% desses tumores detectou-se marcação nuclear. Nos TAC de pacientes adultos, houve aumento da expressão de RNAm de *NR0B1* em 89% das amostras. Não se observou marcação de STAT3 nos TAC pediátricos e adultos. Porém nos pacientes adultos, a expressão do RNAm de *STAT3* foi significativamente maior nos adenomas do que nos carcinomas. Por sua vez, a marcação nuclear do OCT4 associou-se significativamente com a ocorrência de metástases nos pacientes pediátricos. Nos TAC com a mutação p.S45P no gene da Beta-catenina detectou-se expressão significativamente aumentada do RNAm do *NANOG*. Além disso, após a inibição *in vitro* da via Wnt/Beta-catenina nas células tumorais adrenais houve redução significativa na expressão do RNAm de *NANOG*.

Conclusão: Existe um padrão temporal na expressão de SF1, DAX1, STAT3, NANOG e OCT4 durante o desenvolvimento do córtex adrenal fetal, porém apenas a expressão de SF1 permanece no final da gestação e após o nascimento. TAC pediátricos exibem ganho de material genômico, aumento da expressão proteica e aparentemente redução paradoxal do RNAm do SF1 (*NR5A1*). Marcação nuclear de OCT4 se associa a fenótipo tumoral mais agressivo nos pacientes pediátricos. Parece existir interação entre a via Wnt/Beta-catenina e células-tronco, por meio do fator de transcrição NANOG, na tumorigênese adrenocortical.

Palavras-chave: Tumorigênese adrenocortical. Embriogênese do córtex adrenal. Câncer infantil. Células-tronco cancerígenas.

Abstract

Cavalcanti, M.M. **The expression of stem cell markers, SF1 and DAX1 in the human adrenal cortex development and its association with the Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical tumorigenesis** 2017. 203 f. Thesis (PhD)- Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto, 2016.

Background: DAX1 (*NR0B1*), SF1 (*NR5A1*) and the Wnt pathway control adrenal stem/progenitor cells development. NANOG, OCT4, SOX2 and STAT3 are involved in the maintenance of stem cells and have role in various types of cancers in different tissues. It is still unclear whether these transcription factors interact to promote adrenocortical tumorigenesis.

Objective: In adrenocortical tumors (ACT): to evaluate the gain of genomic material and the expression of mRNA and protein of DAX1 and SF1; to evaluate the mRNA and protein expression of stem cell markers (NANOG, OCT4, SOX2 and STAT3). In the development of the adrenal cortex: to evaluate the protein expression of these genes. In vitro: to evaluate the interaction between the Wnt/Beta-catenin pathway and *NANOG* expression.

Patients & Methods: Panel of 30 fetal human adrenal cortices (20-38 gestational weeks) and 14 postnatal human adrenal cortices. ACT Patients: 96 children/ teenagers (81% female; median age of 1.6 years; 0.4-15.6 years) and 18 adults (10 adenomas and 8 carcinomas; 89% female; median age of 42.5 years; 21-66 years). Normal adrenal tissues (qPCR and MLPA controls): 13 children (median age of 3 years) and 13 adults (median age of 48 years). Protein expression of SF1, DAX1, STAT3, NANOG and OCT4 was assessed by immunohistochemistry in ACT, fetal and postnatal adrenal cortices. The mRNA expression of *NR0B1*, *NR5A1*, *STAT3*, *NANOG* and *POU5F1* (OCT4) was assessed by qPCR in ACT. Gain or loss of *NR0B1* and *NR5A1* genomic material was assessed by MLPA in ACT. *In vitro*, *NANOG* expression (qPCR) was evaluated in H295 adrenal cells before and after inhibition of the Wnt/Beta-catenin pathway with PNU-74654.

Results: In the adrenal glands at 20 and 25 gestational weeks, intense staining of SF1, DAX1, SOX2 and OCT4 was detected in the subcapsular region and a diffuse pattern mild to moderate staining of STAT3 and NANOG. After 31 weeks and in the postnatal period, intense SF1 staining persisted, but the staining of DAX1, STAT3, NANOG and OCT4 decreased or disappeared. In the ACT, the nuclear staining of SF1 was positive in 67% of pediatric samples and in 19% of adult samples. Gain of *NR5A1* genomic material was observed in 71% of pediatric ACT and 33% of adult ACT. However, hypoexpression of *NR5A1* mRNA was observed in 84% of pediatric ACT. No gain of genomic material or increase in mRNA expression of *NR0B1* was observed in pediatric ACT. However, in 45% of these tumors nuclear staining was detected. In adult ACT, there was an increase in *NR0B1* mRNA expression in 89% of the samples. No STAT3 staining was found in pediatric and adult ACT. However, in adult ACT, the *STAT3* mRNA expression was significantly higher in adenomas than in carcinomas. In turn, the nuclear marking of OCT4 was significantly associated with the occurrence of metastases in pediatric patients. In the TACs with the p.S45P mutation in the Beta-catenin gene significantly increased NANOG mRNA expression was detected. In addition, after in vitro inhibition of the Wnt / Beta-catenin pathway in adrenal tumor cells there was a significant reduction in NANOG mRNA expression.

Conclusion: There is a temporal pattern in the expression of SF1, DAX1, STAT3, NANOG and OCT4 during the development of the fetal adrenal cortex, but only SF1 expression remains at the end of gestation and after birth. Pediatric ACT show gain in *NR5A1* gene material, increase in its protein expression but an apparent paradoxical reduction of mRNA. Nuclear staining of OCT4 is associated with more aggressive tumor phenotype in pediatric patients. There appears to be an interaction between the Wnt/Beta-catenin pathway and stem cells via NANOG, in adrenocortical tumorigenesis.

Keywords: Adrenocortical tumorigenesis. Adrenal cortex embryogenesis. Childhood cancer, Cancer stem cells.

Lista de Figuras

Figura 1. Embriogênese e morfogênese adrenal	28
Figura 2. Fluxograma de avaliação bioquímica de uma criança sob investigação de TAC..	35
Figura 3. Unificando os modelos de origem das células-tronco/embrionárias adrenais....	49
Figura 4. Esquema do desenho experimental do estudo.....	66
Figura 5. Gráfico ilustrativo demonstrando a integridade do DNA.....	69
Figura 6. MLPA em adrenal normal	70
Figura 7. Fotos de IHQ dos controles positivos usados na padronização	74
Figura 8. Metodologia de confecção de blocos para <i>Tissue array</i>	75
Figura 9. Fotos de IHQ de córtices adrenais em diferentes estágios	81
Figura 10. Fotos de IHQ de córtices adrenais em diferentes estágios	82
Figura 11. Resultados de IHQ em TAC	88
Figura 12. Resultados de IHQ em TAC	89
Figura 13. Expressão do RNAm em amostras de córtices adrenais normais.....	91
Figura 14. Gráficos de expressão gênica em TAC pediátricos	93
Figura 15. Gráficos de expressão gênica em TAC adultos	95
Figura 16. Gráfico demonstrativo da análise de um TAC pediátrico masculino.....	96
Figura 17. Gráficos demonstrativos de análises do MLPA.....	97
Figura 18. Percentual de amostras com alterações nos genes <i>NR5A1</i> e <i>NR0B1</i>	98
Figura 19. Imunofluorescência demonstrando a marcação de NANOG em NCI-H295.....	99
Figura 20. Expressão de <i>NANOG</i> após a inibição da via Wnt/beta-catenina.....	99

Lista de Tabelas

Tabela 1. Exames laboratoriais e de imagem recomendados pelo ENSAT	34
Tabela 2. Estadiamento tumoral	39
Tabela 3. Comparação entre o escore de Weiss e o escore de Wienneke.	41
Tabela 4. Sondas Taqman® utilizadas nos ensaios de qPCR.	72
Tabela 5. Lista de anticorpos usados nos experimentos de IHQ	74
Tabela 6. Resumo dos dados clínicos dos 96 pacientes pediátricos com TAC	84
Tabela 7. Resumo dos dados clínicos dos 18 pacientes adultos com TAC	86

Lista de Abreviaturas

17OHP - 17-hidroxiprogesterona
AAC - adenomas adrenocorticais
CAC - carcinomas adrenocorticais
CDDP - cisplatina
CLU - cortisol livre urinário
CYP11B - *cytochrome P450 family 11 subfamily B member 1*
DBD - domínio de ligação ao DNA
DDT - dicloro-difenil-tricloroetano
DHEA - deidroepiandrosterona
DHEAS - sulfato de deidroepiandrosterona
DHH: desert hedgehog
DKK3- dickkopf WNT signaling pathway inhibitor 3
DNA - ácido desoxirribonucléico
DOX - doxorubicina
DSS - dosage sex-reversal sensitive
EDP-M - ETO + CDDP + DOX + mitotane
ENC1 - ectodermal-neural cortex 1
ENSAT - rede europeia para estudo de tumores adrenais
ETO - etoposídeo
FDG - 18-fluorodesoxiglicose
FDG-PET - Tomografia por emissão de pósitrons com 18-fluordesoxiglicose
FISH- hibridização *in situ* e detectada por fluorescência
Gli1 - GLI family zinc finger 1
HC-FMRP-USP – Hospital das clínicas da faculdade de medicina de ribeirão preto
HH - Hedgehog
Hox - homeobox do gene 9
EAdF - estimulador da adrenal fetal
ESE - Sociedade Europeia de Endocrinologia
IGF2 - insulin like growth factor 2
IHH: Indian hedgehog
IPACTR - Registro Internacional de TAC Pediátricos
IHQ - Imunoistoquímica
LBD - domínio de ligação ao ligante
LFS - síndrome de Li-Fraumeni

LIF - *leukemia inhibitory factor*
LNSC - *late-night salivary cortisol*
MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*
NANOG - Nanog homeobox
NCOA2 - *nuclear receptor coactivator 2*
NCoR - correpessor de receptor nuclear
RNM - ressonância nuclear magnética
OCT4 - POU class 5 homeobox 1 pseudogene 5
Pbx1 - fator de transcrição célula pré-B leucemóide
PDE2A - phosphodiesterase 2A
PLAP - fosfatase alcalina placentária
Prep1 - homeobox PKN0X1
PTCH1 - Patched 1
RALBP1 - *ralA binding protein 1*
RNAm - ácido ribonucleico mensageiro
SF1 - *fator esteroideogênico-1*
SFRP1 - *secreted frizzled related protein 1*
SHH - via sonic hedgehog
SMO - *smoothened, frizzled class receptor*
SOAT1 - esterol-O-aciltransferase 1
SOX2 - SRY-box 2
SRA1 - *steroid receptor RNA activator 1*
Star: *steroidogenic acute regulatory protein*
STAT3 - signal transducer and activator of transcription 3
SUFU - *negative regulator of hedgehog signaling*
Sz – estreptozocina
Sz-M - estreptozocina + mitotane
TAC - tumores adrenocorticais
TC - tomografia computadorizada
TCLE - termo de consentimento livre e esclarecido
Tcf21- *transcription factor 21*
TP53 - *tumor protein p53*
TSD - teste de supressão com dexametasona
UH - unidades de Hounsfield

Wnt - *wingless-type*

WISP2 - WNT1 inducible signaling pathway protein 2

ZNRF3 - *zinc finger and ring finger protein 3*

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	26
1.1. A glândula adrenal.....	27
1.1.1. <i>Embriogênese Adrenal</i>	27
1.2. Tumores Adrenocorticais.....	29
1.2.1. <i>Epidemiologia dos TAC</i>	29
1.2.2. <i>Características Clínicas dos TAC</i>	30
1.2.3. <i>Investigação Diagnóstica</i>	32
1.2.3.1 Exames Laboratoriais	32
1.2.3.2. Exames de Imagem	36
1.2.4. <i>Estadiamento Tumoral</i>	38
1.2.5. <i>Histologia</i>	40
1.2.6. <i>Prognóstico e Opções de Tratamento</i>	41
1.2.6.1. Cirurgia.....	43
1.2.6.2. Tratamento não cirúrgico	44
1.2.7. <i>Aspectos Genéticos da Tumorigênese Adrenocortical</i>	46
1.2.7.1. Origem Monoclonal e Células-Tronco Adrenais na Tumorigênese.....	47
1.2.7.2. Células-tronco/ progenitoras adrenais.....	47
1.2.7.3. A Origem dos TAC Pediátricos por Transformação da Zona Adrenal Fetal	50
1.2.7.4. Mutações do TP53	51
1.2.7.5. Alterações na Via de Sinalização Wnt/Beta-catenina	53
1.2.7.6. A via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH).....	55
1.2.7.7. Fator Esteroidogênico 1 (SF1)	56
1.2.7.8. SF1 e Tumorigênese Adrenocortical.....	57
1.2.7.9. "Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1" (DAX1)	57
1.2.7.10. DAX1, via Wnt/Beta-catenina e Células-Tronco Embrionárias Adrenais	59
1.2.7.11. DAX1 e Tumorigênese Adrenocortical	60
1.3. RACIONAL DO PRESENTE PROJETO	61
2. OBJETIVOS.....	63
2.1. Geral	64
2.2. Específicos	64
3. METODOLOGIA	65
3.1. D	66
do Estudo.....	66
3.2 Aspectos éticos.....	67
3.3. Pacientes	67
3.4. Córtices Adrenais Normais: Fetais e Pós-natais	68
3.5. Análise Molecular.....	68

3.5.1. Extração de DNA	68
3.5.2. Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification (MLPA)	69
3.5.3. Avaliação de Mutações dos genes TP53 e CTNNB1	70
3.5.4. Extração de RNA	71
3.5.5. Digestão com DNase	71
3.5.6. Síntese de cDNA	71
3.5.7. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)	71
3.6. Análise da Expressão Proteica por Imunoistoquímica (IHQ)	72
3.6.1. Padronização das reações de IHQ	72
3.6.2. IHQ de Tumores Adrenocorticais	75
3.6.2.1. Escore H	75
3.6.3. IHQ de Córtices Adrenais Normais Fetais e Pós-natais	76
3.7. Análise <i>in vitro</i> da expressão de NANOG	76
3.7.1. Linhagem celular adrenocortical NCI-H295	76
3.7.2. Verificação da expressão proteica basal de NANOG na NCI-H295 por meio de imunocitoquímica	77
3.7.3. Análise da expressão do RNAm do NANOG após tratamento com PNU-74654	77
3.8. Análise Estatística	78
4. RESULTADOS	79
4.1. SF1, DAX1, NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 no desenvolvimento do córtex adrenal	80
4.2. Características Clínicas	83
4.2.1. Pacientes pediátricos	83
4.2.2. Pacientes adultos	85
4.3. Expressão Proteica	86
4.3.1. TAC Pediátricos	86
4.3.2. TAC Adultos	90
4.4. Expressão de RNAm	91
4.4.1. Córtices adrenais normais (controles)	91
4.4.2. TAC Pediátricos	92
4.4.3. TAC Adultos	94
4.5. Número de cópias dos genes NR5A1 e NR0B1	96
4.6. Análise <i>in vitro</i> da expressão de NANOG	98
4.6.1. Padrão de expressão de NANOG na linhagem NCI-H295	98
4.6.2. Efeito de inibição da sinalização da via Wnt sobre a expressão de NANOG	99
5. DISCUSSÃO	100
6. CONCLUSÕES	109
7. REFERÊNCIAS	111

8. ANEXOS.....	131
<i>Anexo 2</i> - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para paciente participante da pesquisa.	133
<i>Anexo 3</i> - Ofício de aprovação da criação do Biorrepositório - "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas" no Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.	135
<i>Anexo 5</i> - Características clínicas, patológicas, moleculares e desfechos em TAC pediátricos.	137
<i>Anexo 5.1</i> - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por imunoistoquímica.	139
<i>Anexo 5.1</i> - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por imunoistoquímica. (continuação).	140
<i>Anexo 5.2</i> - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por MLPA.	141
<i>Anexo 6</i> - Características clínicas, patológicas, moleculares e desfechos em TAC adultos.	142
<i>Anexo 7</i> - Tabela de características das amostras de adrenal fetal e pós-natal.	143
<i>Anexo 8</i> - Tabela de características das amostras de adrenal normais de adultos e crianças. .	144
<i>Anexo 9</i> - Artigo de revisão publicado.	145
<i>Anexo 10</i> - Artigo de original a ser submetido.	165

1. INTRODUÇÃO

1.1. A glândula adrenal

A glândula adrenal é vital nos seres humanos e tem, entre suas funções, a regulação do metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, da pressão arterial, além da tolerância do organismo em resposta às situações de estresse (1, 2).

A glândula adrenal se divide em duas regiões que são distintas embriológica e funcionalmente: o córtex e a medula (1, 2). O córtex adrenal no adulto representa 90% do peso da glândula e é subdividido em três camadas, dispostas de forma concêntrica. A zona glomerulosa é a camada mais externa do córtex, localiza-se logo abaixo da cápsula e é responsável pela secreção da aldosterona (mineralocorticoide). Logo abaixo, a zona fasciculada é a maior camada e constitui a principal fonte de cortisol (glicocorticoide). A zona reticular é a camada mais interna do córtex e é responsável pela produção predominante dos androgênios adrenais, androstenediona, deidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEAS). Nos primeiros anos de vida, os seres humanos não possuem a zona reticular formada. Esta surge apenas entre os cinco e sete anos de vida, atingindo seu ápice na vida adulta. A medula, que compreende cerca de 10% do volume adrenal, secreta as catecolaminas (norepinefrina e epinefrina) e, em menor grau a dopamina (3, 4).

1.1.1. *Embriogênese Adrenal*

O parênquima adrenal é formado por dois tecidos embriológicos distintos. O córtex deriva de células do mesoderma intermediário enquanto que a medula adrenal forma-se através da linhagem neuroectodérmica.

Sucheston e Cannon (1968) descreveram o desenvolvimento do córtex adrenal humano em cinco fases (**Figura 1**): (1) 3-4 semanas de gestação: condensação do epitélio celômico; (2) 4-6 semanas de gestação: proliferação e migração das células do epitélio celômico; (3) 8-10 semanas de gestação: diferenciação das células corticais fetais em duas zonas distintas; (4) primeiros 3 meses de vida pós-natal: declínio e desaparecimento da zona fetal; e (5) 10-20 anos de idade, estabelecimento e estabilização da divisão em, zonas do padrão adulto (5).

Figura 1. Embriogênese e morfogênese adrenal. Em verde-escuro, vê-se o primórdio adrenogonadal. Em amarelo, a zona fetal. Em roxo, a medula adrenal. Em verde-claro, células mesenquimais e a cápsula adrenal. Em preto, o córtex definitivo. Em cinza, a zonação adrenal. Modificado de "Wood and Hammer, 2011" (6).

A morfogênese do córtex adrenal inicia-se entre a 3^a e a 4^a semanas da vida intrauterina com o espessamento local do epitélio celômico. Posteriormente, entre a 4^a e a 6^a semana, estas células migram para a porção cefálica dos mesonéfrons formando o blastema adrenal. Outras células originárias do mesoderma intermediário migram também para o blastema adrenal formando a eminência urogenital. Neste estágio, as células destinadas à produção esteroidogênica começam a expressar o fator esteroidogênico-1 (SF1). Dentre estas células, aquelas localizadas na porção apical darão origem às glândulas adrenais (7, 8).

Entre a 8^a e a 9^a semanas de vida intrauterina, células mesenquimais especializadas migram da área da cápsula de Bowman para formar a cápsula da adrenal. Nesta fase, as células adrenais ficam dispostas em duas camadas: ao centro, células com citoplasma abundante e eosinofílico formam a zona cortical fetal e, na região próxima à cápsula, células menores com citoplasma basofílico formam uma estreita zona do córtex definitivo (9). Concomitantemente, células derivadas da crista neural migram dentro da glândula e irão diferenciar-se nas células cromafins medulares. Numerosas ilhas de células derivadas da crista neural, denominadas simpatogônias, encontram-se dispersas entre as células esteroidogênicas, principalmente na zona fetal (10).

Durante a vida intrauterina, a zona fetal é proporcionalmente a maior camada no córtex adrenal. No período pós-natal, a zona fetal involui por processo de apoptose, enquanto a zona definitiva desenvolve-se para constituir o córtex adrenal adulto (10, 11). No início da vida pós-natal, o córtex adrenal definitivo encontra-se composto por apenas duas camadas, a porção externa é formada pela zona glomerulosa e a porção interna pela zona fasciculada (2). Por volta dos três anos, surgem ilhas focais de células reticulares que aumentam de espessura gradativamente. A partir daí, forma-se a terceira camada do córtex adrenal definitivo, a zona reticular. A secreção de androgênios adrenais por parte da zona reticular começa entre os cinco a sete anos de idade (12).

1.2. Tumores Adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (TAC) benignos, ou adenomas adrenocorticais (AAC), são neoplasias de bom prognóstico. Por outro lado, os carcinomas adrenocorticais (CAC), possuem prognóstico reservado e ainda representam um desafio no que tange às poucas opções terapêuticas disponíveis (13). Nos pacientes em faixa etária pediátrica, torna-se ainda mais difícil a decisão terapêutica, devido à dificuldade em distinguir AAC e CAC, sem que haja a presença de metástases. Aliás, os TAC nestes dois grupos etários (adultos e crianças) apesar de serem processos neoplásicos da mesma glândula, apresentam padrão molecular, histológico, de comportamento e progressão clínicas bem diferentes (14, 15).

Muito se avançou ao longo das últimas duas décadas, mas ainda há muito a ser elucidado com relação aos mecanismos moleculares envolvidos na fisiopatogênese dos TAC. Atualmente, grande atenção é dada em determinar novos alvos terapêuticos para o tratamento de CAC de difícil manejo. Outro foco importante de pesquisa é a determinação de novos marcadores prognósticos capazes de auxiliar nas decisões por tratamentos mais agressivos de forma mais precoce.

1.2.1. Epidemiologia dos TAC

Os AAC são relativamente frequentes nos humanos, com prevalência superior a 4% (16). A prevalência de adenomas e hiperplasias adrenais em séries de necrópsias atinge até 7,3%. Por outro lado, os CAC são raros, com uma incidência anual de 0,7 a 2,0 casos por milhão de habitantes, representando cerca de 0,02% de todos os cânceres relatados no mundo (13, 17). Os TAC podem ocorrer em qualquer idade, porém seu maior pico de incidência é entre os 40 e 50 anos (13). Sendo mais prevalentes no sexo feminino em qualquer faixa etária analisada (13, 18).

Na faixa etária pediátrica, a incidência de TAC de uma forma geral é baixa. Em média, ocorrem cerca de 0,4 casos por milhão de habitantes durante os primeiros quatro anos de vida e diminui para 0,1 por milhão durante os 10 anos seguintes. A incidência de TAC relatada fora do Brasil por milhão de crianças abaixo de 14 anos varia de 0,1 em Hong Kong e Bombaim a 0,4 em Los Angeles. Porém, nas regiões sudeste e sul do Brasil, existe uma incidência anual registrada de 3,4 a 4,2 casos por milhão de crianças e adolescentes abaixo dos 15 anos. Mais da metade dos casos nesta faixa etária registrados no Brasil ocorreram em crianças de quatro anos ou menos (19-21). Nesta região, a maior incidência de TAC está relacionada a uma mutação germinativa de baixa penetrância no gene supressor tumoral *TP53* (c.1010G>A; ou p.P53 P.R337H) (22-25). Portanto, nestas regiões do Brasil, considera-se que os TAC possuem pico bimodal de incidência, abaixo dos cinco anos e entre a 4ª e 5ª décadas de vida.

1.2.2. Características Clínicas dos TAC

Na maioria dos casos, a suspeita de TAC surge devido a queixas relacionadas a manifestações clínicas de excesso hormonal. Neste caso, quatro síndromes clínicas podem ocorrer de acordo com o tipo de secreção tumoral: a síndrome de Cushing, secundária ao hipercortisolismo; a virilização devido ao excesso de androgênios; a hipertensão hipocalêmica secundária ao hiperaldosteronismo; e, mais raramente, a feminização devido ao excesso estrogênico. Além disso, especialmente em pacientes idosos, os TAC podem ser não secretores de hormônios. Neste caso, o diagnóstico pode advir da descoberta de uma massa abdominal palpável e/ou dor abdominal em flancos, ou ainda como um achado incidental em exames de imagem. Ainda no contexto de TAC não secretores, quando estes são CAC, sintomas constitucionais como a perda de peso e a anorexia são frequentes relatados (14, 16-18, 26).

Em adultos, a maioria dos AAC secretores produzem síndromes de hipercortisolismo e hiperaldosteronismo. Com frequência, AAC nesta faixa etária são descobertos de forma incidental. E raramente, pacientes adultos com AAC secretores apresentam clínica de virilização ou feminização (27).

Por outro lado, a maioria dos CAC secretores em pacientes adultos apresentam clínica de hipercortisolismo isolado (45%) ou associado a virilização (25%), quando são denominados tumores mistos (16, 17, 26, 28). O rápido desenvolvimento da doença (três a seis meses) em pacientes adultos com CAC secretores de cortisol, leva a uma síndrome de Cushing com padrão clínico fora do habitual, apresentando pouco ou nenhum ganho de

peso, atrofia muscular profunda, hipertensão grave e diabetes mellitus (16). Em mulheres com CAC, frequentemente são observados sinais e sintomas de virilização, como acne, hirsutismo, eflúvio androgênico e oligomenorreia. A apresentação isolada de virilização representa menos de 10% dos CAC em adultos, porém um TAC secretor de androgênios é mais sugestivo de CAC do que de AAC. Também menos de 10% dos pacientes com CAC podem apresentar feminização, manifestando-se nos homens com quadro de ginecomastia de início recente, perda de libido e atrofia testicular (16, 26). Os CAC produtores de aldosterona são raros (< 5%) e se manifestam com hipertensão e hipocalêmia profunda (26, 29). A manifestação, frequentemente descrita, de hipoglicemia em pacientes com CAC parece estar relacionada à liberação parácrina de IGF2 pelo tumor (16, 17).

Em crianças com TAC, exceto pela presença de metástases, o diagnóstico diferencial entre AAC e CAC por meio da análise histopatológica é inefetivo. Portanto, não são conhecidas diferenças entre as apresentações clínicas de TAC benignos e malignos nesta faixa etária. Em pacientes pediátricos, os TAC são predominantemente secretores. A apresentação clínica mais comumente observada é a de virilização, seja de forma isolada (40 a 55%) ou associada a síndrome de Cushing aberta ou hipercortisolismo subclínico (29 a 50%) (18-20). As principais manifestações clínicas em pacientes pediátricos com TAC virilizantes são pubarca precoce, hipertrofia de clitóris ou pênis, acne, voz grave, aumento de massa muscular e hirsutismo (19). Aumento da velocidade de crescimento e avanço de idade óssea, também podem ser decorrentes da secreção exarcebada de androgênios. Ao contrário dos TAC em pacientes adultos, nos TAC pediátricos, o hipercortisolismo isolado ocorre de forma tão infrequente quanto o hiperaldosteronismo (21). Nas crianças o quadro de hipercortisolismo não costuma ser tão exuberante quanto nos adultos. Sinais como a face em lua cheia, pletora facial, distribuição centrípeta de gordura, gibosidade e estrias violáceas são raramente descritos. Muitas vezes, as principais manifestações de hipercortisolismo na infância são a desaceleração do crescimento e o ganho acelerado de peso. Estas manifestações porém, podem ser mascaradas pela concomitância do hiperandrogenismo. Portanto, é importante ressaltar que mesmo na ausência de sinais e sintomas compatíveis com síndrome de Cushing, o hipercortisolismo subclínico pode ser observado em cerca de 10% dos pacientes com TAC mistos (18, 30). Menos de 10% dos TAC pediátricos são relatados como não secretores (19-21, 30).

Curiosamente, a hipertensão arterial tem sido relatada tanto em TAC secretores quanto em não secretores na faixa etária pediátrica (18, 20, 31-33). Entre os TAC secretores, a hipertensão foi mais frequentemente relacionada aos TAC causadores de hipercortisolismo. Principalmente nos TAC mistos já que o hipercortisolismo isolado é raro nesta faixa etária. Os TAC pediátricos produtores de aldosterona são muito raros, contabilizando poucos relatos. Nos TAC não secretores ou com secreção isolada de androgênios, acredita-se que a hipertensão está relacionada à compressão tumoral da artéria renal (18, 20, 31).

Na faixa etária pediátrica, tal qual ocorre entre os pacientes adultos, feminização por excesso de estrogênios é manifestação rara nos TAC (34). Outras manifestações incomuns nos TAC pediátricos incluem hipoglicemia, resistência insulínica não relacionada ao hipercortisolismo e policitemia (35).

1.2.3. *Investigação Diagnóstica*

1.2.3.1 Exames Laboratoriais

Não existe um consenso de forte evidência clínica nas recomendações de investigação laboratorial para tumores adrenais. Numa tentativa de padronização desta investigação, a rede europeia para estudo de tumores adrenais (*ENSAT*) lançou em 2005 a recomendação de uma lista de exames laboratoriais e de imagem (**Tabela 1**) que mesmo após várias revisões ainda não sofreu alterações. Esta lista de exames foi elaborada segundo as experiências em investigação de TAC apenas em pacientes adultos (16, 36).

Como já salientado, os TAC em pacientes pediátricos possuem perfil clínico diferente dos TAC em pacientes adultos. Portanto o protocolo sugerido pelo ENSAT, pode não ser o mais adequado ao perfil dos pacientes pediátricos. Desta forma, em 2014, nosso grupo descreveu um fluxograma (**Figura 2**) que reflete a rotina executada no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HC-FMRP-USP) na investigação de TAC pediátricos há algumas décadas (18).

Na avaliação laboratorial em pacientes pediátricos com suspeita de TAC, os níveis de androgênios plasmáticos basais devem ser avaliados, incluindo o DHEAS, a androstenediona, a testosterona, bem como o precursor 17-hidroxiprogesterona (17OHP). Os TAC pediátricos podem secretar quantidades variáveis de 17OHP, tornando-se necessário sua avaliação para diagnóstico diferencial de hiperplasia adrenal congênita em alguns pacientes. Nestes casos, o teste de supressão com dexametasona (1 mg/m² dividido em quatro tomadas, respeitando a dose máxima de 0,5 mg por dose) por 3 a 5

dias deve ser utilizado. No entanto, é importante evitar o atraso significativo na realização de cirurgia em pacientes com TAC submetidos a este ensaio funcional (18).

Além disso, como os TAC podem secretar estradiol, com ou sem manifestação clínica, recomenda-se que o estradiol plasmático deve ser também avaliado (33). Altos níveis plasmáticos de estradiol têm sido relacionados a malignidade em adultos com TAC, porém nos TAC pediátricos nenhuma evidência sugeriu o mesmo (16, 28, 37).

Na presença de hipertensão ou hipocalemia, os níveis de aldosterona e atividade de renina plasmática devem ser medidos (13, 18, 38). Metanefrinas ou catecolaminas urinárias de 24 horas e catecolaminas plasmáticas devem ser medidos em pacientes com características clínicas de feocromocitoma, tanto pediátricos quanto adultos (16, 18).

Nos pacientes adultos, além de o hipercortisolismo isolado ser a manifestação clínica mais comum, o hipercortisolismo subclínico é relatado em até 12,5% dos TAC detectados de forma incidental (38-40). Nos pacientes pediátricos, o hipercortisolismo isolado é raro, sendo mais frequente a manifestação de hipercortisolismo associada ao excesso de androgênios. Neste contexto, até 10% dos pacientes pediátricos apresentam hipercortisolismo subclínico (41). Desta forma, em pacientes com TAC de qualquer faixa etária, a investigação de secreção autônoma de cortisol é recomendada mesmo na ausência de sintomatologia. Esta investigação é importante, pois a reposição pré-operatória de glicocorticoide pode evitar uma crise adrenal aguda (36). Por outro lado, naqueles pacientes que não apresentam secreção autônoma de cortisol, a reposição de glicocorticoide torna-se desnecessária. Alguns centros porém, optam por realizar a reposição de glicocorticoides no pré e pós-operatório em todos os pacientes pediátricos com TAC e, portanto, não fazem o rastreio de hipercortisolismo (18, 28, 42).

Tabela 1. Exames laboratoriais de imagem recomendados pelo ENSAT para investigação de TAC (16).

Exames hormonais	
Excesso de glicocorticoide (no mínimo 3 de 4 testes)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de supressão com dexametasona (1mg, 23:00 h) • Excreção de cortisol livre urinário (24 h) • Cortisol basal (sérico) • ACTH basal (plasma)
Androgênios e precursores esteroides	<ul style="list-style-type: none"> • DHEAS (sérico) • 17-hidróxi-progesterona (sérico) • Androstenediona (sérico) • Testosterona (sérico) • 17-beta-estradiol (sérico, apenas em homens ou mulheres pós-menopausadas)
Excesso de mineralocorticoide	<ul style="list-style-type: none"> • Potássio (sérico) • Razão Aldosterona/ atividade de renina plasmática (apenas em pacientes com hipertensão arterial e/ou hipocalemia)
Exclusão de feocromocitoma	<ul style="list-style-type: none"> • Excreção urinária de catecolaminas ou metanefrinas (24h) • Metanefrinas ou normetanefrinas (plasma)
Exames de imagem	
	<ul style="list-style-type: none"> • Tomografia computadorizada (TC) ou ressonância nuclear magnética (RNM) de abdome e tórax • Cintilografia óssea (na suspeita de metástase óssea) • Tomografia por emissão de pósitrons com 18-fluordesoxiglicose (FDG-PET, opcional)

Figura 2. Fluxograma de avaliação bioquímica de uma criança sob investigação de TAC. Abreviaturas: TAC, tumor adrenocortical; DHEAS, dehidroepiandrosterona; ARP, atividade de renina plasmática. * Apenas em caso de hipertensão. # Teste de supressão de dexametasona: durante a noite 20µg/kg (1mg em adultos) ou 3-5 dias 1mg /m²/dia dividido em quatro doses (18).

A investigação de hipercortisolismo leva em consideração o ritmo circadiano de secreção do cortisol, a supressão fisiológica do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e a quantidade total de cortisol livre excretado através da urina. Portanto, na triagem de hipercortisolismo são avaliados o cortisol salivar noturno às 23 horas (*late-night salivary cortisol* - LNSC); o teste de supressão com dexametasona (TSD), onde é feita a dosagem de cortisol matinal após a administração de 1 mg (20 µg/kg em crianças) de dexametasona; ou pelo menos duas dosagens de cortisol livre urinário (CLU) com valor cerca de quatro vezes acima do limite superior da normalidade (43-46). A combinação de LNSC e TSD é muito útil para o rastreamento de hipercortisolismo em crianças (47). No entanto, em pacientes com hipercortisolismo de fonte adrenal, como os TAC, os níveis de LNSC e CLU podem não ser consistentemente elevados. Nestes casos, o TSD é preferível ao CLU e LNSF (45).

TAC não secretores são raros em crianças e adolescentes. Porém, em pacientes adultos uma quantidade significativa de AAC são não secretores. A descoberta de uma

massa adrenal clinicamente detectável ou de um incidentaloma adrenal indica investigação laboratorial (16, 18).

Uma nova abordagem diagnóstica aparentemente promissora é baseada na avaliação de esteroides urinários através de cromatografia gasosa/ espectrometria de massa. Os CAC apresentam um perfil de esteroidogênese imaturo, onde predominam metabólitos mais precoces na esteroidogênese, que permite sua diferenciação com AAC (48). A adição da análise de dados computacionais em conjunto ao perfilamento de metabólitos de esteróides na urina aumenta a acurácia deste método. Apesar de promissora, esta metodologia ainda é pouco acessível e seu uso na rotina clínica dependerá da transferência desta abordagem para plataformas de espectrometria de massa em série de alto rendimento (49).

1.2.3.2. Exames de Imagem

Após a investigação laboratorial, estudos de imagem devem ser realizados, tanto para localização e confirmação tumorais, quanto para o planejamento terapêutico. Os exames de imagem que mais têm sido utilizados neste ensejo são a RNM, a TC e, mais recentemente, a FDG-PET (50-52). Nos pacientes adultos com TAC, é possível distinguir, através de características radiológicas, se o tumor é mais provavelmente maligno ou benigno. Ao passo que, nas crianças com TAC, a menos que haja evidência de invasão, metástase ou disseminação venosa, não é possível diferenciar CAC de AAC (53, 54). Sendo assim, os exames de imagem são úteis não só no planejamento cirúrgico, como podem influir no planejamento de tratamentos adjuvantes. Além disso, após o devido tratamento, é necessário rastrear possíveis recidivas tumorais esporadicamente por exames de imagem (18, 55).

Através da TC é possível avaliar aspectos importantes do tumor, como tamanho, homogeneidade, presença de calcificação, áreas de necrose e invasão local. Achados como tamanho tumoral maior que 5 centímetros, bordas e irregulares, captura heterogênea de contraste e invasão de estruturas vizinhas são sugestivos de CAC em pacientes adultos. Enquanto, tamanho inferior a 3 centímetros, contornos regulares e captura homogênea de contraste são sugestivos de AAC (56). Outro item importante, nesta avaliação de TC para diferenciação entre CAC e AAC em pacientes adultos, é o coeficiente de atenuação medido por unidades de Hounsfield (UH). Em pacientes adultos, um coeficiente basal de atenuação de menos de 10 UH e um coeficiente menor que 30-40 UH quinze minutos após

administração de contraste, sugerem AAC. Da mesma forma, um *washout* absoluto de contraste acima de 60% é também sugestivo de AAC (36, 57-59).

Além de ser um métodos livre de radiação, a RNM permite uma avaliação mais detalhada de massas adrenais. Particularmente quando realizada a RNM funcional (RMF), onde são avaliadas sequências de espectroscopia por resolução de ponto-imagem por desvio químico. Através de RMF é possível identificar um pequeno grupo de AAC com reduzido conteúdo intracelular de lípidos, cuja imagem por TC apresenta coeficiente de atenuação superior a 10 UH (55, 58, 60). Além disso, a RMF permite também uma melhor definição de metástases adrenais de origem extra-adrenal e massas heterogêneas (55, 60). A RNM também auxilia na distinção entre TAC benignos e malignos pela intensidade de sinal: lesões com sinal alto em T2 são sugestivas de CAC e sinal baixo em T2 sugere AAC. A RNM contrastada permite também uma melhor avaliação de linfonodos retroperitoneais, extensão vascular, trombose, invasão de veias adrenais, renais e da veia cava inferior (58).

Recentemente, o FDG-PET vêm se demonstrando um exame de imagem bastante útil na investigação de cânceres. Neste método, o marcador 18-fluorodesoxiglicose (FDG) se acumula nos tecidos com maior consumo metabólico de glicose e é detectado pelo exame de imagem. Desta forma, como tecidos tumorais geralmente apresentam metabolismo de glicose acelerado, o FDG-PET é um ótimo método para triagem de cânceres e suas metástases (50). Porém, uma limitação ao FDG-PET na investigação de massas adrenais, além do custo elevado, é que tanto CAC como também feocromocitomas e metástases adrenais apresentam elevada absorção de FDG, não podendo então serem diferenciados pelo método (55, 61). A utilização de marcadores como o metomidato, que se combina especificamente com enzimas CYP11B, pode servir como ensaio funcional alternativo para assegurar a origem adrenocortical da massa (61).

Apesar de a ultrassonografia abdominal ser frequentemente utilizada como primeira linha na avaliação de pacientes pediátricos com massas adrenais, sua sensibilidade e especificidade nunca foram avaliadas em profundidade. Existe pouca informação sobre a eficácia da ultrassonografia nestes casos, além de ser um método examinador dependente. Porém parece útil na detecção de metástases hepáticas, invasão vascular e trombozes (53, 62).

Em pacientes pediátricos com TAC, a radiografia de idade óssea tem sido sugerida para avaliar o impacto do excesso de androgênios no crescimento esquelético. Este método permite estimar o potencial de redução na altura final e acompanhar se há

reversão do efeito após o tratamento. Em uma grande coorte de pacientes pediátricos com TAC, a idade óssea foi encontrada mais de 1 ano avançada em 68% dos pacientes. Na maioria dos casos, a altura final predita ao diagnóstico foi menor do que a altura-alvo. No entanto, a altura final predita durante o segmento após a cirurgia, não diferiu da altura-alvo (63).

1.2.4. Estadiamento Tumoral

O sistema de estadiamento tumoral mais conhecido e empregado na classificação de TAC é a escala de Macfarlane modificada por Sullivan (**Tabela 2**) (64). Porém, foi observado que este sistema apresentava uma falha na separação prognóstica entre os estágios II e III (65). Posteriormente, o grupo europeu (*ENSAT*) propôs um novo sistema de estadiamento (**Tabela 2**) que tem sido recomendado para a padronização na estratificação prognóstica de pacientes adultos. Este sistema apresenta boa associação entre o estadiamento tumoral e o prognóstico de CAC, servindo de guia para a definição do melhor tratamento a ser feito (16).

Os sistemas de estadiamento tumoral utilizados em pacientes adultos não se adequam às particularidades dos casos pediátricos. Principalmente, por ser difícil a distinção entre AAC e CAC nos pacientes pediátricos. Devido à grande experiência no seguimento de pacientes pediátricos com TAC, em 1997, o grupo do professor Rômulo Sandrini Neto propôs um sistema de estadiamento voltado à classificação de TAC em crianças (19). Posteriormente, este mesmo grupo modificou sua classificação, originando a Escala de Sandrini modificada (**Tabela 2**) que é reconhecida e utilizada internacionalmente (63). Porém, este sistema resulta em sobreposição de prognóstico entre pacientes pediátricos nos estágios II e III.

Por se tratar de uma doença rara, a fim de estabelecer critérios comuns para a avaliação e condução de casos de TAC na infância, foi criado em 1990, o Registro Internacional de TAC Pediátricos (*IPACTR*). Através desta iniciativa, dados de TAC levantados em vários países podem ajudar no melhor conhecimento da doença. Além disso, a padronização de condutas permite uniformizar dados que podem ser comparados afim de traçar melhores estratégias de manejo. Com base na classificação previamente proposta pelo grupo do professor Romulo Sandrini Neto, o *IPACTR* sugeriu um novo sistema de estadiamento (**Tabela 2**) (21).

Tabela 2. Estadiamento tumoral dos TACde acordo com os critérios de Sandrini, IPACTR MacFarlane modificado por Sullivan e ENSAT.

Estágio tumoral	Sandrini	IPACTR	MacFarlane modificado por Sullivan	ENSAT
I	Tumor totalmente ressecado; peso do tumor $\leq 200\text{g}$; ausência de metástase.	- Tumor totalmente ressecado; tumor pequeno ($<200\text{cm}^3$ e $<100\text{g}$) com níveis pós-operatórios de hormônios normais.	Tamanho tumoral $< 5\text{ cm}$ (T1,N0,M0).	Tamanho tumoral $< 5\text{ cm}$ (T1,N0,M0).
II	Tumor totalmente ressecado com margens cirúrgicas negativas; peso do tumor $> 200\text{g}$; ausência de metástase.	- Tumor totalmente ressecado; tumor grande ($\geq 200\text{ cm}^3$ ou $\geq 100\text{ g}$) com níveis pós-operatórios de hormônios normais.	Tumor size $\geq 5\text{cm}$ (T2,N0,M0).	Tumor size $\geq 5\text{cm}$ (T2,N0,M0).
III	Tumor residual (micro ou macroscópico) ou inoperável, sem metástase.	- Inoperável; tumor residual (micro ou macroscópico); Rotura tumoral; Pacientes com estágio tumoral I e II que falharam em normalizar após a cirurgia; Envolvimento de linfonodo retroperitoneal.	Tumor infiltrando tecido adiposo circunjacente (T3,N0,M0). Ou tumor invade pelo menos um linfonodo (T1-2,N1,M0).	Tumor infiltrando tecido adiposo circunjacente (T3,N0,M0). Ou tumor invade pelo menos um linfonodo (T1-2,N1,M0). Tumor infiltrando tecido adiposo circunjacente e invade pelo menos um linfonodo (T3,N1,M0). Tumor invade órgãos adjacentes (T4,N0-1,M0).
IV	Metástase à distância no diagnóstico.	Metástase à distância no diagnóstico.	Tumor infiltrando tecido adiposo circunjacente e invade pelo menos um linfonodo (T3,N1,M0). Tumor invade órgãos adjacentes (T4,N0-1,M0). Ou metástase à distância (T1-4,N0-1,M1).	Metástase à distância (T1-4,N0-1,M1).

1.2.5. *Histologia*

O sistema de avaliação histopatológica mais utilizado no mundo para diferenciar AAC e CAC é o escore de Weiss. Este sistema baseia-se no reconhecimento de nove características morfológicas (**Tabela 3**) e a presença de três ou mais destas características corresponde a um comportamento maligno da lesão (66, 67). Este sistema foi elaborado e validado para a detecção de malignidade apenas em pacientes adultos com TAC (16, 66).

Frequentemente, achados histológicos preocupantes, que estão associados com malignidade e prognóstico desfavorável em pacientes adultos, são observados nos TAC de pacientes pediátricos com comportamento clinicamente benigno. Tais como necrose, pleomorfismo nuclear, invasão capsular, invasão vascular, aumento da taxa mitótica e figuras mitóticas atípicas (68-73). Deste modo, características histológicas importantes para estabelecer o diagnóstico de CAC em adultos não parecem ter o mesmo significado nos pacientes pediátricos (66). Portanto, os critérios de Weiss não predizem com acurácia o prognóstico clínico nos TAC pediátricos. A falta de critérios histopatológicos definitivos e confiáveis para malignidade nos pacientes pediátricos é provavelmente o maior desafio no manejo de TAC nesta faixa etária (14).

Na tentativa de obter um sistema mais acurado que ajude a diferenciar na prática clínica AAC e CAC em pacientes pediátricos, várias características macro e microscópicas foram avaliadas (70, 74-76). Apesar de nenhum sistema histomorfológico avaliado ser capaz de diferenciar com precisão AAC e CAC em crianças, o método que melhor se aproxima da necessidade clínica atual é o escore de Wieneke (77-79). Neste método, são avaliadas nove características histomorfológicas (**Tabela 3**). No estudo original, os TAC são definidos como malignos quando estão presentes quatro ou mais critérios. Na presença de três critérios, os TAC são considerados indeterminados. Abaixo de três critérios, são considerados benignos. Porém, algumas características isoladamente se mostraram sugestivas de malignidade em TAC pediátricos: a invasão da veia cava, a necrose e o aumento da atividade mitótica (70).

Tabela 3. Comparação entre o escore de Weiss e o escore de Wieneke.

Escore de Weiss	Escore de Wieneke
Grau nuclear elevado	Peso tumoral > 400 gramas
>5 mitoses/50 campos de alta potência (400x)	>15 mitoses/20 campos de alta potência (400x)
Mitoses atípicas	Figuras mitóticas atípicas
<25% de células claras	Diâmetro tumoral > 10,5 centímetros
>33% de arquitetura difusa	Extensão para tecidos moles periadrenais e /ou órgãos adjacentes.
Necrose tumoral	Presença de necrose tumoral
Invasão venosa	Invasão venosa
Invasão sinusoidal	Invasão da veia cava inferior
Infiltração capsular	Invasão capsular

1.2.6. Prognóstico e Opções de Tratamento

A ressecção cirúrgica completa do tumor primário e de suas metástases, quando viável, é o único tratamento capaz de curar ou prolongar a sobrevida de pacientes tanto adultos quanto pediátricos. Principalmente, se o tumor for detectado em estágios iniciais (I e II). Pacientes com doença residual após a cirurgia apresentam prognóstico desfavorável (13, 14, 80).

A literatura refere um prognóstico significativamente melhor nos pacientes pediátricos com TAC do que nos pacientes adultos (70, 81-84). A média de sobrevida total após cinco anos do diagnóstico em pacientes pediátricos com TAC é de cerca de 75-95% (18). Enquanto em adultos com CAC, a sobrevida total varia de 37-47% (16). A razão disso, pode estar na falta de distinção entre CAC e AAC nos pacientes pediátricos. Enquanto no grupo dos adultos as estatísticas levam em consideração apenas os carcinomas, na faixa etária pediátrica as estatísticas levam em consideração os TAC pediátricos que podem tanto ter evolução clínica compatível com AAC quanto com CAC.

Em pacientes adultos com CAC, além da ressecção cirúrgica completa, o estágio tumoral no momento do diagnóstico permanece como o fator prognóstico mais relevante (16). Pacientes em que o tumor foi diagnosticado e tratado ainda no estágio I apresentam

cerca de 82% de sobrevida após cinco anos de seguimento, enquanto em pacientes diagnosticados já em estágio IV, a sobrevida em cinco anos é de cerca de 18% (65). Infelizmente a grande maioria dos CAC em adultos são diagnosticados entre os estágios III e IV. Além disso, a sobrevida difere amplamente para qualquer estágio tumoral, o que reflete a heterogeneidade da doença (16).

O Ki67, um marcador de proliferação, vem se demonstrando útil como marcador prognóstico na imunoistoquímica de CAC em pacientes adultos (13, 85-88). Em um grande estudo avaliando o valor prognóstico de marcadores histopatológicos, clínicos e imunoistoquímicos, Ki67 sozinho predisse de forma mais acurada a sobrevida livre de doença e total. Além disso, os autores recomendam que com base nos seus resultados que o Ki67 deve ser introduzido na patologia de rotina para CAC (85). Quando avaliada a reprodutibilidade desta metodologia, dois estudos apresentaram resultados divergentes. Em 2008, um estudo menor avaliando a marcação de Ki67 em 17 amostras de CAC demonstrou boa reprodutibilidade, com baixas diferenças intra e inter-observador de 3,7 e 4,2%, respectivamente (87). Porém, um estudo maior em 2015, avaliou a reprodutibilidade do método, comparando a leitura de 14 patologistas independentes em 76 amostras de CAC e a variação inter-observador foi significativa. Os autores concluíram que as práticas atuais na avaliação do escore Ki67 variam muito e esta variação inter-observador limita a sua utilidade na prática clínica, especialmente em torno de valores de corte clinicamente relevantes (89).

Já entre as crianças com TAC, a maioria dos pacientes apresentam doença em estágio inicial (I ou II) ao diagnóstico (14). A sobrevida total em cinco anos em pacientes com TAC em estágio I é superior a 95%, entre 50% e 70% em estágios II e III, e cerca de 20% no estágio IV. Além de estágio tumoral, a sobrevida se correlaciona fortemente com a idade no momento do diagnóstico. Os pacientes com idades menores de cinco anos apresentam maiores taxas de sobrevida (14, 18, 21). Não existe ainda, nenhum marcador prognóstico na população pediátrica com TAC que se assemelhe aos resultados obtidos com o ki67 nos pacientes adultos.

Portanto, a maioria dos adultos com CAC, por serem diagnosticados mais tardiamente, e uma pequena porção das crianças diagnosticadas com TAC, possuem um prognóstico muito desfavorável. (90-93). Estes pacientes apresentam além da doença regional, invasão local, recidivas após o tratamento cirúrgico e/ou metástases à distância que geralmente acometem pulmões, rins, fígado e ossos (34). Infelizmente nestes casos, existem poucas opções de tratamento farmacológico

1.2.6.1. Cirurgia

A cirurgia é o único tratamento efetivo conhecido para TAC em todas as faixas etárias (14, 36). Em adultos, a adrenalectomia aberta, por laparotomia, ainda é o procedimento cirúrgico mais utilizado. Mas alguns estudos defendem que a adrenalectomia por via laparoscópica é um procedimento seguro para CAC com diâmetros menores que 10 centímetros (94-96). Outros grupos evidenciaram um risco aumentado de recorrência na via laparoscópica (97, 98). Porém, a maioria destes estudos são retrospectivos e metodologicamente discutíveis, não permitindo uma conclusão precisa (36, 99, 100). Em 2016, a Sociedade Europeia de Endocrinologia (ESE) e a ENSAT, lançaram diretrizes para o manejo de massas adrenais. Apesar de admitirem ser fraca a evidência acerca da segurança da adrenalectomia por via laparoscópica em CAC, baseado na experiência clínica de seus membros, a ESE e a ENSAT sugeriram a utilização de adrenalectomia por laparoscopia, mesmo em casos suspeitos de CAC, apenas em tumores unilaterais, com diâmetro de seis centímetros ou menos, mas sem evidências de invasão local. Nos casos em que o tumor é maior que seis centímetros e/ ou existe a suspeita de invasão local, a ESE e a ENSAT ainda recomendam a adrenalectomia aberta (36).

Os TAC pediátricos costumam ser mais friáveis e apresentam um alto risco de ruptura durante a manipulação cirúrgica (63). Quando isto ocorre, aumenta muito o risco de recidiva, levando a um mau prognóstico (20, 84). Portanto, a laparotomia ainda é a abordagem cirúrgica mais recomendada e uma segunda cirurgia deve ser considerada, quando possível, tanto em caso de recorrência local quanto de metástases isoladas (18, 83). Apesar disso, devido às vantagens da laparoscopia sobre a cirurgia aberta (menor tempo de internação, recuperação mais rápida no pós-operatório, e melhores resultados cosméticos), alguns serviços com experiência na técnica laparoscópica referem bons desfechos com esta técnica em TAC pediátricos (101-104). Os dados disponíveis na literatura sobre adrenalectomia laparoscópica em crianças com TAC são ainda mais escassos do que nos adultos. Os bons desfechos nesta técnica cirúrgica ainda parecem limitados à experiência pessoal do cirurgião e sua equipe. Além disso, não existem recomendações formais de adrenalectomia laparoscópica na faixa etária pediátrica semelhante à formulada para pacientes adultos.

Portanto, a adrenalectomia aberta ainda deve ser considerada como padrão-ouro no tratamento tanto de TAC nas crianças, quanto de CAC nos pacientes adultos. A via laparoscópica deve ser considerada somente em centros com maior experiência, na

realização de ensaios clínicos ou estudos observacionais. Os pacientes aparentemente curados cirurgicamente requerem acompanhamento rigoroso e contínuo (20, 105).

1.2.6.2. Tratamento não cirúrgico

Independente da faixa etária, existem poucas opções disponíveis de tratamento não cirúrgico para CAC em estágios III e IV. A maioria dos dados disponíveis são retrospectivos e originados de estudos em pacientes adultos com CAC (92, 106, 107). A ressecção cirúrgica incompleta está associada a mau prognóstico (108). As modalidades de tratamento disponíveis atualmente incluem o mitotane, drogas quimioterápicas, irradiação do leito tumoral ou combinações destes (13). Quando é recomendado o tratamento não cirúrgico, o mitotane é a primeira opção, seja como monoterapia ou associado a outros tratamentos (107). Ainda assim, a melhor taxa de resposta esperada para tratamentos adjuvantes está em apenas 24% (109). Apenas em tumores inoperáveis, o tratamento farmacológico é considerado de primeira linha. Alguns protocolos são realizados antes da ressecção cirúrgica (neoadjuvante), a fim de reduzir o tamanho tumoral para uma melhor ressecção. Outros, são realizados após a ressecção tumoral (adjuvante), a fim de prevenir ou tratar recidivas e/ ou metástases (13, 92, 110).

O mitotane é uma droga adrenolítica, derivada do inseticida dicloro-difenil-tricloroetano (DDT), que apresenta a melhor eficácia disponível atualmente no tratamento medicamentoso de CAC (13, 18, 110). Em modelos animais, a administração de mitotane demonstrou-se capaz não só de destruir as glândulas adrenais, como também de inibir várias etapas enzimáticas da esteroidogênese adrenal (111, 112). Todavia, o mecanismo pelo qual o mitotane ativava o processo apoptótico nas adrenais era desconhecido. As primeiras respostas para o modo de ativação da apoptose vieram através da observação de como o mitotane causa a ruptura das mitocôndrias, o que poderia causar esta ativação (113). Porém, mais recentemente, observou-se que o mitotane induz ao estresse do retículo endoplasmático através da expressão de esterol-O-aciltransferase 1 (SOAT1). O acúmulo de SOAT1 no citoplasma induz apoptose, e sua expressão pode ainda servir como preditor de resposta ao mitotane (114).

A concentração plasmática terapêutica do mitotane se situa entre 14 e 20 mg/l, tanto no tratamento de adultos quanto crianças (92, 110). Em adultos, os resultados mais convincentes derivam de uma grande análise retrospectiva que comparou dois grupos de controle independentes com um grupo de pacientes em uso do mitotane adjuvante. Os pacientes com mitotane apresentaram sobrevidas livre de doença e total

significativamente melhores (42 meses vs. 10 e 25 meses; e 110 meses vs. 52 e 67 meses, respectivamente) (107). Esta melhora na sobrevida total ao uso de mitotane em pacientes adultos com CAC é associada a níveis plasmáticos de mitotane ≥ 14 mg/l (115). Em crianças, um estudo alemão não-randomizado (GPOH-MET-97-Trial) apresentou dados sobre o tratamento de 60 pacientes pediátricos com TAC desde 1997. Necessitaram de terapia medicamentosa 34 destes pacientes. Com relação ao uso de mitotane, foi relatado um melhor prognóstico nos pacientes com níveis plasmáticos de mitotane ≥ 14 mg/l e duração de tratamento superior a seis meses (92). A proximidade entre as concentrações plasmáticas terapêutica e tóxica do mitotane gera uma grande dificuldade no manejo do tratamento. Frequentemente ocorrem efeitos adversos, por vezes levando à suspensão do fármaco. Os efeitos colaterais são principalmente gastrointestinais, incluindo náuseas, vômitos, diarreia e dor abdominal. Menos frequentemente, incluem sonolência, letargia, marcha atáxica, depressão e vertigem (13, 116). A insuficiência adrenal aguda é o efeito colateral documentado mais grave, tornando as reposições de glicocorticóide em altas doses e mineralocorticóide obrigatórios (63, 117). Em crianças, o uso do mitotane, foi ainda relacionado à neurotoxicidade, responsável por atraso no desenvolvimento neuropsicomotor (118, 119). Embora, o uso de mitotane em crianças com TAC ainda seja controverso, devido tanto às baixas taxas de resposta (25-30%), quanto pela alta toxicidade, melhorias na determinação central da concentrações plasmáticas de mitotane têm aumentado a sua aceitação (18). Importante destacar também que no tratamento com o mitotane perde-se o parâmetro laboratorial para rastreamento de recidivas de TAC secretores, aumentando a necessidade de exames de imagem no seguimento (63).

Os protocolos quimioterápicos mais utilizados em TAC incluem associações entre a doxorubicina (DOX), a cisplatina (CDDP) e o etoposídeo (ETO), ou a utilização de estreptozocina (Sz) de forma isolada (13, 18, 110). Em pacientes adultos com CAC em estágios III ou IV e para aqueles que não respondem ou não toleram os efeitos colaterais do mitotane, estes protocolos quimioterápicos têm pouca eficácia em controlar o crescimento tumoral e metástases. Um grande estudo multicêntrico europeu e norte-americano comparou os seguintes regimes de quimioterapia em pacientes adultos: ETO + CDDP + DOX + mitotane (EDP-M) com estreptozocina + mitotane (Sz-M). Os autores encontraram uma maior taxa de resposta no grupo EDP-M do que no grupo Sz-M (23,2% vs. 9,2%) e sobrevida livre de doença mais longa (21 meses x 5 meses, HR = 0,55), mas não houve diferença na sobrevida total entre os grupos (93). Até o momento, nenhum estudo comparativo foi realizado em pacientes pediátricos com TAC.

O GPOH-MET-97-Trial avaliou também protocolos quimioterápicos nos 34 pacientes que necessitaram de tratamento medicamentoso. Os protocolos quimioterápicos incluíam: a vincristina, a ifosfamida, a DOX, a carboplatina e o ETO. Receberam quimioterápicos e mitotane de forma neoadjuvante, 11 pacientes com tumores inoperáveis, dos quais oito tiveram a ressecção cirúrgica possível após a terapia. Dentre estes oito operados, cinco tiveram seus tumores completamente ressecados. De forma adjuvante, os protocolos foram administrados em 20 pacientes, e a quimioterapia de resgate devido a recorrências ou metastástases foi administrada em 16 pacientes, porém oito faleceram. Neste estudo, os resultados mais relevantes foram os relativos ao uso do mitotane. A avaliação do impacto da quimioterapia foi dificultada devido à impossibilidade de randomização, desta forma, a sobreposição com a administração do mitotane gerou um grande viés (92).

Em 2013, foi realizado o primeiro estudo utilizando modelo animal com xenotransplante de TAC pediátrico de comportamento maligno. O TAC metastático de um menino de 11 anos de idade, previamente não tratado, foi implantado no subcutâneo de ratos imunocomprometidos (CB17 scid ^{-/-}). O xenoenxerto manteve as características histopatológicas e moleculares do tumor primário e foi utilizado para investigar a capacidade de resposta a medicamentos. Entre os fármacos quimioterápicos habituais, o CDDP apresentou efeito antitumoral potente. O topotecan também apresentou resultado interessante, inibindo significativamente o crescimento tumoral. Após os resultados em animal, o topotecan foi utilizado em monoterapia em uma criança com recidiva de TAC, o que resultou em estabilização do tumor (120).

1.2.7. Aspectos Genéticos da Tumorigênese Adrenocortical

A etiopatogenia dos TAC ainda não é completamente conhecida. Nos últimos 20 anos diversos estudos importantes, incluindo estudos de *microarray* e, mais recentemente, estudos de sequenciamento em larga escala (121-125), ajudaram a elucidar parcialmente os fenômenos moleculares envolvidos na tumorigênese adrenocortical (22, 23, 126, 127). A seguir descrevemos resumidamente o conhecimento atual sobre as alterações moleculares observadas em tumores adrenocorticais, especialmente nos tumores pediátricos. Logo após, abordaremos o possível papel do gene DAX1 e sua interação com o SF1, via Wnt e células-tronco embrionárias na tumorigênese adrenocortical.

1.2.7.1. Origem Monoclonal e Células-Tronco Adrenais na Tumorigênese

O envolvimento de células-tronco embrionárias no desenvolvimento de cânceres de diversos órgãos, como mama, cérebro, cólon, pâncreas e sangue têm sido demonstrado (128). Existem evidências de que a maioria dos CAC possuem uma origem monoclonal, ou seja, que uma mutação inicial em uma única célula daria origem a esta neoplasia (129). Como as células-tronco/ progenitoras possuem um grande potencial de proliferação, é provável que elas sejam precursoras das neoplasias adrenais (130-132). Vários estudos têm demonstrado que os TAC podem ter uma origem monoclonal, o que sugere que um evento inicial em uma célula poderia provocar estes tumores (115). No entanto, estudos recentes vêm demonstrando que a tumorigênese é um processo complexo que requer múltiplos eventos moleculares, e que culmina com interações de sinalização intracelular entre percursos por meio de crosstalk.

Evidências clássicas obtidas a partir de um modelo de análise do cromossomo X em heterozigotos de células somáticas demonstrou que os CAC são derivados de células monoclonais (133). Estas evidências foram obtidas de pacientes adultos e dados sobre TAC pediátricos são limitados.

Além disso, vários estudos têm demonstrado a participação na tumorigênese adrenocortical de vias de sinalização importantes na regulação do desenvolvimento embrionário e morfogênese adrenais (41, 132, 134-136). Estas vias de sinalização que estão envolvidas no equilíbrio entre auto-renovação e diferenciação celulares no nicho de células-tronco incluem a *wingless-type* (Wnt), a Hedgehog (HH) e a Notch, (137, 138).

1.2.7.2. Células-tronco/ progenitoras adrenais

Por ser objeto do presente estudo, descreveremos em mais detalhes esse aspecto da organogênese adrenal e que pode estar envolvido no processo de tumorigênese.

No século XIX, Gottschau descreveu o processo de preenchimento adrenal com células de uma zona germinativa externa e o colapso celular na "zona consumptiva". Em 1909, Bongomolez confirmou estes achados, observando que a proliferação no córtex adrenal era restrita a área subcapsular da glândula e que essas células migravam centripetamente para preencher a região interna do córtex adrenal (130). Em 1938, experimentos pioneiros foram publicados, demonstrando que mesmo após remover a porção central da glândula adrenal de ratos, deixando apenas a cápsula e uma pequena camada abaixo dela, a adrenal era capaz de se regenerar completamente (139). Todas estas observações já evidenciavam a presença de células-tronco/ progenitoras adrenais e

sua importância na manutenção adrenal ao longo da vida. Porém, apenas recentemente, com os recursos de biologia molecular atuais, foi possível permitir a investigação dos mecanismos envolvidos. Vários estudos apontam para o envolvimento da desregulação destas vias em processos patológicos, como a tumorigênese. Portanto, o melhor entendimento da regulação de células-tronco/ progenitoras adrenais é de suma importância (6, 131).

Zubair e colaboradores, em 2006, mostraram que durante o desenvolvimento da adrenal fetal, o complexo de transcrição composto pela proteína homeobox PKN0X1 (Prep1), homeobox do gene 9 (Hox) e fator de transcrição célula pré-B leucemóide (Pbx1) são recrutados para o estimulador da adrenal fetal (EAdF) a partir da separação entre os primórdios adrenal e gonadal. Este EAdF regula a expressão de fator esteroidogênico 1 (*Sf1*), um fator de transcrição essencial para a esteroidogênese, apenas nas células da adrenal fetal (140). Estudos posteriores do mesmo grupo evidenciaram que a expressão de *Sf1* é regulada pelo EAdF apenas até o início da regressão da adrenal fetal (141). Estes estudos propuseram que após o início da regressão da adrenal fetal, o EAdF seria inibido e presumiram que um estimulador da adrenal definitiva (EAdD), ainda não caracterizado, passaria a regular a expressão do *Sf1*. Inferindo, portanto, que as células do córtex adrenal que expressam o *Sf1* teriam origem da adrenal fetal (140, 141).

Posteriormente, três grupos independentes evidenciaram que a sinalização da via sonic hedgehog (SHH) é essencial para a manutenção e o desenvolvimento adrenais em murinos (142-144). A expressão de *Shh* pode ser detectada em camundongos na região subcapsular adrenocortical, exatamente a partir do período em que ocorre formação da cápsula (144). Camundongos transgênicos cuja expressão de *Shh* foi inibida, especificamente em células que expressam o *Sf1*, apresentam hipoplasia adrenal, baixa proliferação celular e depleção da cápsula adrenal. Porém a estrutura do córtex é mantida. Indicando que a via SHH estaria relacionada com a manutenção da cápsula, mas não exerceria efeito sobre a diferenciação celular (143). Além de estas células expressarem *Shh* e *Sf1*, elas também expressavam a *Star* (proteína que transporta colesterol para a membrana interna das mitocôndrias), uma enzima cuja atividade é limitante à esteroidogênese. Porém, elas não expressavam nenhuma das outras enzimas necessárias para concluir a produção hormonal, normalmente expressas nas zonas glomerulosa e fasciculada (145). Reforçando o provável papel progenitor destas células.

Apesar destes estudos demonstrarem que células que expressam *Shh* e *Sf1* serviriam como células progenitoras, eles não demonstraram qual era a origem dessas células. A

expressão de Gli1 (Gli+), um ativador da via SHH, foi demonstrada especificamente em células da cápsula adrenal que não expressavam Sf1 (Sf1-). Sugerindo que provavelmente as células dessa subpopulação (Gli1+ e Sf1-) seriam capazes de originar as células adrenocorticais diferenciadas (Sf1+), ou seja, possivelmente as células-tronco (142-144).

Duas fontes em potencial seriam as candidatas à origem das células-tronco adrenocorticais, a cápsula adrenal e a adrenal fetal. Em 2013, Wood e colaboradores apresentaram evidências de que as células Gli+ e SF1-, presentes na região subcapsular, são originadas de células da adrenal fetal (146). O que reforça a hipótese levantada por este mesmo grupo em 2011, demonstrada na **Figura 3** (6). Neste novo estudo, foi verificado ainda que uma outra linhagem de células da cápsula que expressam *Tcf21* seria progenitora para as células estromais da glândula (146).

Portanto, as evidências atuais ajudaram à esclarecer várias características das células-tronco/ progenitoras adrenocorticais. O desafio atual ainda é identificar mais marcadores, tanto para células-tronco embrionárias (envolvidas no desenvolvimento da glândula), quanto para células-tronco adultas (responsáveis pela manutenção glândular) (131). Além, de seu possível envolvimento na tumorigênese.

Figura 3. Unificando os modelos de origem das células-tronco/embrionárias adrenais. Em vermelho, a zona fetal. Em amarelo, a medula adrenal. Em verde, as células da cápsula. Em preto, células progenitoras subcapsulares. Em cinza, o córtex definitivo. Figura adaptada de *Wood and Hammer, 2011* (6).

NANOG, OCT4 e SOX2 são reguladores mestres da pluripotência e da auto-renovação de células-tronco embrionárias, quer interagindo entre si e/ ou regulando vias envolvidas na proliferação de células-tronco, como a via LIF/STAT3 (147-150). Além disso, NANOG, OCT4 e STAT3 são expressos apenas nos estágios embrionários iniciais de murinos (antes de E9), antes mesmo de a função esteroidogênica começar, sugerindo que essas proteínas mantêm as células-tronco do córtex adrenal num estado indiferenciado (151-154). Não existem dados disponíveis sobre estas proteínas no desenvolvimento humano precoce.

De forma conjunta ou separadamente, NANOG, OCT4 e SOX2 têm sido associados à tumorigenicidade, metástase e recorrência em uma variedade de cânceres (155-158). Um estudo prévio relatou que a marcação positiva de STAT3 foi mais associada com CAC (9 de 24, 79%) do que com AAC (4 de 20, 20%) (159). Embora existam várias evidências que ligam a manutenção de células-tronco com a tumorigênese adrenocortical, o envolvimento dos marcadores NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 ainda não foi bem examinado nos TAC.

1.2.7.3. A Origem dos TAC Pediátricos por Transformação da Zona Adrenal Fetal

Uma hipótese atraente que tem sido proposta, afirma que os TAC pediátricos, mais especificamente aqueles diagnosticados nos primeiros anos de vida, podem ser originários da zona fetal da adrenal (160). Um argumento clínico para apoiar esta hipótese é que a maioria dos TAC pediátricos secreta grandes quantidades de DHEA e seu metabolito DHEAS, típicos da zona fetal. Após a regressão da zona fetal da adrenal em humanos, a zona reticular só começa a ser formada por volta dos 3 anos de idade, passando então a produzir o DHEA e o DHEAS entre os 5 e 7 anos (12). Embora esta hipótese ainda não tenha sido provada, há evidências que a suportam. Neste modelo, as células fetais poderiam sobreviver devido à apoptose prejudicada e progrediriam até o TAC, preservando algumas características da fase embrionária (160).

Boechat e co-autores, em 2011, mostraram que a fosfatase alcalina placentária (PLAP), uma proteína oncofetal, é expressa em TAC pediátricos, mas não no tecido adrenal pós-natal normal (161). Além disso, Lorea e co-autores, em 2012, demonstraram evidências sobre a apoptose prejudicada em nossa coorte de TAC pediátricos. Este estudo mostrou um perfil particular na expressão de genes relacionados com a apoptose em amostras de TAC pediátricos quando comparados às amostras de adrenais não neoplásicas. Estes resultados sugerem que defeitos nos mecanismos anti-apoptóticos podem estar envolvidos na biologia e prognóstico destes tumores. É importante notar que

os pacientes têm uma elevada prevalência da mutação P53 p.R337H , que é um gene importante no controle da via apoptótica. Portanto, estes resultados talvez não possam ser generalizados para TAC pediátricos sem mutações no gene *TP53* (162).

1.2.7.4. Mutações do *TP53*

O gene *TP53*, que está localizado no cromossomo 17p13.1, é o gene supressor mais frequentemente associado com neoplasias humanas. A proteína P53 é um fator de transcrição envolvido na regulação do ciclo celular, ativando a apoptose quando na presença de DNA danificado (163).

Além de pacientes de famílias com a síndrome de Li-Fraumeni, mutações no gene *TP53* também foram descritas em TAC esporádicos em pacientes pediátricos e adultos em todo o mundo. Ragazzon e co-autores, descreveram diferentes mutações somáticas no gene *TP53* em um subconjunto de pacientes adultos com TAC (p.L188WfsX2, p.E346X, p.C176F, p.R342P, p.A129del, p.R283C, p.E343X, p.R342P, e p.K132N) (164). Diversos relatos de casos clínicos também demonstraram pacientes pediátricos mutações nesse gene. Entre essas, as mutações IVS10-2 A> G (165), p.V143A (166), p.R175AfsX6 (167) e a mutação p.T220C (168).

A maioria dos pacientes brasileiros com TAC e originários das regiões Sudeste e Sul são portadores de uma mutação germinativa em heterozigose específica nesse gene, a mutação P53 p.R337H. A análise de haplótipos da mutação demonstrou que a probabilidade de esta mutação ocorrer independentemente é muito pequena, o que demonstra um efeito fundador potencial. Este estudo revelou que as famílias brasileiras que transportam o alelo mutante habitam, principalmente, locais próximos de uma antiga rota comercial dos tempos do Brasil-império feita por comerciantes de origem portuguesa nos séculos 18 e 19. Além disso, esta mutação foi encontrada num indivíduo português com nenhuma outra relação ao Brasil, reforçando a hipótese de que a mutação do P53 p.R337H tem uma origem em ancestral um português e tenha se disseminado nessas regiões do Brasil em função de sua baixa penetrância nas primeiras décadas de vida (169).

A mutação p.R337H está localizada no domínio de tetramerização da proteína P53. Esse domínio, na sua forma nativa, contribui para a estabilidade da P53 sob pH mais elevado, uma situação que pode ocorrer na glândula adrenal. É possível que, em função das modificações profundas que ocorrem no córtex adrenal no período pré e pós-natal imediato, com o aumento da apoptose das células do córtex fetal, haja aumento do pH, o

qual pode contribuir para a instabilidade do domínio tetramerização do mutante P53 p.R337H. Isso resultaria na perda da atividade supressora tumoral da P53. Por outro lado, as células com pH em torno de 7,0 podem ter uma proteína suficientemente estável para funcionar adequadamente, mesmo na presença do mutante P53 p.R337H. A ineficiência da proteína P53 em células adrenais desencadearia crescimento celular desordenado, levando ao desenvolvimento de tumores (170). A perda do alelo nativo representaria uma segunda lesão, de acordo com a teoria de Knudson (171), que pode ser crucial para o desenvolvimento deste tipo de tumor (172, 173).

No Sudeste e Sul do Brasil, em torno de 75-90% e 20-30% dos pacientes pediátricos e adultos com TAC, respectivamente, são portadores da mutação P53 p.R337H em heterozigose no DNA genômico e seu tecido tumoral apresenta perda do alelo nativo (22-24).

Embora os pacientes portadores da mutação P53 p.R337H possam não cumprir todos os critérios para a síndrome de Li-Fraumeni (LFS), é possível que esses pacientes e seus familiares portadores da mesma mutação apresentem risco aumentado para tumores comumente encontrados em LFS, bem como outros tumores, o que poderia caracterizar um tipo de *LFS-like*. Dados recentes mostraram que os carreadores da mutação P53 p.R337H têm risco aumentado de carcinoma do plexo coróide, osteossarcoma, câncer de mama, de estômago e de pulmão (174-176). Um estudo recente, analisando a frequência e a penetrância da mutação P53 p.R337H, constatou que um em cada 432 recém-nascidos no estado do Paraná, Brasil herdaram esta mutação. A penetrância desta mutação para o risco de desenvolvimento de TAC na primeira década de vida foi encontrado de 2 a 3% (25).

Até o momento ainda não foi bem estabelecido o aconselhamento genético mais adequado e o protocolo de acompanhamento para crianças afetadas e seus familiares carreadores da mutação P53 p.R337H. Um estudo recente de famílias com LFS e mutações do gene *TP53* (não incluindo a mutação p.R337H), mostrou aumento da sobrevivência entre aqueles pacientes que concordaram em seguir um protocolo de triagem abrangente na comparação com aqueles que não concordaram. Em crianças, este protocolo incluía ultra-som abdominal, hemograma, dosagens bioquímicas e hormonais a cada quatro meses e ressonância magnética de corpo inteiro anual. Além disso, a mamografia anual e colonoscopia foram também realizados em adultos (177). A relação custo/benefício deste procedimento em portadores P53 p.R337H ainda não foi abordada e merece futura atenção.

No nosso Centro, os pacientes com TAC e portadores da mutação P53 p.R337H têm acompanhamento mais intensivo por cinco anos após o diagnóstico em termos de doença adrenal. Esse acompanhamento se torna anual nos anos seguintes. Nós ainda não sabemos se e quando esse acompanhamento deve ser interrompido. Apesar do risco de desenvolver outros tumores, como discutido acima, não realizamos rotineiramente rastreio para estas malignidades. No entanto, os pais dos pacientes são informados sobre essa incerteza e a eventual necessidade de vigilância a longo prazo. Essa prática deverá mudar num futuro próximo face às crescentes evidências de risco cumulativo de desenvolver diversos tipos de tumor após a terceira década de vida.

1.2.7.5. Alterações na Via de Sinalização Wnt/Beta-catenina

A via Wnt interfere no desenvolvimento embrionário de vertebrados e invertebrados, exercendo seu papel na simetria, organogênese e destino celular (178-180). Além disso, esta via possui papel muito importante na homeostase de tecidos, através da auto-renovação e proliferação de células-tronco, bem como de sua diferenciação e migração (91, 178, 181, 182).

É amplamente conhecido que a ativação anormal da via Wnt canônica (ou via Wnt/Beta-catenina) desempenha um papel importante no desenvolvimento de diversos tipos de cânceres. Mais recentemente tem demonstrado seu papel na tumorigênese adrenocortical (30, 178, 183). Mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* que codifica a proteína Beta-catenina diminuem a taxa de degradação desta proteína, mantendo essa via ativada constitutivamente. Mutações nesse gene são encontradas frequentemente em até 36% dos TAC de pacientes adultos, predominantemente nos tumores não secretores e com frequências semelhantes nos AAC e CAC (183-186). Os CAC carreadores de mutações no *CTNNB1* e/ou com acúmulo anormal de beta-catenina citoplasmática e nuclear apresentam fenótipo tumoral mais agressivo (164). Em pacientes franceses de uma grande coorte de estudo de CAC, os tumores foram subdivididos em carreadores de mutações nos genes no *CTNNB1* ou no *TP53*, porém ambos apresentaram mau prognóstico para os pacientes. Curiosamente, nesses pacientes, essas mutações eram mutuamente exclusivas, isto é, nenhum dos CAC analisados carregava mutações simultaneamente nesses dois genes (164). Cabe salientar que a maioria dos CAC analisados eram esporádicos e as mutações no gene *TP53* eram somáticas.

Mais recentemente, um estudo de sequenciamento em larga escala, realizado pelo mesmo grupo francês, encontraram uma mutação recorrente no gene *ZNRF3*. A proteína

codificada por este gene é uma ubiquitina ligase de superfície celular que modula negativamente a via Wnt/Beta-catenina, promovendo redução na ativação do receptor LRP5/FRIZZLED. As mutações inativadoras e deleções homozigóticas detectadas neste gene induzem a uma ativação da via Wnt/Beta-catenina (187).

Analisando a nossa coorte de TAC pediátricos, detectamos inicialmente mutações no gene *CTNNB1* em apenas 6% dos tumores e todos os pacientes eram portadores da mutação P53 p.R337H. Encontramos associação entre a presença de mutações no *CTNNB1* e risco de morte. Porém o número de casos com essa mutação era muito pequeno para generalizar esta constatação. Além disso, verificou-se acúmulo de Beta-catenina difusa no citoplasma e/ou núcleo em 71% dos TAC. Portanto, o acúmulo anormal de Beta-catenina estava presente na maioria dos tumores, mesmo naqueles sem mutações no *CTNNB1*. Nestes tumores detectou-se diminuição da expressão de genes que codificam proteínas inibidoras na via Wnt, como *DKK3*, *SFRP1* e *AXIN1*. Por outro lado verificou-se também aumento da expressão de WISP2, um dos alvos da Beta-catenina (30). Frente a esses achados hipotetizamos que a ativação da via Wnt/Beta-catenina observadas na maioria dos TAC pediátricos não se deve a mutações no *CTNNB1* mas sim a outras alteração na expressão gênica de reguladores dessa via, por mecanismos que ainda estão sendo desvendados. Curiosamente, em nossos pacientes pediátricos, as mutações no *CTNNB1* foram encontrados em pacientes com a mutação P53 p.R337H. Assim, ao contrário de pacientes europeus adultos com TAC esporádicos, mutações no *CTNNB1* e *TP53* podem coexistir em nossos pacientes.

Recentemente, foram desenvolvidos modelos murinos geneticamente modificados com ativação constitutiva da Beta-catenina (Δ Cat). Esta ativação exclusiva no córtex adrenal resulta em esteroidogênese aumentada, hiperplasia de células indiferenciadas e displasia do córtex e medula. Em alguns desses animais as adrenais desenvolvem características malignas, como neovascularização descontrolada e invasão metastática loco-regional (188). Esses dados obtidos *in vivo* combinados com os achados *ex vivo* nos TAC reforçam que a via de sinalização Wnt/Beta-catenina pode ser um alvo terapêutico potencial para o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento de pacientes com TAC malignos (188).

Um estudo *in vitro*, em 2011, demonstrou superexpressão de genes alvo da via Wnt/Beta-catenina, tais como *RALBP1*, *PDE2A* e *ENC1* em TAC de pacientes adultos com mutações na Beta-catenina. Após o tratamento com os compostos PKF115-584 e PNU74654, ambos inibidores dessa via, houve diminuição da expressão de *RALBP1*,

PDE2A e *ENC1* nas células tumorais adrenais H295R (185). Um trabalho anterior já tinha demonstrado que PKF115-584 de maneira dose-dependente inibia a Beta-catenina, reduzindo a transcrição e proliferação de H295R, mesmo na presença de níveis aumentados de SF1, que promove a proliferação desta linhagem celular. Nas células H295R, que carregam a mutação Beta-catenina p.S45P, foram observadas tanto ativação constitutiva da transcrição da Beta-catenina quanto localização nuclear de Beta-catenina. Ademais, a droga não teve efeito sobre as células HeLa, uma linhagem celular em que a via Wnt/Beta-catenina não é ativada. Além disso, PKF115-584 diminuiu a porcentagem de células H295R em fase S e aumentou da porcentagem de células apoptóticas (189). Mais recentemente confirmamos e expandimos esses dados ao demonstrar que a inibição da ligação dessa via pelo PNU74654, que inibe o complexo TCF-LEF/Beta-catenina, tem potente ação anti-tumoral *in vitro* (190). No entanto, até o momento, estudos pré-clínicos ou clínicos usando esta abordagem ainda não foram relatados.

1.2.7.6. A via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH)

A sinalização da via HH regula a proliferação e diferenciação de células-tronco no sistema nervoso central, pele, intestino, glândula mamária, pâncreas e córtex adrenal (134, 138, 142, 191-193). A via HH possui três genes homólogos: Sonic (*SHH*), Desert (*DHH*) e Indian (*IHH*) (194). Além de sua contribuição no desenvolvimento normal de glândula adrenal, recentemente, o envolvimento da via HH na tumorigênese adrenocortical tem sido investigado. Porém os dados na fisiologia e fisiopatologia nas adrenais ainda são escassos.

Em 2014, Werminghaus e co-autores demonstraram que em adenomas produtores de cortisol, a sinalização da via HH era semelhante à do córtex adrenal normal. Por outro lado, observaram uma maior expressão de RNAm de *GLI1*, *SMO* e *SHH* em adenomas adrenais não produtores de hormônios (195).

Avaliando um painel de córtices adrenais humanos normais em diferentes fases do desenvolvimento fetal e pós-natal, nosso grupo demonstrou que as proteínas da via SHH estavam presentes em adrenais normais fetais e pós-natais e apresentaram padrões espaço-temporais distintos de expressão proteica ao longo do desenvolvimento adrenal. Além disso, demonstramos que os CAC de pacientes adultos apresentavam maior expressão de RNAm de componentes da via SHH como *PTCH1*, *SMO*, *GLI3* e *SUFU* em comparação aos córtices adrenais normais. Por outro lado, os TAC pediátricos

apresentaram menor expressão do RNAm de *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* e *Gli3* comparação com córtices adrenais pediátricos normais (134).

1.2.7.7. Fator Esteroidogênico 1 (SF1)

O SF1, membro da superfamília dos receptores nucleares órfãos, é uma proteína codificada pelo gene *NR5A1* (*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*) mapeado no locus 9q33.3. O SF1 é um fator de transcrição importante na regulação da região promotora proximal de diversas enzimas esteroidogênicas do citocromo P450 (196). Além disso, o SF1 atua em vários níveis do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, regulando a expressão de genes que controlam a esteroidogênese e a reprodução (197). O SF1 possui um domínio clássico de ligação ao DNA (DBD) contendo dedos de zinco na região amino-terminal, e outro domínio conservado na região carboxi-terminal, dito como domínio de ligação ao ligante (LBD) (197). Como não há um ligante conhecido que ative SF1, este é denominado um receptor nuclear órfão (196).

O SF1 contém uma região ativadora, no resíduo serina 203, localizada entre os 2 domínios de ligação que somente é fosforilada pela MAPK (Erk2) e facilita o recrutamento de cofatores, incluindo coativadores e correpressores (198). Além do córtex adrenal, o SF1 também é expresso em gonadotrofos e no núcleo hipotalâmico ventromedial (197).

O fenótipo das mutações inativadoras do gene *NR5A1* em humanos demonstrou a importância deste fator de transcrição no desenvolvimento e função endócrina. A primeira mutação, uma substituição do aminoácido glicina por glutamato no códon 35 do SF1, foi identificada em uma paciente com insuficiência adrenal e sexo reverso XY com disgenesia gonadal bilateral (199). Posteriormente, a identificação de uma microdeleção de 8 pares de bases no gene *NR5A1* em uma paciente com sexo reverso XY e função adrenal normal demonstrou que o efeito negativo de mutações do *NR5A1* pode afetar diferentemente a atividade transcricional gonadal e adrenal (200).

O córtex adrenal é formado a partir da diferenciação de células originárias do primórdio adrenogonadal (8). Embora a formação inicial do primórdio adrenogonadal ocorra na ausência do SF1, eventos subsequentes no processo de diferenciação são dependentes de SF1. Na ausência de SF1, como demonstrado em modelos animais deficientes deste fator, estas células sofrem apoptose, resultando em agenesia adrenal e morte pós-natal por insuficiência adrenal (201, 202). O SF1 mostrou-se também essencial para o crescimento adrenal residual após adrenalectomia unilateral em um estudo com camundongos transgênicos adultos com haploinsuficiência deste fator de transcrição

(203). Estas observações sugeriram que o SF1 regula a expressão de genes que controlam a proliferação celular e apoptose no córtex adrenal.

1.2.7.8. SF1 e Tumorigênese Adrenocortical

Estudos prévios demonstraram ganho e amplificação na região cromossômica 9q33.3, onde se localiza o gene *NR5A1*, em TAC diagnosticados em crianças (204, 205). Posteriormente, estes dados foram confirmados. Amplificação do gene *NR5A1* foi evidenciada por hibridização *in situ* e detectada por fluorescência (FISH) em oito de nove TAC de crianças brasileiras, sugerindo uma associação entre o aumento do número de cópias deste gene e a tumorigênese adrenocortical (206). Além disso, em adultos, tumores não esteroidogênicos não expressaram a proteína SF1 (207). O aumento da expressão de RNAm de *NR5A1* e o aumento no número de cópias deste gene são mais comuns em TAC pediátricos comparados aos TAC em pacientes adultos (208). Nenhuma correlação foi encontrada entre o aumento da expressão do *NR5A1* e variáveis histológicas e/ou manifestação clínica da doença em crianças (127). No entanto, em pacientes adultos, a expressão aumentada de *SF1* correlacionou-se com pior prognóstico (207).

Estes dados clínico-moleculares abrem as perspectiva para a pesquisa de novos fármacos potencialmente úteis no tratamento de pacientes com carcinomas adrenocorticais. Alguns estudos têm sido focados em possível aplicação prática de drogas que agem como agonistas inversos do SF1. Algumas drogas da classe das isoquinolinas já foram testadas em meios de cultura com células de TAC, demonstrando inibição seletiva daquelas que expressavam SF1 (H295R) versus aquelas que não expressavam SF1 (SW-13), além de diminuir a secreção de aldosterona mediada por angiotensina II e a secreção do cortisol e DHEAS estimuladas por forskolina (209, 210).

1.2.7.9. "Dosage-sensitive sex reversal, Adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1" (DAX1)

O gene *NR0B1* (*nuclear receptor subfamily 0, group B, member 1*) codifica a proteína DAX1 que também pertence à superfamília dos receptores nucleares órfãos. Este gene está localizado no braço curto do cromossomo X, região Xp21. O DAX1 também não possui ligante conhecido até o presente, fazendo parte, por isso, da família de receptores nucleares órfãos (151, 211). Mutações inativadoras no gene *NR0B1* foram encontradas em pacientes com hipoplasia adrenal congênita forma citomegálica ligada ao X (212, 213). Foi observado também que este gene encontrava-se duplicado em pacientes com diagnóstico

de sexo reverso 46, XY sem alterações no gene SRY. Desta forma, o *locus* do cromossomo X contendo o gene *NR0B1* foi denominado *dosage sex-reversal sensitive* ou DSS (214).

Estruturalmente o gene *DAX1* é formado por dois éxons flanqueando uma região intrônica de 3,4 kb. A maior parte da região codificadora é formada pelo éxon 1, que possui 1,1 kb e codifica o DBD e parte do LBD. O éxon 2 possui 0,2 kb e codifica a porção restante do LBD. O DBD é composto de dois dedos de zinco canônicos e um domínio articulado necessário para a mudança conformacional, que em outros receptores nucleares é tipicamente mediada pela ligação de um ligante. O DAX1, porém, é um receptor nuclear órfão. A proteína DAX1, por sua vez, é composta por 470 aminoácidos (151, 215).

O DAX1 atua ligando-se ao DNA, através do DBD, e possui função predominantemente repressora da transcrição de outros receptores nucleares, como, por exemplo, o SF1 e o receptor estrogênico (151, 212). Foi demonstrado que a expressão aumentada do DAX1, por transfecção em uma linhagem celular de tumores adrenocorticais (Y-1), suprimia a expressão gênica da proteína regulatória aguda da esteroidogênese (StAR), diminuindo de forma significativa a secreção de esteróides (216). O papel repressor do DAX1 sobre a transcrição mediada por SF1 no córtex adrenal já é bem evidenciado, provavelmente através do recrutamento de correpressores como o correpressor de receptor nuclear (NCoR) e o Alien para o complexo transcricional (216, 217). O SF1 regula positivamente a expressão de quase todas as enzimas esteroidogênicas envolvidas na produção de cortisol e aldosterona (incluindo StAR, 11-hidroxilase e 17-hidroxilase), exceto a aldosterona sintetase (218). Por outro lado, foi visto também que em murinos o DAX1 em altas doses pode formar complexos coativadores juntamente com NCOA2 e SRA1, estimulando expressão de SF1. Sugerindo, portanto, apresentar função de regulação dual, como coativador ou correpressor de SF1, dependendo da quantidade transcrita (217).

Em modelo animal murino, na tentativa de recriar o fenótipo de hipoplasia adrenal congênita observado em humanos com mutação de *NR0B1*, foi utilizada técnica *knockout* para *Dax1* (*Dax1*^{-/-}), sendo deletado o éxon 2. Observou-se, porém, que nestes camundongos *Dax1*^{-/-} ocorria aumento da esteroidogênese adrenal no período pós-natal. Aparentemente, isso ocorria devido à ausência do efeito inibidor exercido pelo DAX1 sobre a esteroidogênese. Por outro lado, as diferenças genéticas adrenais entre murinos e humanos foram responsabilizadas pela diferença fenotípica (219, 220).

Dois estudos independentes identificaram um segundo transcrito do gene *NR0B1* a

partir de *splice* alternativo. Este transcrito, DAX1A ou DAX1 α , é codificado pelo éxon 1 (1,1 kb) e uma segunda porção pequena, éxon 2 α , localizada na região intrônica do transcrito padrão do gene *NR0B1*. DAX1 α é uma proteína mais curta, com 401 aminoácidos, perdendo a porção 390 – 470 da proteína original. Esta proteína foi observada estar expressa em uma variedade maior de tecidos do que o transcrito padrão DAX1 (215, 221). Por modelos de interação molecular, um destes estudos mostrou que apesar do DAX1 α manter em sua estrutura o DBD idêntico ao DAX1, sua interação com o SF1 era diferente (215). O DAX1 α é incapaz de interagir com outros correpressores e inibir a atividade de SF1 na esteroidogênese. *In vitro*, o DAX1 α tem papel oposto ao DAX1 e parece exercer efeito positivo sobre o SF1 (215).

1.2.7.10. DAX1, via Wnt/Beta-catenina e Células-Tronco Embrionárias Adrenais

Utilizando técnicas de silenciamento da expressão gênica com moléculas de RNA de interferência (siRNA) demonstrou-se que a expressão de *Dax1* está relacionada à manutenção das células-tronco embrionárias adrenais em um estado indiferenciado, pois ao inibir a expressão de *DAX1* estas mesmas células se diferenciavam (151).

Como citado previamente, observou-se uma discrepância entre os fenótipos de pacientes com deficiência de DAX1 e o modelo murino deficiente de DAX1. Pacientes com mutação no *DAX1* apresentam hipoplasia adrenal congênita citomegálica e insuficiência adrenal, enquanto murinos deficientes de DAX1 apresentam hiperfunção adrenocortical no início da vida. Um estudo recente, porém, observou que estes animais apresentavam função exacerbada de córtex adrenal e histologia preservada no início da vida. Porém prolongando-se a observação esta função era perdida e a glândula tornava-se hipoplásica, tal qual em seres humanos. Neste estudo, os resultados sugeriram que a provável perda da inibição do DAX1 sobre o SF1 proporcionaria hiperfunção em um primeiro momento. Posteriormente a falta do DAX1 na manutenção das células-tronco embrionárias/progenitoras indiferenciadas da glândula culminaria na ausência de renovação celular, determinando a posterior desestruturação, hipoplasia e hipofunção adrenocorticais (222).

Estes resultados demonstraram-se consistentes com o papel de DAX1 na manutenção das células progenitoras adrenocorticais. Tais células, cujo papel na embriogênese adrenal será discutido em detalhes adiante, parecem estar localizadas na região subcapsular da glândula adrenal. Estudos prévios observaram que a sinalização da

via Wnt ativa a transcrição de *Dax1* (223) e a inativação da beta-catenina resulta em aplasia adrenal em camundongos transgênicos (224). Estes fatos somados à co-expressão de beta-catenina e do DAX1 na região subcapsular adrenal, denotam provável interação fisiológica entre a via Wnt e DAX1 na manutenção das células progenitoras adrenais na forma indiferenciada (222).

1.2.7.11. DAX1 e Tumorigênese Adrenocortical

O papel do gene DAX1 na tumorigênese adrenocortical ainda não está bem estabelecido. Na linhagem celular de câncer adrenocortical NCI-H295, foi demonstrado que o SF1 ativa a expressão de DAX1 (225). Em um painel de adrenais normais e de tumores adrenocorticais incluindo 3 adenomas não funcionantes, 8 adenomas produtores de cortisol, 11 aldosteronomas e 5 carcinomas, sendo a quase totalidade de pacientes adultos a expressão do gene *DAX1* foi analisada pela técnica de *Northern blot*. Detectou-se expressão mais elevada de *DAX1* em tumores não funcionantes, expressão baixa ou indetectável em aldosteronomas, intermediária em adenomas produtores de cortisol e heterogênea no grupo de carcinomas (226). Um outro estudo, também em pacientes adultos, demonstrou que a expressão da proteína DAX1 está significativamente reduzida em adenomas produtores de cortisol. Nestes tumores, a expressão reduzida de DAX1 resultaria no aumento da atividade da enzima 17 α -hidroxilase (227). Dados opostos foram relatados por Bassett co-autores (228), que encontraram expressão reduzida de *DAX1* em adenomas produtores de cortisol e aldosterona quando comparados com tecidos adrenocorticais normais.

Em Tese de doutorado, Almeida (2008) analisou a expressão de DAX1 em adrenais normais e em amostras de TAC obtidas de 23 pacientes na faixa etária pediátrica (0,9 a 15 anos) e 34 pacientes adultos (18 a 66 anos). A análise da expressão proteica por meio de imunohistoquímica demonstrou imunorreatividade para DAX1 em 90% das células corticais de amostras de adrenais normais de crianças. Por outro lado, avaliando cinco glândulas adrenais normais obtidas de indivíduos adultos, esta imunorreatividade foi observada em $42,7 \pm 20,9\%$ das células corticais. Em relação à expressão de RNAm, foi observada hiperexpressão de *DAX1* em 30% dos tumores pediátricos e em 41% de pacientes adultos, não tendo sido encontrada diferença entre os dois grupos analisados. O aumento da expressão da proteína DAX1 foi identificado em 36% e 27% dos tumores adrenocorticais diagnosticados em crianças e adultos, respectivamente. Neste mesmo estudo, não houve diferença na expressão do *DAX1* e não diferiu entre os tumores

adrenocorticais funcionantes e não funcionantes (229).

Posteriormente, um estudo demonstrou que a marcação nuclear forte de DAX1 era mais frequente em TAC pediátricos do que em TAC adultos (74% vs. 24%, respectivamente). Este mesmo estudo, descreveu que a marcação nuclear forte de DAX1 se associou a TAC em crianças mais jovens (mediana 1,2; intervalo 0,5 - 4,5 vs. 2,2; 0,9 - 9,4; $p = 0.038$). Além disso, a expressão de DAX1 teve correlação positiva com SF1, tanto a nível proteico como de RNAm (230).

1.3. RACIONAL DO PRESENTE PROJETO

A hiperexpressão e/ou o aumento do número de cópias de SF1 é uma característica importante dos tumores adrenocorticais pediátricos, sugerindo um papel importante do SF1 na tumorigênese adrenocortical (208). Além disso, em pacientes adultos, a expressão aumentada de *SF1* correlacionou-se com pior prognóstico (207). Os mecanismos envolvidos no aumento da expressão de SF1 nestes tumores ainda não são conhecidos. O SF1 apresenta uma relação fisiológica dual com o DAX1, podendo inibir ou estimular sua expressão (216, 217). Até o presente, a relação entre a existência de correlação entre a expressão destes dois genes em TAC ainda não está completamente elucidada. Adicionalmente um produto de *splice* alternativo de *DAX1*, nomeado DAX1 α , parece exercer apenas efeito positivo sobre a expressão de SF1 (215) e sua expressão em TAC ainda não foi analisada. Estudos demonstraram que o DAX1 está associado à manutenção de células-tronco/ progenitoras em seu estado indiferenciado (211). Função esta que está relacionada também com a via de sinalização Wnt.

A desregulação da via Wnt vem sendo demonstrada em adenomas e carcinomas adrenocorticais tanto em TAC de adultos (173), quanto em TAC pediátricos, segundo dados recentes de nosso grupo (135). Além disso, mutações no *CTNNB1*, que codifica beta-catenina, parecem estar associadas a pior prognóstico em carcinomas adrenocorticais (164). A via de sinalização Wnt/Beta-catenina tem importância fundamental no desenvolvimento embrionário, na manutenção de células-tronco embrionárias e na diferenciação de vários tecidos (231, 232). O envolvimento de células progenitoras no processo de tumorigênese tem sido demonstrado de forma crescente em vários tipos de tumores (128).

Nosso grupo vem trabalhando na busca de possíveis mecanismos moleculares envolvidos no processo de tumorigênese adrenocortical, especialmente em TAC pediátrico. Dentro desta linha de investigação e baseado nos dados expostos

anteriormente, neste projeto pretendemos investigar o papel de DAX1, sua correlação com outras vias e se ele demonstra relação com células-tronco embrionárias na tumorigênese adrenal.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar o papel dos genes DAX1, SF1 e dos genes marcadores de células-tronco/progenitoras adrenais STAT3, OCT4, NANOG e SOX2 no desenvolvimento do córtex adrenal, bem como na tumorigênese adrenocortical e sua relação com alterações na via Wnt.

2.2. Específicos

- Avaliar se existe relação entre as expressões de DAX1, SF1 e marcadores de células-tronco/ progenitoras adrenais (STAT3, OCT4, NANOG e SOX2) no desenvolvimento do córtex adrenal.

- Avaliar se existe relação entre as expressões de DAX1, SF1 e marcadores de células-tronco/ progenitoras adrenais (STAT3, OCT4, NANOG e SOX2) na tumorigênese adrenocortical.

- Avaliar se existe relação entre as expressões de DAX1, SF1 e marcadores de células-tronco/ progenitoras adrenais com a expressão da Beta-catetina.

- Avaliar se a expressão de DAX1, SF1 e dos marcadores de células-tronco e progenitoras adrenais se associam com fenótipo e evolução clínica tumorais.

3. METODOLOGIA

3.1. Desenho experimental do Estudo

O resumo esquemático do desenho experimental deste estudo está na Figura 4:

Figura 4. Esquema do desenho experimental do estudo. IHQ: imunohistoquímica; qPCR: reação quantitativa da polimerase em cadeia. MLPA: multiplex ligand probe amplification.

3.2 Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Processo nº 3019/2013 - **Anexo 1**). Todos os pacientes ou seus responsáveis legais assinaram TCLE (termo de consentimento livre e esclarecido - **Anexo 2**). As amostras obtidas de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto foram adicionadas ao Biorrepositório - "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas", aprovado pelo Comitê de Ética (Processo nº 5856/2013 - **Anexo 3**). A utilização de amostras de adrenais fetais utilizadas neste estudo também foi aprovada pelo Comitê de Ética (Processo nº 11614/2011). A utilização de amostras provenientes do Centro Infantil Boldrini foram também aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa daquela instituição (Ofício CEP 07/12 - **Anexo 4**).

3.3. Pacientes

Nossa casuística foi constituída por 96 amostras de TAC de pacientes pediátricos e 18 amostras de TAC de pacientes adultos, oriundos de 2 centros de referência no tratamento desta doença no estado de São Paulo: o HC-FMRP-USP e o Centro Infantil Boldrini, Campinas – SP (**Anexos 5 e 6**). Todos os pacientes incluídos em nossa casuística passaram por avaliação clínica e laboratorial nos dois centros de referência preenchendo critérios laboratoriais e de imagem para o diagnóstico de tumor adrenocortical e, posteriormente, foram submetidos a excisão cirúrgica do tumor como parte do tratamento preconizado para a doença (18).

Os critérios de inclusão foram: a confirmação diagnóstica de neoplasia adrenocortical pela biópsia; quadro clínico e laboratorial de hipercortisolismo e/ ou hiperandrogenismo ou, ainda, neoplasias adrenocorticais não secretoras de hormônios; a disponibilidade de material biológico (tecido tumoral); e a concordância dos pacientes ou seus responsáveis com a realização do estudo. Como critérios de exclusão foram adotados: neoplasias adrenocorticais secretoras de aldosterona; massas adrenais não neoplásicas; neoplasias metastáticas na adrenal oriundas de tumor primário não-adrenal e a falta de material biológico disponível.

Durante a adrenalectomia, um fragmento de tecido tumoral foi coletado e armazenado em nitrogênio líquido, para posterior microdissecção por patologista experiente, que separou da amostra porções de tecido não tumoral. A amostra tumoral microdissecada foi armazenada a -70°C até a realização dos experimentos. Para as

análises envolvendo imunoistoquímica, foram preparadas lâminas a partir do material tumoral estocado em blocos de parafinas que haviam sido confeccionados pelos respectivos Serviços de Patologia logo após a extração cirúrgica das amostras.

Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas e laboratoriais: sexo, idade ao diagnóstico, perfil hormonal (síndrome virilizante, hipercortisolismo ou tumor misto) e estadiamento tumoral de acordo com os critérios clínicos de Sandrini *co-autores* (19) e com os critérios histopatológicos de Weiss (66). Analisamos também a evolução pós-cirúrgica, incluindo a ocorrência de recidivas tumorais, tempo de sobrevida e / ou cura.

3.4. Córtices Adrenais Normais: Fetais e Pós-natais

Avaliamos um grupo de 30 amostras parafinadas de tecidos adrenais normais obtidos de fetos que sofreram aborto espontâneo com idade gestacional de 25 a 40 semanas e de 14 crianças com idades variando desde o período neonatal até 10 anos de idade que foram submetidos a necropsia de rotina no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Foram excluídas as amostras em que os fetos ou crianças apresentavam múltiplas malformações ou crianças que fizeram uso prévio de glicocorticóides. Os dados das amostras com relação à idade gestacional, o sexo e a causa mortis estão detalhadas no **Anexo 7**.

Além disso, 26 amostras frescas congeladas de córtices adrenais normais foram utilizadas como controle em análises de qPCR. Dessas 26 amostras, 10 foram obtidas de crianças submetidas a nefrectomia para tratamento de tumor de Wilms, 2 de neonatos que faleceram por malformações cardíacas e não fizeram uso de corticoide prévio e 14 de indivíduos adultos previamente saudáveis, sem antecedentes de doenças crônicas, que tiveram mortes de causas agudas (**Anexo 8**). Estas amostras foram colhidas nos Departamentos de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - USP e do Centro Infantil Boldrini.

3.5. Análise Molecular

3.5.1. Extração de DNA

A extração de DNA tumoral e de adrenais normais microdissecados foi realizada com o QIAmp® DNA Mini Kit (Qiagen, CA, Estados Unidos) seguindo o protocolo do fabricante. Em seguida, a integridade e qualidade das amostras foi verificada através do Bioanalyzer (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos) (**Figura 5**). A quantificação foi realizada por ensaio fluorimétrico Qubit® (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA,

Estados Unidos) utilizando o kit Qubit® dsDNA HS Assay Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos).

Figura 5. Gráfico ilustrativo demonstrando a integridade do DNA de amostra de tumor adrenocortical (amostra 2075 TuA).

3.5.2. *Multiplex Ligation Probe-dependent Amplification (MLPA)*

Utilizamos o método de MLPA para verificar alteração do número de cópias dos genes e também de éxons isolados de *NR0B1* e *NR5A1* com o kit *SALSA MLPA P185-B2 Intersex®* (MRC-Holland, Holanda), segundo o protocolo do fabricante. Além de nossos genes-alvo citados, o kit dispõe de sondas para genes marcadores do cromossomo X (*PHEX*, *COL4A5*, *GJB1* e *PQBP1*) e do cromossomo Y (*SRY*, *ZFY* e *UTY*). Após a reação, foi feita a leitura dos produtos do ensaio por eletroforese capilar no sequenciador 3130 Genetic Analyzer® (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) e os dados gerados foram analisados por meio do programa Coffalyser.Net® (MRC-Holland, Holanda).

Para a análise, utilizamos como amostras de referência apenas adrenais normais de indivíduos do sexo masculino. Desta forma, o programa traçou uma normalidade, escolhida de modo arbitrário, que no gráfico significa estar entre 0,7 e 1,3; baseado no material genético de indivíduos 46XY normais. Portanto, indivíduos do sexo masculino normais que apresentavam apenas uma cópia do gene *NR0B1* (localizado no cromossomo X) apresentavam as sondas para este gene entre os limites de referência (**Figura 6A**). Ao passo que pacientes do sexo feminino normais apresentavam, como esperado, aumento de cópias de *NR0B1* e ausência dos genes marcadores do cromossomo Y (**Figura 6B**).

Figura 6. MLPA em adrenal normal. (A) Gráfico de MLPA em amostra de indivíduo 46XY. (B) Gráfico de MLPA em amostra de indivíduo 46XX; círculo vermelho indica aumento dos genes marcadores do cromossomo X; círculo amarelo indica ausência dos marcadores do cromossomo Y.

3.5.3. Avaliação de Mutações dos genes *TP53* e *CTNNB1*

Esta etapa foi realizada em trabalhos prévios de nosso grupo (30, 41, 134). Foi avaliada a presença da mutação c.1010G>A do gene *TP53* (P53 p.R337H) no DNA genômico e no DNA tumoral. Para tal, foram utilizados oligonucleotídeos iniciadores nas regiões intrônicas entre os éxons 9-10 e 10-11.

As análises de mutações na região codificadora dos sítios de fosforilação do gene *CTNNB1* foram realizadas através do cDNA tumoral. A região submetida à análise localiza-se entre os éxons 2 e 5 (30).

3.5.4. Extração de RNA

Para extração de RNA total 50µg de tecido tumoral microdissecado foi congelado em nitrogênio líquido, macerado e adicionado o TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), o procedimento de extração seguiu o protocolo sugerido pelo fabricante. A integridade das amostras foi verificada pela visualização das bandas de RNA ribossômico 28S e 18S em gel de agarose 1,2% corado com solução de brometo de etídeo 0,5%. A quantificação do RNA foi realizada por espectrofotometria no NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) e o cálculo da razão entre a densidade ótica em 260 e 280 nm o que serviu para estimar o grau de pureza do RNA total (1,8 +/- 0,2).

3.5.5. Digestão com DNase

As sondas para os genes *NANOG*, *OCT4* e *SOX2* se ligam a região de um único éxon. Em função disso, para evitar a possibilidade de amplificação de DNA genômico, foi realizada a digestão das amostras com DNase I, Amplification Grade (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), segundo o protocolo recomendado pelo fabricante. Após a digestão, as amostras foram submetidas à síntese de cDNA.

3.5.6. Síntese de cDNA

As amostras de RNA foram diluídas a 100 ng/µL e a reação de transcrição reversa foi realizada com o auxílio do kit High-Capacity cDNA Transcriptase reversa (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) segundo protocolo recomendado pelo fabricante.

3.5.7. PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

A seguir foram realizados os ensaios TaqMan® (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) para avaliar a expressão do RNAm dos genes *NR5A1*, *NR0B1*, *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2*, *STAT3* e para controle endógeno *GUSB* (**Tabela 4**).

O cDNA foi diluído na proporção de 1:50 antes de sua utilização nos ensaios de qPCR. As reações foram feitas em duplicatas, utilizando placas de 96 poços com 0,5µL do produto contido em cada reação TaqMan™ do ensaio específico para cada gene, 5µL de Master mix, 4,5 µL de cDNA diluído. As reações foram submetidas a uma temperatura inicial de 50°C por 2 min, seguida de uma desnaturação a 95°C por 10 min e 40 ciclos sucessivos a 95°C por 15 s e 60°C por 1 min. A fluorescência foi detectada a cada ciclo, obtendo-se um gráfico da variação da fluorescência (ΔRn) pelo número de ciclos (Cycle

Number), ao final dos ciclos amplificação. As curvas de amplificação foram visualizadas pelo software ABI Prism® 7500 (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), a linha de base (Baseline) estabelecida e o limiar de detecção (Threshold) ajustado na fase exponencial do gráfico. O Threshold indica o ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente, teoricamente correspondente a mesma quantidade de produto de PCR. A identificação do Threshold determina o estabelecimento do cycle threshold (Ct), ciclo em que cada curva de amplificação atravessa o limiar, servindo como base para comparação entre amostras. Após o estabelecimento do Ct de cada amostra, os dados foram exportados em tabelas compatíveis com o software Excel, contendo valores médios dos Cts de cada amostra e respectivos desvios padrão.

A normalização dos resultados de cada amostra foi realizada pela subtração do Ct para o gene (alvo) pelo Ct de um controle endógeno (*GUSB*). A calibração foi realizada com a mediana de ΔCt das amostras dos controles (adrenais normais) e os resultados obtidos por meio do cálculo de $\Delta\Delta Ct$, respectivamente. A expressão do gene de interesse nas amostras foi dada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. A mediana do valor obtido de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de tecido tumoral de adrenal foi comparada com o valor da mediana dos valores obtidos de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ das amostras de tecido adrenal normal, obtendo o valor que revela o número de vezes (fold) que este gene está hiper ou hipoexpresso no tecido tumoral em comparação ao tecido normal (233).

Tabela 4. Sondas Taqman® utilizadas nos ensaios de qPCR.

Genes	Sondas Taqman®
<i>NR5A1</i> (SF1)	Hs00610436m1
<i>NR0B1</i> (DAX1)	Hs00230864m1
<i>NANOG</i>	Hs04260366g1
<i>STAT3</i>	Hs00374280m1
<i>SOX2</i>	Hs01053049s1
<i>POU5F1</i> (OCT4)	Hs01654807s1
<i>GUSB</i>	4326320E

3.6. Análise da Expressão Proteica por Imunoistoquímica (IHQ)

3.6.1. Padronização das reações de IHQ

Para padronização do método de IHQ, blocos de parafina contendo os fragmentos de tecidos controle positivos para os anticorpos foram cortados em micrótomo manual com espessura de 5 μm , utilizando lâminas pré-tratadas com polilisina. Tecidos com alta

expressão de cada uma das proteínas estudadas foram selecionados como controles positivos, levando em conta os dados informados pela empresa fabricante ou de acordo com a expressão catalogada no *Human Protein Atlas* (www.proteinatlas.org). Os anticorpos e tecidos utilizados para padronização foram estão expostos na **Tabela 5**.

As lâminas foram desparafinadas em estufa durante uma noite, diafanizadas em dois banhos com xilol e re-hidratadas em concentrações decrescentes de álcool. A recuperação antigênica foi realizada pelo calor imergindo as lâminas no tampão *Diva Decloaker, 10X*® (Biomedical Care, CA, Estados Unidos) em panela a vapor a 90°C por 40 minutos, com subsequente resfriamento em banho com água destilada.

Nas etapas seguintes foi utilizado o kit *REVEAL Polyvalent HRP-DAB Detection System*® (Spring Bioscience Corp., CA, Estados Unidos). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio (*Hydrogen Peroxide Block*) por 15 minutos. Após, foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas (*Protein block*) por 10 minutos. O anticorpo primário foi adicionado em diluições sucessivas de 1:25 a 1:300 e incubado durante uma noite sob temperatura de -4°C. Em seguida, o *Complement (Rabbit anti-mouse secondary antibody)* foi aplicado às secções em temperatura ambiente por 10 minutos. Depois, o *HRP Conjugate* foi aplicado por 15 minutos. O substrato 3,3-diaminobenzidina foi aplicado às secções por 5 minutos. As lâminas foram rapidamente contracoradas com Hematoxilina por 15 segundos, e, após banho com água amoniacal por 10 segundos. A seguir, passaram pelo processo de re-hidratação e diafanização em bateria de concentrações crescentes de álcool e xilol, respectivamente e após foram montadas com lamínula e *permout* para serem avaliadas em microscópio de luz.

Analisando as lâminas de controles positivos em diferentes diluições, foram determinadas as diluições adequadas para cada anticorpo (**Tabela 5**). As fotos dos controles positivos de cada anticorpo nas diluições estabelecidas estão agrupadas na **Figura 7**.

Tabela 5. Lista de anticorpos usados nos experimentos de IHQ, os respectivos tecidos utilizados como controles positivos e diluições utilizadas.

Anticorpos (Fabricante)	Controle-Positivo	Diluição
Anti human SF-1 mouse monoclonal antibody PP-N1665-00 (Perseus Proteomics ®)	Testículo	1:25
Anti-NR0B1/DAX1 antibody ab60144 (Abcam ®)	Pulmão	1:25
Anti-STAT3 (phospho Y705) antibody [EP2147Y] ab76315 (Abcam ®)	Cólon	1:25
Anti-SOX-2 (Y-17) sc-17320 (Santa Cruz Biotechnology ®)	Cólon	1:25
Anti-NANOG antibody - ChIP Grade ab21624 (Abcam ®)	Testículo	1:25
Anti-OCT-3/4 (C-10) sc-5279 (Santa Cruz Biotechnology ®)	Testículo	1:50

Figura 7. Fotos de IHQ dos controles positivos usados na padronização dos anticorpos. Tecido testicular marcado com anticorpo anti-SF1 (A), anti-OCT4 (C) e anti-NANOG (D). Tecido pulmonar marcado com anticorpo anti-DAX1 (B). Câncer de cólon marcado com anticorpo anti-SOX2 (E) e anti-STAT3 (F). Magnificação x400 nas fotos A, C, D, E e F. Magnificação x50 na foto B.

3.6.2. *IHQ de Tumores Adrenocorticais*

Cortes histológicos representativos dos casos, corados pela Hematoxilina e Eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadoras das amostras. Com dispositivos de base fixa, cilindros de 2,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco receptor (**Figura 8**). Cada cilindro foi alocado no bloco receptor, constituindo uma matriz tecidual de 4 linhas e 6 colunas, totalizando 24 cilindros por bloco. No primeiro campo de cada bloco receptor, foi inserido tecido extraído de fígado de rato, para servir de referência e controle negativo. Foi feito o corte no micrótomo (4 μ m) do bloco receptor e transferido para a lâmina silanizada.

Após as lâminas serem desparafinadas e sofrerem a recuperação antigênica, como descrito no sub item 3.4.1. (*Padronização da IHQ*), os campos foram delimitados com caneta hidrofóbica (PAP pen - ab2601, Abcam, CBE, Reino Unido) e, a seguir, os demais passos da marcação das lâminas como descrito acima.

Figura 8. Metodologia de confecção de blocos para *Tissue array*. (A) Materiais utilizados na montagem e extração de tecido do bloco doador e aplicação no bloco receptor. (B) Lâmina pronta após coloração.

3.6.2.1. *Escore H*

Para análise semi-quantitativa, a marcação nuclear das amostras tumorais foi avaliada através do escore H (234). Para esta classificação, uma pontuação foi atribuída à intensidade de marcação nuclear numa escala de 0 (ausente) a 3 (forte). Além disso, a percentagem de células tumorais positivas foi avaliada em cada amostra de tumor e foi pontuada como se segue: Ausente= grau 0; 1 a 9%= grau 0,1; 10-49%= grau 0,5; $\geq 50\%$ = grau 1,0. Em seguida, esta pontuação (0; 0,1; 0,5 ou 1) foi multiplicada pela pontuação da intensidade (0, 1, 2 ou 3), a fim de se obter a pontuação semiquantitativa final (escore H),

que variou de 0 a 3. A expressão proteica foi classificada como positiva quando escore $H > 1$ e negativa quando escore $H \leq 1$ (234).

3.6.3. IHQ de Córtices Adrenais Normais Fetais e Pós-natais

A morfologia do córtex adrenal fetal foi avaliada com coloração de hematoxilina-eosina na rotina do departamento de Patologia da FMRP-USP. Após esta etapa, as lâminas de adrenais fetais passaram por processo de coloração da mesma forma que foi descrito para os TAC, com os mesmos anticorpos primários citados (**Tabela 5**). Para efeito de comparação, as amostras foram subcategorizadas em grupos por idade gestacional (20-25 semanas ($n = 14$), 26-31 semanas ($n = 8$), 32-37 semanas ($n = 8$) e pós-natal ($n = 14$). Todas as lâminas foram checadas e reavaliadas por uma patologista experiente, a Prof. Dra. Leandra Naira Z. Ramalho, com a participação do pós-graduando responsável por essa Tese (M.M.C.). Nenhuma análise estatística foi utilizada neste estudo, sendo apresentada apenas a análise descritiva.

3.7. Análise *in vitro* da expressão de NANOG

3.7.1. Linhagem celular adrenocortical NCI-H295

A NCI-H295 é uma linhagem celular que foi imortalizada a partir do cultivo tumoral de um CAC funcional de secreção mista de hormônios androgênicos e cortisol em uma paciente adulta (48 anos) (235). Esta linhagem mantém as características do tumor original, sendo capaz de produzir a maioria dos esteroides característicos da glândula adrenal (236). Importante ressaltar também que estas células carregam a mutação missense c.133T>C do gene *CTNNB1* (Beta-catenina p.S45P), que proporciona ativação da via de sinalização Wnt/Beta-catenina (188).

A linhagem celular NCI-H295 foi gentilmente cedida pela professora Claudimara Lotfi (ICB-USP) e padronizada em nosso laboratório em trabalho prévio (190). O cultivo celular foi feito em meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute; Gibco - Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos), 2% de Soro Bovino Fetal (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), 1% de ITS: insulina, transferrina e selenito de sódio (Corning, NY, Estados Unidos) e 1% de antibióticos: penicilina e estreptomicina (Gibco - Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). As células foram mantidas à temperatura de 37°C e a uma concentração de gás carbônico de 5%.

Esta linhagem teve a sua autenticidade comprovada por meio de estudo de *short tandem repeat*, realizado em colaboração com o Laboratório de Genética Bioquímica

(Departamento de Genética, FMRP-USP), sob coordenação do Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões. A referência utilizada na comparação de microssatélites foi obtida pelo site <https://www.atcc.org/Products/All/CRL-2128.aspx#specifications>.

3.7.2. Verificação da expressão proteica basal de NANOG na NCI-H295 por meio de imunocitoquímica

As células foram cultivadas sobre lâminulas em placas de 24 poços para a realização de imunofluorescência (IF). Após 24 horas de incubação, o meio de cultura RPMI 1640 foi removido e as células foram fixadas com metanol (Merck Millipore Corporation, DA, Alemanha) por três minutos, seguido por lavagem com PBS 0,01M (3x) e incubação durante uma hora com soro normal de cavalo a 10% (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos). As lâminulas foram então incubadas com o anticorpo primário anti-NANOG (ab21624 - Abcam® - 1:100; confere cor verde) durante uma noite, lavadas com PBS 0,01M (3x) e a seguir incubadas com 4', 6-diamidino-2-phenylidone (DAPI; nº 4083 Cell Signaling Technology, Danvers, MA - 1:25.000; confere cor azul) durante dois minutos para marcação nuclear. Foram então lavadas com PBS 0,01M (3x) e montadas em lâminas com Fluoromount (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos). A marcação foi avaliada em microscópio confocal TCS SP5 laser (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) com tempo de exposição fixo.

3.7.3. Análise da expressão do RNAm do NANOG após tratamento com PNU-74654

O composto PNU-74654 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, EUA) age como antagonista da via Wnt/ beta-catenina, impedindo a ligação desta ao Tcf (190). Para armazenamento, o composto foi ressuspensão em DMSO para uma concentração de 100 mM. Para o tratamento das células H295 o composto foi rediluído em meio de cultivo com concentrações de 50 e 100 µM.

Foram semeadas 200 mil células por poço em placas de 24 poços, as células foram mantidas por 48 horas em incubadora a 37°C e 5% de CO₂. O meio de cultivo foi repostado e as células foram tratadas com 50 e 100 µM de PNU por 48 horas. Nos poços controles, as células foram tratadas com 0,1 e 0,05 % de DMSO.

Após 48 horas da adição do tratamento, *TRIzol Reagent* (Thermo Fisher Scientific, MA, Estados Unidos) foi adicionado à cultura de células para posterior extração de RNA total na proporção de 1,0 mL/1x10⁷ células. A extração do RNAm e a análise da expressão

do RNAm de *NANOG* foi realizada conforme descrito no item 3.5.4 a 3.5.7. Foram realizados dois experimentos independentes da mesma forma.

3.8. Análise Estatística

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar a expressão gênica diferencial entre TAC e adrenais normais.

O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para a comparação da expressão gênica entre controles e os tumores de diferentes estágios tumores.

Para as análises de correlação foi utilizado o teste de correlação de Spearman.

A associação entre a expressão gênica com o prognóstico foi feita por meio do teste de Log-rank e curva de Kaplan-Meier. Para as análises de Kaplan-Meier e expressão gênica, a expressão do gene de interesse nos TAC foi categorizada como reduzida (hipoexpresso) se abaixo da mediana de $2^{\Delta\Delta Ct}$ das amostras dos controles ou aumentada (hiperexpresso) se acima da mediana de $2^{\Delta\Delta Ct}$ das amostras dos controles, respectivamente.

Para a análise da distribuição de probabilidade das frequências entre resultados de expressão foi utilizado o teste exato de Fisher.

Para análises de associação entre a expressão proteica (semiquantitativa) e algum desfecho clínico foi utilizada a Razão de Prevalências (RP).

O limite de significância para todos os testes foi de 95% ($p < 0,05$). No caso da RP, foi utilizado intervalo de confiança (IC) de 95%. Foram utilizados os softwares GraphPad Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, CA) e SAS 9.3 (SAS Institute Inc., *SAS/STAT® User's Guide, Version 9.3*, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2011).

4. RESULTADOS

4.1. SF1, DAX1, NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 no desenvolvimento do córtex adrenal

Durante o desenvolvimento do córtex adrenal, tanto os receptores nucleares SF1 e DAX1, quanto os marcadores de células-tronco NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 estavam expressos em amostras teciduais obtidas entre as idades gestacionais de 20 e 25 semanas. Neste período, houve marcação fraca de NANOG (**Figura 10A**) e STAT3 (**Figura 9C**) a qual era mais concentrada na região subcapsular; detectou-se marcação moderada de DAX1 (**Figura 9B**) e OCT4 (**Figura 10B**) também nesta mesma localização e marcação forte de SF1 (**Figura 9A**) na mesma delimitação. A marcação de SOX2 foi forte mas de maneira mais difusa (**Figura 10C**).

No intervalo a seguir, entre 26 e 30 semanas, houve manutenção do padrão de expressão de SF1, STAT3, OCT4 e SOX2 (**Figuras 9D, 9F, 10E e 10F**). Entretanto já não se observaram mais as marcações de DAX1 e NANOG (**Figuras 9E e 10D**). Em amostras de adrenais de 31 ou mais semanas de gestação e no período pós-natal, apenas a marcação de SF1 (**Figuras 9G e 9J**) se manteve forte no córtex adrenal, porém de forma mais difusa (**Figuras 9H, 9I, 9K, 9L, 10G-L**).

Figura 9. Fotos de IHQ de córtices adrenais em diferentes estágios. Entre 20 e 25 semanas, os córtices adrenais fetais apresentaram marcações de SF1 (A), DAX1 (B) e STAT3 (C), respectivamente. Entre 26 e 30 semanas, os córtices adrenais fetais apresentaram marcações de SF1 (D) e STAT3 (F), porém ausência de marcação de DAX1 (E). Entre 31 e 37 semanas e no período pós-natal, os córtices adrenais apresentaram marcação apenas de SF1 (G e J), porém ausência de marcação de DAX1 (H e K) e STAT3 (I e L). Magnificação 10x.

Figura 10. Fotos de IHQ de córtices adrenais em diferentes estágios. Entre 20 e 25 semanas, os córtices adrenais fetais apresentaram marcações de NANOG (A), OCT4 (B) e SOX2 (C), respectivamente. Entre 26 e 30 semanas, os córtices adrenais fetais apresentaram marcações de OCT4 (E) e SOX2 (F), porém ausência de marcação de NANOG (D). Entre 31 e 37 semanas e no período pós-natal, os córtices adrenais não apresentaram marcação de NANOG (G e J), OCT4 (H e K) e SOX2 (I e L). Magnificação 10x.

4.2. Características Clínicas

4.2.1. *Pacientes pediátricos*

Nossa casuística total de pacientes pediátricos foi de 96 crianças com TAC. A mediana de idade ao diagnóstico destes pacientes foi de 1,6 anos (0,4 - 15,6 anos). Sendo que a grande maioria, 76 (79%) pacientes foram diagnosticados nos primeiros cinco anos de vida. Destes, em 19 (20%) o diagnóstico ocorreu antes de um ano de vida. A ampla maioria dos pacientes era do sexo feminino, 78 (81%) meninas. Um resumo das características e evolução dos TAC pediátricos é apresentado na **Tabela 6**. O detalhamento de cada caso individualmente está apresentado no **Anexo 5**. Parte destes dados clínicos foram relatados previamente (30, 237).

Sinais e sintomas de virilização causados pela secreção excessiva de andrôgenios, foram os achados clínicos mais comuns neste grupo. Estavam presentes em 92 (96%) pacientes, incluindo 51 pacientes com TAC secretores apenas de androgênios e 41 pacientes com TAC mistos, secretando tanto androgênios quanto cortisol. Apenas quatro pacientes apresentaram TAC não-secretores, que foram descobertos incidentalmente.

Na maioria dos pacientes, precisamente em 82 (85%) deles, foi detectada a mutação germinativa c.1010G>A (P53 p.R337H) no gene *TP53*. Mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* foram investigadas em 70 pacientes, dos quais 10 (14%) apresentaram mutações na região de fosforilação da proteína (**Anexo 5**).

Tabela 6. Resumo dos dados clínicos dos 96 pacientes pediátricos com Tumor Adrenocortical (TAC) avaliados nesse estudo.

Dados Clínicos de TAC Pediátricos					
Gênero	Masculino			18	19%
	Feminino			78	81%
Óbitos	Vivos			74	77%
	Mortos			15	16%
	Desconhecido*			7	7%
Idade ao Diagnóstico (anos)	Mediana			1,6	
	Média			3,3	
	Mínima; Máxima			0,4; 15,6	
Escore de Weiss	0			2	2,1%
	1			3	3,1%
	2			1	1,0%
	3			4	4,2%
	4			15	15,6%
	5			10	10,4%
	6			25	26,0%
	7			15	15,6%
	8			11	11,5%
	9			8	8,3%
	Desconhecido			2	2,1%
		Mortes	>5 anos sobrevida		
Estadiamento Tumoral (Sandrini)	Estágio I	4 (6,7%)	35 (58,3%)	60	62,5%
	Estágio II	3 (21,4%)	9 (64,3%)	14	14,6%
	Estágio III	1 (7,7%)	5 (38,5%)	13	13,5%
	Estágio IV	7 (77,8%)	2 (22,2%)	9	9,4%
Recidiva e/ou Metástase	Sim			18	18,8%
	Não			52	54,2%
	Desconhecido			26	27,1%
Quimioterapia	Sim			19	19,8%
	Não			48	50,0%
	Desconhecido			29	30,2%
Tratamento cirúrgico	Sim			100	100%
	Não			0	0,0%
		Feminino	Masculino		
Secreção Hormonal	Virilizante	43	8	51	53,1%
	Cushing	0	0	0	0,0%
	Misto (Virilizante + Cushing)**	32	9	41	42,7%
	Não funcionante	3	1	4	4,2%

* Perda de seguimento; ** Cushing clínico ou subclínico

4.2.2. *Pacientes adultos*

Foram avaliadas amostras de TAC de 18 pacientes adultos, com idade mediana ao diagnóstico de 42,5 anos (21-66 anos), sendo que a maioria, 10 (55%) dos pacientes tinha idades acima dos 40 anos. Apenas dois pacientes eram do sexo masculino, logo a ampla maioria da amostra, 16 (89%) era pacientes do sexo feminino.

Quanto às manifestações clínicas, a apresentação mais frequente nos TAC adultos foi de síndrome de Cushing que ocorreu em 14 (77%) pacientes, sendo 7 destes, tumores mistos (hipercortisolismo e hiperandrogenismo associados). Apenas dois pacientes apresentaram TAC com secreção pura de androgênios. E apenas dois pacientes possuíam TAC não secretores que foram descobertos incidentalmente.

Os TAC adultos foram classificados em adenomas (AAC) e carcinomas (CAC) de acordo com o escore de Weiss, sendo oito (44%) CAC e 10 AAC (56%).

Diferentemente do observado nos TAC pediátricos, apenas quatro (22%) pacientes adultos com TAC apresentaram a mutação germinativa c.1010G>A no gene *TP53*. Mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* foram detectadas em sete (39%) dos TAC adultos.

Um resumo das características e evolução dos TAC adultos é apresentado na **Tabela 7**. O detalhamento de cada caso individualmente está apresentado no **Anexo 6**. Parte destes dados clínicos foram relatados previamente (237, 238).

Tabela 7. Resumo dos dados clínicos dos 18 pacientes adultos com Tumor Adrenocortical (TAC).

Dados Clínicos de TAC Adultos					
Gênero	Masculino		2	11%	
	Feminino		16	89%	
Óbitos	Vivos		14	78%	
	Mortos		3	16%	
	Desconhecido*		1	6%	
Idade ao Diagnóstico (anos)	Mediana		42,5		
	Média		42,6		
	Mínima; Máxima		21; 66		
Escore de Weiss	0		1	5,5%	
	1		7	38,9%	
	2		2	11,1%	
	3		2	11,1%	
	4		3	16,7%	
	5		0	0%	
	6		3	16,7%	
		Mortes	>5 anos sobrevida		
Estadiamento Tumoral (Macfarlane)	Estágio I	0	3 (42,8%)	7	38,9%
	Estágio II	1 (16,7%)	4 (66,7%)	6	33,3%
	Estágio III	0	0	1	5,6%
	Estágio IV	2 (50%)	1 (25%)	4	22,2%
Recidiva e/ou Metástase	Sim			5	27,8%
	Não			13	72,2%
Quimioterapia	Sim			6	33,3%
	Não			12	66,7%
Tratamento cirúrgico	Sim			18	100%
	Não			0	0,0%
		Feminino	Masculino		
Secreção Hormonal	Virilizante	2	0	2	11,1%
	Cushing	7	0	7	38,9%
	Misto (Virilizante + Cushing)	5	2	7	38,9%
	Não funcionante	2	0	2	11,1%

* Perda de seguimento

4.3. Expressão Proteica

4.3.1. TAC Pediátricos

A expressão proteica de SF1, DAX1, NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 foi avaliada por IHQ em um subgrupo de TAC pediátricos (n=30) em função da disponibilidade de material biológico. Essas amostras estão destacadas com as letras ^{IHC} no **Anexo 5**. Adicionalmente, apresentamos uma tabela comparativa com os dados desse subgrupo em

relação ao grupo total, visando confirmar sua representatividade, isto é, que esse grupo avaliado apresenta as mesmas características gerais do total de amostras avaliadas em outros experimentos (**Anexo 5.1**). Durante a transferência do corte histológico para a lâmina silanizada algumas amostras foram perdidas. Portanto, em algumas análises números diferentes de amostras foram analisados. Para efeito de fidedignidade, em cada análise o número exato de amostras empregado será especificado.

Após uma primeira análise dos dados deste grupo, observamos o aumento de expressão de OCT4 associado a casos de recidiva e/ou metástase, sendo então optado por aumentar o espaço amostral. Nas análises de OCT4, foram acrescentadas 25 amostras tumorais pediátricas provenientes do Centro Infantil Boldrini. Essas amostras estão destacadas com as letras *IHC* no **Anexo 5**.

Em 18 de 27 (67%) amostras de TAC pediátrico, marcação nuclear positiva de SF1 foi detectada (**Figura 11A e 11B**). Marcação nuclear positiva de DAX1 foi detectada em 14 de 29 (48%) amostras de TAC pediátrico (**Figura 11C e 11D**). Além da marcação nuclear, em sete destas 29 (24%) houve marcação citoplasmática de DAX1. Em 18 de 55 (32%) amostras de TAC pediátrico, marcação nuclear positiva de OCT4 (**Figura 11G e 11H**). Apenas três de 27 (11%) amostras de TAC pediátrico apresentaram marcação nuclear positiva de NANOG (**Figura 11E e 11F**). Em nenhuma das amostras de TAC pediátrico observou-se marcação positiva para SOX2 e STAT3 (**Figura 12 B-E**).

Não houve diferença na expressão das proteínas SF1, DAX1, OCT4, NANOG, SOX2 e STAT3 entre amostras de TAC pediátricos em estágio I-II comparadas àquelas em estágio III-IV de Sandrini. Também não houve associação entre esses dados de IHC com mau prognóstico e nem com algum padrão de secreção hormonal específico. Entretanto, no grupo de TAC pediátricos com metástase ou recidiva observou-se maior prevalência de marcação nuclear positiva de OCT4 (razão de prevalência = 2,28; intervalo de confiança de 95%; 1,13 - 4,59) do que o grupo sem metástase ou recidiva (Teste exato de Fisher: P= 0,04 - **Figura 12A**).

Figura 11. Resultados de IHQ em TAC. (A) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear positiva para SF1. (B) Gráfico demonstrando maior percentual de positividade de SF1 nos TAC pediátricos que nos TAC adultos (* $P < 0,05$). (C) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear positiva para DAX1. (D) Gráfico demonstrando maior percentual de positividade de DAX1 nos TAC pediátricos que nos TAC adultos (* $P < 0,05$). (E) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear positiva para NANOG. (F) Gráfico demonstrando que positividade de NANOG não foi frequente nos TAC pediátricos e adultos. (G) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear positiva para OCT4. (H) Gráfico demonstrando positividade de OCT4 em 33% TAC pediátricos e rara nos adultos (7%).

Figura 12. Resultados de IHQ em TAC. (A) Gráfico demonstrando maior percentual de positividade de OCT4 nos TAC pediátricos metastáticos ou recidivantes que nos TAC pediátricos sem metástase ou recidiva (* $P < 0,05$). (B) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear fraca para SOX2. (C) Gráfico demonstrando que não houve positividade de SOX2 nos TAC pediátricos e adultos. (D) Foto de lâmina de TAC com marcação nuclear fraca para STAT3. (E) Gráfico demonstrando que não houve positividade de STAT3 nos TAC pediátricos e adultos.

4.3.2. TAC Adultos

Da mesma forma que nas amostras pediátricas, a expressão proteica de SF1, DAX1, NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3 foi avaliada em um subgrupo de 16 TAC adultos, sendo 11 adenomas e 5 carcinomas. Porém, no momento da transferência dos cortes histológicos para a lâmina silanizada algumas amostras foram perdidas.

Marcação nuclear positiva de SF1 foi observada em três de 16 (19%) amostras de TAC adultos, sendo as três de adenomas. A marcação nuclear positiva de SF1 foi mais frequente entre TAC pediátricos do que entre os TAC adultos (Teste exato de Fisher; $P=0,004$ - **Figura 11B**).

Nenhuma das amostras de TAC adultos apresentou marcação nuclear positiva de DAX1. Nesses, apenas marcação fraca (escore $H \leq 1$) foi observada em 11 destas amostras. Desta forma, a marcação nuclear positiva de DAX1 também foi mais frequente entre os TAC pediátricos do que entre os TAC adultos (Teste exato de Fisher; $P=0,001$ - **Figura 11D**).

Assim como nas amostras de TAC pediátrico, nenhuma das amostras de TAC adulto apresentou marcação nuclear positiva de SOX2 e STAT3 (**Figura 12B-E**). Apenas uma entre 14 (7%) amostras de TAC adulto apresentou marcação nuclear positiva de NANOG (**Figura 11F**). Da mesma forma, apenas uma entre 15 amostras (7%) de TAC adulto apresentou marcação nuclear positiva de OCT4 (**Figura 11H**). Salienta-se que essa amostra não foi a amostra positiva para NANOG.

As expressões das proteínas SF1, DAX1, OCT4, NANOG, SOX2 e STAT3 das amostras de TAC adulto, não foram diferentes entre tumores nos estadiamentos I-II e III-IV de Macfarlane. Não houve também associação com mau prognóstico e nem com algum padrão de secreção hormonal específico.

4.4. Expressão de RNAm

4.4.1. Córtices adrenais normais (controles)

Para normalização nas comparações de expressão gênica por método de qPCR entre amostras pediátricas e adultas, análises prévias de comparação entre a expressão gênica de córtices adrenais normais obtidas de adultos (n=14) e crianças (n=12) foram realizadas. Nestas avaliações prévias não foram observadas diferença de expressão de RNAm de *NR0B1* (pediátrico vs. adulto: 1,01 [0,58 - 5,01] vs. 0,90 [0,01 - 3,90]; P= 0,10; **Figura 13A**), *NR5A1* (pediátrico vs. adulto: 1,00 [0,02 - 1,75] vs. 0,85 [0,03 - 1,64]; P= 0,92; **Figura 13B**) e *STAT3* (pediátrico vs. adulto: 1,00 [0,12 - 1,95] vs. 1,21 [0,05 - 5,67]; P=0,60; **Figura 13C**). A partir destes resultados, optou-se por agrupar as amostras normais adultas e pediátricas como controles em todas as análises a seguir. A expressão de RNAm do gene *POU5F1* (OCT4) foi muito baixa ou indetectáveis nos controles normais. A reação utilizada como controle positivo foi feita em RNAm obtido de placenta e cordão umbilical humanos, obtendo-se amplificação entre os ciclos 30 e 35 da qPCR.

Figura 13. Gráficos representativos da expressão do RNAm dos genes *NR0B1* (A), *NR5A1* (B) e *STAT3* (C) em amostras de córtices adrenais normais de crianças (n=14) e adultos (n=12). A análise não revelou diferença no padrão de expressão desses genes entre os córtices adrenais normais de adultos e de crianças.

4.4.2. TAC Pediátricos

A expressão gênica por método de qPCR de *NR5A1*, *NR0B1* e *STAT3* foi analisada em 70 amostras de TAC pediátrico. Para as análises de expressão de *POU5F1* (OCT4), *NANOG* e *SOX2*, houve a necessidade de tratamento das amostras com DNase I, pois estas sondas se localizavam em regiões exônicas com possibilidade de amplificação de DNA genômico. Como não dispunhamos do RNA das 30 amostras cedidas pelo Centro Infantil Boldrini, estas amostras foram excluídas das análises de *POU5F1*, *NANOG* e *SOX2*. Ademais, após as reações de digestão com DNase I, tivemos degradação de várias de nossas amostras de RNA, nos restando um espaço amostral de 18 TAC pediátricos para as análises de *POU5F1*, *NANOG* e *SOX2*.

Os TAC pediátricos apresentaram níveis de expressão do RNAm de *NR5A1* duas vezes menor do que os dos controles ($P = 0,001$ - **Figura 14A**). Os níveis de expressão do RNAm de *NR0B1*, *NANOG* e *STAT3* não diferiram entre os TAC pediátricos e os controles ($P = 0,65$ [**Figura 14B**], $P = 0,48$ [**Figura 14C**] e $P = 0,31$ [**Figura 14D**], respectivamente). Os TAC pediátricos apresentaram expressão do RNAm de *SOX2* menor do que a dos controles ($P = 0,0004$ - **Figura 14E**). A expressão do RNAm de *POU5F1* não pôde ser analisada pois o limiar de ciclos (CT) encontrado de quase todas as amostras foi indeterminado, sugerindo expressão muito baixa ou mesmo ausente nessas amostras.

Os TAC secretores de androgênios (virilizantes e mistos) apresentaram níveis de expressão de RNAm de *NR5A1* e *NR0B1* (DAX1) mais elevados do que os de TAC não secretores de androgênios ($P = 0,002$ e $P = 0,01$, respectivamente), como mostrado nas **Figuras 14F e 14G**. Houve também uma correlação positiva entre os níveis de expressão de RNAm de *NR5A1* e de *NR0B1* (correlação de Spearman: $r = 0,63$; $P = 0,01$ - **Figura 14H**). Saliente-se que o grupo de TAC não-secretores de androgênio tem número muito baixo de amostras.

Figura 14. Gráficos de expressão gênica em TAC pediátricos. (A) TAC pediátricos apresentaram menor expressão de *NR5A1* em relação aos controles. (B) TAC pediátricos não apresentaram diferença de expressão de *NR0B1* em relação aos controles. (C) TAC pediátricos não apresentaram diferença de expressão de *NANOG* em relação aos controles. (D) TAC pediátricos não apresentaram diferença de expressão de *STAT3* em relação aos controles. (E) TAC pediátricos apresentaram expressão menor de *SOX2* em relação aos controles. (F) TAC pediátricos secretores de androgênios apresentaram maior expressão de *NR5A1* e (G) *NR0B1* do que os demais. (H) Houve correlação positiva entre a expressão *NR5A1* e *NR0B1* nos TAC pediátricos.

4.4.3. TAC Adultos

A expressão gênica por método de qPCR de *NR5A1*, *NR0B1*, *NANOG*, *POU5F1*, *SOX2* e *STAT3* foi analisada em 18 amostras de TAC de pacientes adultos.

Os TAC adultos apresentaram níveis de expressão de RNAm de *NR0B1* sete vezes mais altos do que os dos controles ($P < 0,0001$ - **Figura 15A**). Os níveis de expressão de RNAm de *NR5A1*, *NANOG* e *STAT3* não diferiram entre os TAC adultos e os controles ($P = 0,48$ [**Figura 15B**], $P = 0,85$ [**Figura 15C**] e $P = 0,15$ [**Figura 15D**], respectivamente). Os TAC adultos apresentaram expressão de RNAm de *SOX2* mais baixa do que a dos controles ($P = 0,005$ - **Figura 15E**). A expressão de RNAm de *POU5F1* não pôde ser analisada pois o limiar de ciclos (CT) encontrado de quase todas as amostras foi indeterminado.

Dentre os TAC adultos, os AAC apresentaram maior expressão de RNAm de *STAT3* do que os CAC ($P = 0,006$ - **Figura 15F**). Apesar de nem AAC nem CAC apresentarem diferença de expressão em relação aos controles ($P = 0,13$ e $P = 0,77$; respectivamente). Além disso, a expressão de RNAm de *STAT3* não se associou com diferença na sobrevida destes pacientes (Teste de Log-rank: $P = 0,87$). Houve também correlação positiva entre a expressão proteica de SF1 com a expressão de RNAm de *STAT3* (Correlação de Spearman: $r = 0,70$; $P = 0,006$ - **Figura 15G**).

Diferentemente dos TAC pediátricos, não foi observada correlação positiva entre os RNAm de *NR0B1* e *NR5A1* (Correlação de Spearman: $r = 0,09$; $P = 0,70$).

Os níveis de expressão de *NANOG* foram maiores entre os pacientes carreadores da mutação p.S45P Beta-catenina (c.133T>C no gene *CTNNB1*) ($P = 0,005$), tanto nos TAC adultos quanto nos TAC pediátricos (**Figura 14H**). Neste estudo, nas análises de TAC pediátricos e adultos, não foram observadas diferença nas expressões de RNAm em associação com a mutação P53 p.R337H (c.1010G>A no gene *TP53*), estádios tumorais ou com sobrevida.

Figura 15. Gráficos de expressão gênica em TAC adultos. (A) TAC adultos apresentaram maior expressão de *NR0B1* em relação aos controles. (B) TAC adultos não apresentaram diferença de expressão de *NR5A1* em relação aos controles. (C) TAC adultos não apresentaram diferença de expressão de *NANOG* em relação aos controles. (D) TAC adultos não apresentaram diferença de expressão de *STAT3* em relação aos controles. (E) TAC adultos apresentaram menor expressão de *SOX2* em relação aos controles. (F) AAC apresentaram maior expressão de *STAT3* que os CAC. (G) Houve correlação positiva entre a expressão proteica de SF1 e o RNAm de *STAT3* nos TAC adultos. (H) Os TAC carreadores da mutação (c.133T>C) *CTNNB1* (Beta-catenina p.S45P) apresentaram maior expressão de *NANOG* em relação aos TAC com *CTNNB1* normal ou com outras mutações.

4.5. Número de cópias dos genes *NR5A1* e *NR0B1*

Ganho de material genômico do gene *NR5A1* (**Figura 16**) foi observado mais frequentemente nos TAC pediátricos do que nos TAC adultos. Enquanto nos TAC pediátricos, 10 de 14 amostras analisadas (71%) apresentaram ganho de material genômico, apenas quatro de 12 amostras analisadas (33%) dos TAC adultos apresentaram esta alteração, como está demonstrado na **Figura 18**. Uma tabela comparativa entre o subgrupo de TAC analisados por MLPA (n=14 e 12, pediátricos e adultos, respectivamente) e o grupo geral é apresentada no **Anexo 5.2**.

Não houve associação entre a expressão de RNAm de *NR5A1* e o ganho de material genômico deste gene, tanto nos TAC pediátricos quanto nos TAC adultos ($P = 0,86$ e $P = 0,08$; respectivamente). Com relação à expressão proteica, apenas seis dos 10 TAC pediátricos e nenhum dos TAC adultos, com amplificação gênica de *NR5A1*, apresentaram marcação nuclear positiva para SF1.

Com relação à amplificação gênica de *NR0B1*, apenas um TAC adulto apresentou ganho de material genômico (**Figura 17A**). Deleção gênica foi observada em um TAC pediátrico e em um TAC adulto (**Figura 17C**). Além disso, três TAC pediátricos apresentaram deleção da região promotora de *NR0B1* (**Figura 17B**). Também não foi observado aumento ou redução da expressão de RNAm nos TAC com ganho ou deleção de material genômico (dados não apresentados). Como houve alteração do *NR0B1* em poucas amostras, não foi possível realizar análises estatísticas para comparar essas características.

Figura 16. Gráfico demonstrativo da análise de um TAC pediátrico masculino. Em destaque, círculo vermelho demonstrando aumento no número de cópias de *NR5A1*.

Figura 17. Gráficos demonstrativos de análises do MLPA. (A) Gráfico da análise de um TAC proveniente de paciente adulto masculino com aumento no número de cópias de *NR0B1* e perda de material gênomico do cromossomo Y. (B) Gráfico da análise de um TAC pediátrico masculino com redução no número de cópias de *NR0B1*. (C) Gráfico da análise de um TAC adulto feminino com redução no número de cópias de *NR0B1*.

Figura 18. Gráfico demonstrando o percentual de amostras com alterações (ganhos ou perdas de material genético) nos genes *NR5A1* e *NR0B1*.

4.6. Análise *in vitro* da expressão de NANOG

4.6.1. Padrão de expressão de NANOG na linhagem NCI-H295

Após observarmos aumento da expressão do RNAm de *NANOG* nos TAC carreadores da mutação somática p.S45P Beta-catenina, decidimos explorar em maior detalhes esse achado. Para tal, realizamos experimentos *in vitro* com a linhagem celular adrenal NCI-H295 que carriaa esta mesma mutação. Nesses experimentos, avaliamos a relação entre a via de sinalização Wnt/Beta-catenina e a expressão de NANOG.

Primeiramente, realizamos reação de imunofluorescência para verificar a expressão da proteína NANOG na linhagem NCI-H295. A presença do sinal (luz verde-clara) no núcleo de algumas células confirmou que esta proteína estava expressa nesta linhagem, como pode ser observado na **Figura 19**. Apenas algumas células expressam a proteína NANOG, desta forma, podemos inferir que estas células constituem um subgrupo de células com características específicas.

Figura 19. Imunofluorescência demonstrando a marcação nuclear (DAPI- em azul) e de NANOG (verde) em um pequeno número de células NCI-H295.

4.6.2. Efeito de inibição da sinalização da via Wnt sobre a expressão de NANOG

A expressão do RNAm de *NANOG* na linhagem NCI-H295 foi detectada sob condições basais. Após 48 horas do tratamento com o inibidor da via Wnt/Beta-catenina PNU-74654 nas concentrações de 50 e 100 μM , houve redução dos níveis de expressão de RNAm de *NANOG* (redução de 48% e 57%, respectivamente; ANOVA: $P = 0,01$; **Figura 20**). Para esta análise foram agrupados os resultados dos dois experimentos independentes realizados.

Figura 20. Gráfico demonstrando a redução de expressão de *NANOG* após a inibição da via Wnt/beta-catenina nas células NCI-H295 após 48 horas de tratamento com PNU-74654 a 50 e 100 μM . * $P < 0,05$.

5. DISCUSSÃO

SF1 e DAX1 são fatores de transcrição importantes na embriogênese e função do córtex adrenal. A participação de SF1 (127, 206, 208) e, mais recentemente, de DAX1 (239) na tumorigênese adrenocortical vêm sendo destacadas especialmente nos TAC pediátricos. No presente estudo, nós avaliamos não somente a contribuição de SF1 e DAX1 na tumorigênese adrenocortical como também no desenvolvimento normal do córtex adrenal. Analisamos também o padrão de expressão dos fatores de transcrição NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3, relacionados à manutenção do nicho de células tronco, ainda não havia sido estudado durante o desenvolvimento do córtex adrenal humano, bem como, na tumorigênese adrenocortical. Além disso, realizamos experimentos *in vitro* demonstrando que a via Wnt/beta-catenina regula a expressão de *NANOG* em TAC carreadores da mutação p.S45P Beta-catenina.

Por meio da avaliação por IHQ de adrenais fetais, pudemos observar que todos os fatores de transcrição estudados são expressos e parecem, portanto, atuar em determinado momento do desenvolvimento do córtex adrenal. O SF1 estava expresso desde o período fetal mais precocemente estudado (20-25 semanas) até a vida pós-natal. Destacando que o SF1 possui papel tanto na embriogênese do córtex adrenal, quanto na função glandular após o nascimento. A expressão da proteína DAX1, por outro lado, foi evidenciada apenas na fase entre 20 e 25 semanas gestacionais, não sendo detectada sua marcação nos demais períodos fetais, nem no período pós-natal. Estes dados precisam ser confirmados por outros estudos, já que existem evidências que associam o papel de DAX1 à manutenção do nicho de células-tronco no córtex adrenal adulto, além de sua expressão estar ligada à inibição de SF1, afim de promover equilíbrio no estímulo à esteroidogênese (151, 222). Portanto, é possível que existam algumas poucas células expressando DAX1 na região subcapsular da adrenal e que não tenham sido detectadas na presente análise.

A expressão das proteínas NANOG, OCT4 e STAT3 no período entre 20 e 25 semanas gestacionais, demonstra que nos humanos, diferentemente dos murinos, estas proteínas são expressas mesmo após o início da esteroidogênese adrenal, fato que ocorre por volta da sétima semana gestacional (151, 240). Nossos dados também nos levam a inferir que o nicho de células-tronco adulto não necessita da expressão constante de NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3, já que a expressão dessas proteínas não foi observada nos córtices adrenais no período pós-natal. Por outro lado, é possível que o nível de expressão seja bastante baixo e/ou ocorra em poucas células da região subcapsular que não são detectadas por meio de IHQ convencional.

Já é bem estabelecido que a maioria dos tecidos perenes possuem um nicho de células-tronco adultas que mantém o reabastecimento dos órgãos com células novas (241). No córtex adrenal, o nicho de células-tronco adultas fica localizado na região capsular e subcapsular (132). Em nosso estudo, o padrão de maior intensidade de expressão de OCT4, SOX2 e STAT3 foi na região subcapsular do córtex adrenal entre 20 e 31 semanas. Desta forma, podemos inferir que estes fatores de transcrição apesar de não estarem envolvidos na manutenção, possuem algum papel no estabelecimento inicial do nicho de células-tronco.

Nós observamos que a maioria dos TAC pediátricos avaliados apresentaram ganho de material genômico de *NR5A1* (gene codificador do SF1) e aumento da expressão proteica de SF1, apesar de uma baixa expressão de RNAm de *NR5A1*. Por outro lado, nos TAC adultos observamos menos alterações de ganho de material genômico de *NR5A1*, menor quantidade de pacientes com aumento de expressão proteica de SF1, além de não ter apresentado diferença de expressão do RNAm de *NR5A1* com relação aos controles. Nenhum dos dois grupos, TAC pediátricos e adultos, apresentou associação de qualquer dessas variáveis (ganho genômico, expressão de RNAm e proteica) com pior prognóstico.

Nossos dados de ganho de material genômico do *NR5A1*, nos TAC corroboram dados de estudos prévios que chegaram a resultados semelhantes. O estudo de Figueiredo e co-autores, avaliando com o método de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) nove TAC pediátricos demonstrou ganho de material gênico de *NR5A1* em oito de nove amostras estudadas (206). O mesmo grupo reforçou este dado em um estudo subsequente que detectou ganho de material genômico de *NR5A1* em oito de 10 TAC pediátricos (127). No estudo de Almeida e co-autores, foram avaliadas 17 TAC pediátricos e 21 TAC adultos, utilizando de forma concomitante os métodos de MLPA e qPCR. Este estudo verificou ganho de material genômico de *NR5A1* em 47% dos TAC pediátricos, em contraste com os apenas 10% dos TAC adultos (208).

A hiperexpressão proteica de SF1 também foi relatada por outros grupos com maior frequência nos TAC pediátricos que nos TAC adultos. No estudo de Pianovski e co-autores, foi utilizado o método de *immunoblot* que demonstrou aumento da expressão proteica de SF1 em todas as 10 amostras analisadas pelo estudo. Neste estudo, não houve associação entre o nível de expressão de SF1 com nenhuma variável clínica ou pior prognóstico (127). Almeida e co-autores realizaram IHQ em painéis de *tissue microarray*, os quais foram analisados de forma semiquantitativa pelo escore H,

e verificou-se aumento de expressão proteica em 56% (20 de 36 amostras) dos TAC pediátricos, contra apenas 19% (13 de 67 amostras) dos TAC adultos. Não foi relatado, neste estudo, dados sobre avaliação de prognóstico associado à marcação forte de SF1 (208).

Outros estudos também avaliaram a expressão proteica de SF1, porém em TAC adultos. Sbiera e co-autores, avaliaram a expressão proteica de SF1 em 167 CAC, 52 AAC e 10 carcinomas não adrenais. Neste estudo eles utilizaram o mesmo anticorpo monoclonal de SF1 que o utilizado em nosso estudo. A marcação nuclear forte de SF1 foi observada em 30% dos CAC e 60% dos AAC. Não houve marcação de SF1 em nenhum dos carcinomas não-adrenais. Entre os CAC, naqueles com marcação forte de SF1 houve maior mortalidade [*hazard ratio*: 2,46 (IC 95% = 1,57–3,87)]. Além de uma maior frequência de recorrência nos CAC com marcação forte do que no grupo de CAC com marcação fraca de SF1 [39 de 43 (90%) vs. 50 de 84 (57%)]. Entre os AAC, a marcação forte de SF1 não apresentou associação com pior prognóstico (207). Duregon e co-autores, estudaram 145 CAC, divididos em dois grupos de acordo com o anticorpo utilizado. No grupo de 73 CAC em que se utilizou o anticorpo monoclonal, 29% apresentaram forte marcação de SF1 que se correlacionou positivamente com alto índice mitótico, maior marcação de Ki-67 e estadiamento tumoral (ENSAT) avançado. Marcação forte de SF1 pelo anticorpo monoclonal também se associou com aumento no risco de morte relacionada à doença [*hazard ratio*: 3,92 (IC 95% = 1,561–9,860); $P = 0,0036$] e redução de sobrevida total (média de 27 vs. 82 meses nos casos com expressão alta e negativa/baixa, respectivamente). No grupo de 72 CAC em que utilizou-se o anticorpo policlonal para SF1, não houve associação da marcação forte de SF1 com pior prognóstico da doença (242). Em nosso estudo, apenas três TAC adultos apresentaram marcação forte de SF1 e os três eram AAC. Enquanto que os dois estudos prévios encontraram pior prognóstico associado à forte marcação SF1 apenas entre os CAC (207, 242). O estudo que avaliou AAC, também não encontrou associação entre marcação forte de SF1 destes e mau prognóstico (207).

Em nosso estudo, apenas 60% dos TAC pediátricos com ganho de material genômico de *NR5A1* apresentaram aumento da expressão proteica de SF1. De forma similar, Almeida e co-autores relataram forte marcação de SF1 em cinco dos oito (62%) TAC pediátricos com ganho de material genômico de *NR5A1* (208). O estudo de Pianovski e co-autores também relatou não haver correlação entre o número de cópias de *NR5A1* com a expressão proteica de SF1. Apesar de ter observado

hiperexpressão de SF1 nas oito amostras com ganho de material genômico de *NR5A1*, também observou hiperexpressão nos dois TAC sem esta alteração (127). Além disso, um estudo *in vitro*, utilizando células NCI-H295 transfectadas com plasmídeos contendo a sequência nativa do gene *NR5A1* demonstrou que o aumento de expressão da proteína SF1 não era proporcional ao número de cópias de *NR5A1*. Neste estudo, era possível controlar o número de cópias de *NR5A1* a serem inseridos. Desta forma, obtiveram linhagens com variação no número de cópias de *NR5A1* de uma a seis. Como conclusão, foi visto que o aumento da expressão de SF1 não se correlacionava ao número de cópias de *NR5A1* (243).

Curiosamente, nosso estudo demonstrou hipoexpressão de RNAm de *NR5A1* nos TAC pediátricos, apesar da expressão proteica de SF1 ter sido aumentada na maioria destes tumores. Esses dados foram re-examinados e confirmados. Uma hipótese para explicar tal achado, aparentemente paradoxal, de redução da expressão do RNAm mas aumento da expressão proteica de SF1, é que mecanismos de regulação pós-traducionais ou ainda mecanismos de retroalimentação negativa da expressão gênica possam estar envolvidos. Não existem dados publicados na literatura que confrontem a expressão de RNAm de *NR5A1* e de sua proteína, mas muitos mecanismos têm sido relatados demonstrando novos sistemas reguladores envolvidos na degradação do RNA (244, 245) e sua intrincada interação com proteínas e complexos ribonucleoproteicos, que medeiam a comunicação entre os passos pré e pós-traducionais, fornecendo informações tanto de retroalimentação quanto de *feedforward* (246).

As alterações de ganho ou perda de material genômico do gene *NR0B1* (gene codificador de DAX1) não foram frequentes nem nos TAC pediátricos nem nos adultos. Estas alterações pontuais também não demonstraram relação com as expressões de RNAm e/ou proteica. Quase metade dos TAC pediátricos apresentaram aumento da expressão proteica de DAX1, apesar de não ter apresentado diferença de expressão de RNAm de *NR0B1* com relação aos controles. Por outro lado, nos TAC adultos não foi observado marcação nuclear forte de DAX1, apesar de a expressão de RNAm de *NR0B1* ter sido sete vezes maior que nos controles.

Novamente, observamos dados discordantes entre expressão de RNAm e proteica do gene *NR0B1* tanto nos TAC pediátricos quanto nos TAC adultos. Também não existem dados na literatura que expliquem especificamente estas alterações em relação à expressão de *NR0B1*, mas no caso dos TAC pediátricos, inferimos que pode

tratar-se de mecanismos pós-traducionais que impliquem na ausência de degradação da proteína. Nos TAC adultos, a expressão de RNAm de *NR0B1* estava aumentada em relação aos controles, porém não houve expressão proteica aumentada de DAX1 neste grupo. Neste caso, inferimos que mecanismos pré-traducionais, como micro-RNA inibidores podem estar relacionados à esta baixa expressão da proteína. Dois micro-RNA inibidores da expressão de DAX1 já foram identificados, o miR561 foi identificado em hepatócitos e o miR181 em câncer prostático (247, 248).

Observamos uma expressão mais elevada do RNAm de *NR5A1* e *NR0B1* nos TAC pediátricos secretores de androgênios (virilizantes e mistos) que nos TAC não secretores de androgênios (não-secretores ou secretores de cortisol exclusivamente). Estes dados devem ser analisados com evidente cautela, pois além de nossos dados de RNAm serem discortantes da expressão proteica para estes dois genes, nossa amostra de TAC pediátricos não secretores de androgênios foi de apenas três casos. Não existem dados na literatura relacionando a expressão de RNAm de *NR5A1* e *NR0B1* com o padrão de secreção hormonal dos TAC pediátricos. Existem no entanto dados relativos à expressão proteica de SF1. Em nosso estudo, todos os TAC pediátricos submetidos à IHQ eram secretores de androgênios (mistos ou virilizantes isolados), tornando inviável esta análise. Almeida e co-autores relataram que entre os TAC pediátricos, aqueles que apresentaram marcação forte para SF1 estavam mais associados a TAC virilizantes isolados do que os TAC com marcação fraca para SF1 (70 vs. 44%, respectivamente) (208). Um estudo de Doghman e co-autores obteve resultados *in vitro* que podem justificar a relação de hiperexpressão de SF1 com secreção androgênica ao demonstrar que a expressão aumentada de SF1 se relaciona à redução da produção de aldosterona e cortisol, associado a aumento da secreção de DHEAS (243).

Detectamos que a expressão de RNAm de *NR5A1* correlacionou-se positivamente com a expressão de RNAm de *NR0B1* nos TAC pediátricos. Associado a isto, de forma concomitante, evidenciou-se marcação nuclear forte SF1 e DAX1 na maioria dos TAC pediátricos. Estes achados, provavelmente, refletem a interação de SF1 com o seu elemento de resposta no promotor de *NR0B1*, em que o SF1 se liga especificamente e estimula a expressão do gene *NR0B1* (225). Além disso, em altas doses, o DAX1 também pode recrutar coactivadores e estimular a expressão de *NR5A1* (217). Por conseguinte, estes dados sugerem uma regulação de mútua estimulação entre estes fatores de transcrição na tumorigênese dos TAC pediátricos. Apoiando esta hipótese,

de Sousa e co-autores, encontraram resultados semelhantes tanto em relação à expressão de RNAm quanto de proteínas. Naquele estudo, a expressão de RNAm de *NR0B1* e *NR5A1* foi analisada em 20 TAC pediátricos, observando-se correlação positiva entre expressão desses dois genes ($r = 0,54$; $P < 0,0001$). Da mesma forma, foi avaliada a expressão proteica de DAX1 e SF1 em 34 TAC pediátricos, sendo observada correlação positiva entre essas duas proteínas ($r = 0,55$; $P < 0,0001$). Porém, diferentemente de nossos dados, este observou também nos TAC adultos, a correlação positiva tanto a nível de RNAm quanto proteico dos genes *NR0B1* e *NR5A1* (239).

Observamos níveis de expressão de RNAm de *STAT3* mais elevados nos AAC do que nos CAC em pacientes adultos. Além disso, o nível de expressão proteica de SF1 correlacionou-se positivamente com a expressão de RNAm de *STAT3*. Doghman e co-autores relataram que Stat3 fosforilado era expresso na região subcapsular do córtex adrenal de ratos com expressão aumentada de Sf1 (Sf1 TR) na terceira semana de vida. Além disso, a expressão de Stat3 fosforilada foi negativa tanto em ratos *nativos* de mesma idade, quanto em ratos Sf1 TR de 3 a 3,5 meses de vida (243). A fosforilação de Stat3 tem propriedades oncológicas importantes (249). No modelo animal Sf1 TR, as citocinas locais e vias inflamatórias ativadas provavelmente aumentaram a fosforilação de Stat3 durante a transformação induzida de células adrenocorticais (243). Em conjunto, estes dados podem sugerir que os níveis elevados da proteína SF1 podem ocorrer como um evento inicial de tumorigênese adrenocortical em pacientes adultos. Por se tratar de um evento inicial, isso pode justificar porque não verificamos aumento de STAT3 fosforilado nos TAC em nosso estudo. Por outro lado, Zhu e co-autores verificaram expressão proteica aumentada de STAT3 com maior frequência entre os CAC (19 de 24 ou 79%) do que entre os AAC (4 de 20 ou 20%) (159). Neste estudo, porém, os autores não referiram se analisaram a fração fosforilada ou a total de STAT3.

No presente estudo verificamos que a expressão de RNAm de *POU5F1* (gene codificador do OCT4) foi muito baixa tanto nos TAC quanto nos controles. Porém, no nível proteico, observamos uma maior frequência de marcação nuclear forte de OCT4 entre os TAC pediátricos com metástases ou recidivas, do que naqueles sem metástases ou recidivas. Darini e co-autores realizaram estudos com camundongos p53 -/- em que a expressão de Oct4 não só se relacionou ao início tumoral, como também à capacidade de invasividade e metastização (250). Além disso, Gidekel e co-autores também em estudo *in vivo*, com xenoinxerto em camundongos,

demonstraram que a expressão de Oct4 era crucial para manutenção das propriedades de malignidade do tumor. Quando a expressão de Oct4 foi silenciada, ocorreu a regressão tumoral neste estudo (251). De forma interessante, recentemente, nosso grupo demonstrou aumento de expressão proteica de YAP1 em TAC pediátricos, além de a hiperexpressão do RNAm de *YAP1* ter se associado a morte, recorrência, metastátese e redução do tempo de sobrevivência (252). Bora-Singhal e co-autores, observaram *in vitro* que YAP1 é capaz de se combinar a OCT4 formando complexos que podem interagir com regiões promotoras de genes alvo, como o SOX2 (253). Portanto, OCT4 e YAP1 podem ser marcadores prognósticos em TAC pediátricos.

SOX2 é um fator de transcrição que têm sido associado a diversos cânceres de células-tronco, como o de testículo, hipófise e pulmão (254-256). Em nosso estudo, porém, foi observada hipoexpressão de RNAm de *SOX2* tanto em TAC pediátricos quanto em TAC adultos. Da mesma forma, também não foi observada marcação nuclear positiva de SOX2 nem em TAC pediátricos nem nos TAC adultos.

Não observamos diferença na expressão de RNAm de *NANOG* entre controle, TAC pediátricos e TAC de pacientes adultos. No entanto, observamos que nos TAC carreadores da mutação Beta-catenina p.S45P, sejam de pacientes pediátricos ou adultos, a expressão de RNAm de *NANOG* foi cinco vezes maior do que nos TAC com Beta-catenina nativa ou nos TAC carreadores de outras mutações no seu gene. Para investigar esta interação aparentemente específica entre esta mutação somática específica da Beta-catenina e a expressão de *NANOG*, realizamos estudos *in vitro* utilizando a linha celular NCI-H295, carreadora da mutação p.S45P beta-catenina. Inicialmente, observamos por meio de imunofluorescência que apenas algumas células da linhagem NCI-H295 expressavam a proteína *NANOG*. Esse achado pode sugerir que as células que expressam *NANOG* sejam provavelmente um subgrupo celular mais indiferenciado com propriedades de auto-renovação. A seguir, realizamos ensaio de tratamento da linhagem celular NCI-H295 com o composto PNU-74654 para inibição da via Wnt/Beta-catenina. Após 48 horas de tratamento, observou-se diminuição da expressão de RNAm de *NANOG* nas duas concentrações avaliadas. Esse dado mostra que existe interação entre a via Wnt/Beta-catenina e esse fator de transcrição envolvido na renovação de células progenitoras adrenais. De acordo com nosso achado, um estudo recente também demonstrou redução da expressão de RNAm de *NANOG* após a inibição da via Wnt/Beta-catenina em linhagens celulares de pulmão (257). Desta forma, podemos inferir que a via Wnt/Beta-catenina em TAC carreadores

da mutação Beta-catenina p.S45P parece regular a expressão de *NANOG*. Essa mutação específica, localiza-se na região de fosforilação na proteína, o que justifica uma maior ativação da via Wnt. Porém, outras mutações foram encontradas nesta mesma região em outros TAC e não apresentaram maior expressão de RNAm de *NANOG*. O motivo pelo qual apenas essa mutação específica p.S45P beta-catenina em TAC desencadeia a expressão de RNAm de *NANOG*, e não as outras mutações, ainda não está claro.

Em síntese, podemos perceber que a tumorigênese adrenocortical ocorre de modo diferente em adultos e crianças, mas ambas de forma complexa. No presente estudo, demonstramos que o fator de transcrição DAX1 e os marcadores de célula-tronco (*NANOG*, *OCT4*, *SOX2* e *STAT3*) estão relacionados com a embriogênese adrenal apenas em fases mais precoces de desenvolvimento adrenal. Apenas o SF1 mostrou-se expresso na glândula desde fases mais precoces da embriogênese até o período pós-natal. Nossos dados obtidos das análises das amostras tumorais, confirmam que a expressão proteica aumentada de SF1 e DAX1 é mais comum nos TAC pediátricos do que nos adultos. Também confirmamos o aparente sinergismo entre estes dois fatores de transcrição em TAC pediátricos. O *OCT4* se mostrou um promissor marcador prognóstico para TAC pediátricos metastáticos e recidivantes. Finalmente, destacamos a associação entre a ativação da via Wnt/Beta-catenina e a expressão de *NANOG*, associada a TAC portadores da mutação Beta-catenina p.S45P apontando para a existência de interação entre a via Wnt/beta-catenina e células tronco/progenitoras no desenvolvimento desses tumores.

6. CONCLUSÕES

- No desenvolvimento do córtex adrenal, os fatores de transcrição DAX1, SF1 e os marcadores de células-tronco (NANOG, OCT4, SOX2 e STAT3) estão relacionados com a embriogênese adrenal em fases mais precoces do desenvolvimento adrenal. Porém, apenas o SF1 mantém-se expresso após as 31 semanas gestacionais e no período pós-natal.
- Em TAC pediátricos, a expressão aumentada de SF1 e DAX1 é mais frequente do que nos pacientes adultos. Além disso, existe correlação entre suas expressões, sugerindo estimulação mutuamente sinérgica entre estes fatores de transcrição. A expressão de SF1 e DAX1, porém, não se associou à expressão dos marcadores de células-tronco nem em TAC pediátricos, nem em TAC adultos.
- A expressão de Beta-catenina se associou com a expressão de *NANOG* em TAC que carregavam a mutação da Beta-catenina p.S45P. Tanto que *in vitro* a expressão de *NANOG* reduz ao inibirmos a via Wnt/Beta-catenina com a substância PNU74654.
- A marcação nuclear forte de OCT4 apresenta associação fenotípica com TAC pediátricos recidivantes e/ou metastático. A expressão aumentada de RNAm de *STAT3* em TAC adultos, se associou ao fenótipo de adenomas.

7. REFERÊNCIAS

1. Miller WL. Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;379(1-2):62-73.
2. Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. *Endocr Rev*. 2011;32(1):81-151.
3. Nussey SW, S. . The adrenal gland. *Endocrinology: An Integrated Approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; 2001.
4. Mello MP, Penachioni JY, Amaral FC, Castro M. [11beta-hydroxylase deficiency]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2004;48(5):713-23.
5. Sucheston ME, Cannon MS. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. *J Morphol*. 1968;126(4):477-91.
6. Wood MA, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336(1-2):206-12.
7. Malendowicz LK. 100th anniversary of the discovery of the human adrenal fetal zone by Stella Starkel and Leslaw Wegrzynowski: how far have we come? *Folia Histochem Cytobiol*. 48(4):491-506.
8. Else T, Hammer GD. Genetic analysis of adrenal absence: agenesis and aplasia. *Trends Endocrinol Metab*. 2005;16(10):458-68.
9. Morohashi K, Zubair M. The fetal and adult adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336(1-2):193-7.
10. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev*. 1997;18(3):378-403.
11. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1110-5.
12. Suzuki T, Sasano H, Takeyama J, Kaneko C, Freije WA, Carr BR, et al. Developmental changes in steroidogenic enzymes in human postnatal adrenal cortex: immunohistochemical studies. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2000;53(6):739-47.
13. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2013;98(12):4551-64.
14. Xu X, Sergi C. Pediatric adrenal cortical carcinomas: Histopathological criteria and clinical trials. A systematic review. *Contemp Clin Trials*. 2016;50:37-44.
15. Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):52-7.
16. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nature reviews Endocrinology*. 2011;7(6):323-35.

17. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*. 2000;88(4):711-36.
18. Antonini SRL, L.F. and Cavalcanti, M.M. Pediatric adrenocortical tumors: diagnosis, management and advancements in the understanding of the genetic basis and therapeutic implications. *Expert Reviews of Endocrinology & Metabolism*. 2014;9(No. 5):445-64.
19. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(7):2027-31.
20. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2004;22(5):838-45.
21. 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. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):37-43.
22. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2001;86(10):4970-3.
23. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9330-5.
24. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LL. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res*. 2005;37(4):231-5.
25. Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(20):2619-26.
26. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol*. 2003;169(1):5-11.
27. Lacroix A. Clinical presentation and evaluation of adrenocortical tumors [https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-evaluation-of-adrenocortical-tumors?source=search_result&search=adrenocortical tumor&selectedTitle=2~150](https://www.uptodate.com/contents/clinical-presentation-and-evaluation-of-adrenocortical-tumors?source=search_result&search=adrenocortical%20tumor&selectedTitle=2~150): UpToDate; 2017 [
28. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M. Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *European urology*. 2011;60(5):1055-65.

29. Seccia TM, Fassina A, Nussdorfer GG, Pessina AC, Rossi GP. Aldosterone-producing adrenocortical carcinoma: an unusual cause of Conn's syndrome with an ominous clinical course. *Endocrine-related cancer*. 2005;12(1):149-59.
30. Leal LF, Mermejo LM, Ramalho LZ, Martinelli CE, Jr., Yunes JA, Seidinger AL, et al. Wnt/ β -Catenin Pathway Deregulation in Childhood Adrenocortical Tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011.
31. Pereira RM, Michalkiewicz E, Pianovski MA, Franca SN, Boguszewski MC, Cat I, et al. [Treatment of childhood adrenocortical tumor]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005;49(5):747-52.
32. Mittal R, Ramadan DG, Khalifa NM, Khalifa SO, Mazidi Z, Zaki M. Adrenocortical tumors in children: a Kuwait experience. *Gulf J Oncolog*. 2012(12):38-46.
33. Ghazi AA, Mofid D, Salehian MT, Amirbaigloo A, Zare K, Jafari B, et al. Functioning adrenocortical tumors in children-secretory behavior. *J Clin Res Pediatr Endocrinol*. 2013;5(1):27-32.
34. Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, Zambetti GP, Ribeiro RC. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Blood Cancer*. 2005;45(3):265-73.
35. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1997;82(5):1317-24.
36. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(2):G1-G34.
37. Antonini SR, Colli LM, Ferro L, Mermejo L, Castro M. [Childhood adrenocortical tumors: from a clinical to a molecular approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2011;55(8):599-606.
38. Young WF, Jr. Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *The New England journal of medicine*. 2007;356(6):601-10.
39. Young WF, Jr. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2000;29(1):159-85, x.
40. Comlekci A, Yener S, Ertlav S, Secil M, Akinci B, Demir T, et al. Adrenal incidentaloma, clinical, metabolic, follow-up aspects: single centre experience. *Endocrine*. 2010;37(1):40-6.
41. Mermejo LM, Leal LF, Colli LM, Fragoso MCBV, Latronico AC, Tone LG, et al. Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. *Clinical Endocrinology*. 2014;81(4):503-10.
42. Nieman LK. Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(9):4106-13.

43. Castro M, Elias PC, Quidute AR, Halah FP, Moreira AC. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 1999;84(3):878-82.
44. Castro M, Elias PC, Martinelli CE, Jr., Antonini SR, Santiago L, Moreira AC. Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al]. 2000;33(10):1171-5.
45. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2008;93(5):1526-40.
46. Elias PC, Martinez EZ, Barone BF, Mermejo LM, Castro M, Moreira AC. Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2014;99(6):2045-51.
47. Martinelli CE, Jr., Sader SL, Oliveira EB, Daneluzzi JC, Moreira AC. Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1999;51(1):67-71.
48. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, Hahner S, Libe R, Hughes BA, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(12):3775-84.
49. Bancos I, Arlt W. Diagnosis of a malignant adrenal mass: the role of urinary steroid metabolite profiling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017.
50. Boland GW, Dwamena BA, Jagtiani Sangwaiya M, Goehler AG, Blake MA, Hahn PF, et al. Characterization of adrenal masses by using FDG PET: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test performance. *Radiology*. 2011;259(1):117-26.
51. McDermott S, O'Connor OJ, Cronin CG, Blake MA. Radiological evaluation of adrenal incidentalomas: current methods and future prospects. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2012;26(1):21-33.
52. Dinnes J, Bancos I, Ferrante di Ruffano L, Chortis V, Davenport C, Bayliss S, et al. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Imaging for the diagnosis of malignancy in incidentally discovered adrenal masses: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2016;175(2):R51-64.
53. Martinez Leon MI, Romero Chaparro S, Weil Lara B, Dominguez Pinos MD, Ceres Ruiz L, Ibanez Cerrato F, et al. [Adrenocortical tumors in children: imaging adenomas and carcinomas]. *Radiologia*. 2012;54(4):342-9.
54. Flynt KA, Dillman JR, Davenport MS, Smith EA, Else T, Strouse PJ, et al. Pediatric adrenocortical neoplasms: can imaging reliably discriminate adenomas from carcinomas? *Pediatr Radiol*. 2015;45(8):1160-8.
55. Melo-Leite AF, Elias PC, Teixeira SR, Tucci S, Barros GE, Antonini SR, et al. Adrenocortical neoplasms in adulthood and childhood: distinct presentation. *Review of*

the clinical, pathological and imaging characteristics. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 2017;30(3):253-76.

56. Lee MJ, Hahn PF, Papanicolaou N, Egglin TK, Saini S, Mueller PR, et al. Benign and malignant adrenal masses: CT distinction with attenuation coefficients, size, and observer analysis. *Radiology.* 1991;179(2):415-8.

57. Hamrahian AH, Ioachimescu AG, Remer EM, Motta-Ramirez G, Bogabathina H, Levin HS, et al. Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas: Cleveland Clinic experience. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2005;90(2):871-7.

58. Ilias I, Sahdev A, Reznick RH, Grossman AB, Pacak K. The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocrine-related cancer.* 2007;14(3):587-99.

59. Korobkin M, Brodeur FJ, Francis IR, Quint LE, Dunnick NR, Goodsitt M. Delayed enhanced CT for differentiation of benign from malignant adrenal masses. *Radiology.* 1996;200(3):737-42.

60. Melo HJ, Goldman SM, Szejnfeld J, Faria JF, Huayllas MK, Andreoni C, et al. Application of a protocol for magnetic resonance spectroscopy of adrenal glands: an experiment with over 100 cases. *Radiol Bras.* 2014;47(6):333-41.

61. Hahner S, Sundin A. Metomidate-based imaging of adrenal masses. *Hormones & cancer.* 2011;2(6):348-53.

62. Bauditz J, Quinkler M, Beyersdorff D, Wermke W. Improved detection of hepatic metastases of adrenocortical cancer by contrast-enhanced ultrasound. *Oncology reports.* 2008;19(5):1135-9.

63. Ribeiro RC, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, DeLacerda L, Sandrini F, Pianovsky MD, et al. Adrenocortical tumors in children. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al].* 2000;33(10):1225-34.

64. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol.* 1978;120(6):660-5.

65. Fassnacht M, Johansen S, Quinkler M, Bucskey P, Willenberg HS, Beuschlein F, et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer.* 2009;115(2):243-50.

66. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Human pathology.* 2009;40(6):757-68.

67. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 1989;13(3):202-6.

68. Ribeiro RC, Sandrini Neto RS, Schell MJ, Lacerda L, Sambaio GA, Cat I. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1990;8(1):67-74.
69. Lack EE, Mulvihill JJ, Travis WD, Kozakewich HP. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric and adolescent age group. Clinicopathologic study of 30 cases with emphasis on epidemiological and prognostic factors. *Pathol Annu*. 1992;27 Pt 1:1-53.
70. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *The American journal of surgical pathology*. 2003;27(7):867-81.
71. Dichtchekenian V, de Braganca Pereira CA, Kuperman H, Della Manna T, Damiani D, Ferreira Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: prognostic indices based on clinical and immunohistochemical markers. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 2005;18(4):347-53.
72. 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*. 2013;48(5):1025-31.
73. Leite FA, Lira RC, Fedatto PF, Antonini SR, Martinelli CE, Jr., de Castro M, et al. Low expression of HLA-DRA, HLA-DPA1, and HLA-DPB1 is associated with poor prognosis in pediatric adrenocortical tumors (ACT). *Pediatr Blood Cancer*. 2014;61(11):1940-8.
74. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer*. 1985;55(4):766-73.
75. Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, Lloyd RV, Sandrini R, Silva JB, et al. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. *Am J Clin Pathol*. 1994;101(5):625-9.
76. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol*. 1979;72(3):390-9.
77. Dall'Igna P, Virgone C, De Salvo GL, Bertorelle R, Indolfi P, De Paoli A, et al. Adrenocortical tumors in Italian children: analysis of clinical characteristics and P53 status. Data from the national registries. *J Pediatr Surg*. 2014;49(9):1367-71.
78. Magro G, Esposito G, Cecchetto G, Dall'Igna P, Marcato R, Gambini C, et al. Pediatric adrenocortical tumors: morphological diagnostic criteria and immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase type 2 and human leucocyte-associated antigen (HLA) class II antigens. Results from the Italian Pediatric Rare Tumor (TREP) Study project. *Human pathology*. 2012;43(1):31-9.
79. Chatterjee G, DasGupta S, Mukherjee G, Sengupta M, Roy P, Arun I, et al. Usefulness of Wieneke criteria in assessing morphologic characteristics of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Surg Int*. 2015;31(6):563-71.
80. Varghese J, Habra MA. Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2017.

81. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol.* 1995;154(6):2004-9.
82. Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2007;39(6):461-6.
83. Tucci S, Jr., Martins AC, Suaid HJ, Cologna AJ, Reis RB. The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. *J Urol.* 2005;174(6):2338-42, discussion 42.
84. Hubertus J, Boxberger N, Redlich A, von Schweinitz D, Vorwerk P. Surgical aspects in the treatment of adrenocortical carcinomas in children: data of the GPOH-MET 97 trial. *Klinische Padiatrie.* 2012;224(3):143-7.
85. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, et al. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2015;100(3):841-9.
86. Cattoretti G, Becker MH, Key G, Duchrow M, Schluter C, Galle J, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. *J Pathol.* 1992;168(4):357-63.
87. Morimoto R, Satoh F, Murakami O, Suzuki T, Abe T, Tanemoto M, et al. Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocr J.* 2008;55(1):49-55.
88. Scollo C, Russo M, Trovato MA, Sambataro D, Giuffrida D, Manusia M, et al. Prognostic Factors for Adrenocortical Carcinoma Outcomes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7:99.
89. Papathomas TG, Pucci E, Giordano TJ, Lu H, Duregon E, Volante M, et al. An International Ki67 Reproducibility Study in Adrenal Cortical Carcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 2016;40(4):569-76.
90. Barlaskar FM, Hammer GD. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. *Rev Endocr Metab Disord.* 2007;8(4):343-8.
91. Kim A, Giordano TJ, Kuick R, Serecky K, Hammer GD. Wnt/betacatenin signaling in adrenocortical stem/progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Ann Endocrinol (Paris).* 2009;70(3):156.
92. Redlich A, Boxberger N, Strugala D, Fruhwald MC, Leuschner I, Kropf S, et al. Systemic treatment of adrenocortical carcinoma in children: data from the German GPOH-MET 97 trial. *Klinische Padiatrie.* 2012;224(6):366-71.
93. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *The New England journal of medicine.* 2012;366(23):2189-97.

94. Porpiglia F, Fiori C, Daffara F, Zaggia B, Bollito E, Volante M, et al. Retrospective evaluation of the outcome of open versus laparoscopic adrenalectomy for stage I and II adrenocortical cancer. *European urology*. 2010;57(5):873-8.
95. Brix D, Allolio B, Fenske W, Agha A, Dralle H, Jurowich C, et al. Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients. *European urology*. 2010;58(4):609-15.
96. Lombardi CP, Raffaelli M, De Crea C, Boniardi M, De Toma G, Marzano LA, et al. Open versus endoscopic adrenalectomy in the treatment of localized (stage I/II) adrenocortical carcinoma: results of a multiinstitutional Italian survey. *Surgery*. 2012;152(6):1158-64.
97. Miller BS, Ammori JB, Gauger PG, Broome JT, Hammer GD, Doherty GM. Laparoscopic resection is inappropriate in patients with known or suspected adrenocortical carcinoma. *World J Surg*. 2010;34(6):1380-5.
98. Mir MC, Klink JC, Guillotreau J, Long JA, Miocinovic R, Kaouk JH, et al. Comparative outcomes of laparoscopic and open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: single, high-volume center experience. *Ann Surg Oncol*. 2013;20(5):1456-61.
99. Porpiglia F, Miller BS, Manfredi M, Fiori C, Doherty GM. A debate on laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma. *Hormones & cancer*. 2011;2(6):372-7.
100. Jurowich C, Fassnacht M, Kroiss M, Deutschbein T, Germer CT, Reibetanz J. Is there a role for laparoscopic adrenalectomy in patients with suspected adrenocortical carcinoma? A critical appraisal of the literature. *Horm Metab Res*. 2013;45(2):130-6.
101. St Peter SD, Valusek PA, Hill S, Wulkan ML, Shah SS, Martinez Ferro M, et al. Laparoscopic adrenalectomy in children: a multicenter experience. *Journal of laparoendoscopic & advanced surgical techniques Part A*. 2011;21(7):647-9.
102. Lopes RI, Denes FT, Bissoli J, Mendonca BB, Srougi M. Laparoscopic adrenalectomy in children. *Journal of pediatric urology*. 2012;8(4):379-85.
103. Gelas T, Frappaz D, Berlier P, Mouriquand PD, Mure PY. Mini-invasive surgery for adrenocortical carcinoma in children: is it safe? *Pediatric hematology and oncology*. 2013;30(4):288-90.
104. Catellani B, Acciuffi S, Biondini D, Ceccarelli PL, Cacciari A, Gelmini R. Transperitoneal laparoscopic adrenalectomy in children. *JSLs*. 2014;18(3).
105. Latronico AC. Tumores Adrenocorticaes. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonca BB, editors. *Endocrinologia*. São Paulo: Editora Atheneu; 2007. p. 555-60.
106. Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer*. 1998;83(10):2194-200.
107. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, et al. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *The New England journal of medicine*. 2007;356(23):2372-80.

108. Marques-Pereira R, Delacerda L, Lacerda HM, Michalkiewicz E, Sandrini F, Sandrini R. Childhood adrenocortical tumours: a review. *Hered Cancer Clin Pract*. 2006;4(2):81-9.
109. De Francia S, Ardito A, Daffara F, Zaggia B, Germano A, Berruti A, et al. Mitotane treatment for adrenocortical carcinoma: an overview. *Minerva Endocrinol*. 2012;37(1):9-23.
110. Creemers SG, Hofland LJ, Korpershoek E, Franssen GJ, van Kemenade FJ, de Herder WW, et al. Future directions in the diagnosis and medical treatment of adrenocortical carcinoma. *Endocrine-related cancer*. 2016;23(1):R43-69.
111. Nelson AA, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Archives of pathology*. 1949;48(5):387-94.
112. Martz F, Straw JA. Treatment with o,p'-DDD (mitotane) decreased cytochrome P-450, heme, and microsomal protein content in the dog adrenal cortex in vivo. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1976;13(1):83-92.
113. Poli G, Guasti D, Rapizzi E, Fucci R, Canu L, Bandini A, et al. Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. *Endocrine-related cancer*. 2013;20(4):537-50.
114. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, et al. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology*. 2015;156(11):3895-908.
115. Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Leboulleux S, et al. Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2011;96(6):1844-51.
116. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2006;91(6):2027-37.
117. Sutter JA, Grimberg A. Adrenocortical tumors and hyperplasias in childhood--etiology, genetics, clinical presentation and therapy. *Pediatric endocrinology reviews : PER*. 2006;4(1):32-9.
118. De Leon DD, Lange BJ, Walterhouse D, Moshang T. Long-term (15 years) outcome in an infant with metastatic adrenocortical carcinoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2002;87(10):4452-6.
119. Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(4):386-94.
120. Pinto EM, Morton C, Rodriguez-Galindo C, McGregor L, Davidoff AM, Mercer K, et al. Establishment and characterization of the first pediatric adrenocortical carcinoma xenograft model identifies topotecan as a potential chemotherapeutic agent. *Clin Cancer Res*. 2013;19(7):1740-7.

121. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2007;67(2):600-8.
122. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):668-76.
123. Szabo D, Zsippai A, Bendes M, Tombol Z, Szabo PM, Racz K, et al. [Pathogenesis of adrenocortical cancer]. *Orv Hetil.* 2010;151(29):1163-70.
124. Pinto EM, Chen X, Easton J, Finkelstein D, Liu Z, Pounds S, et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat Commun.* 2015;6:6302.
125. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell.* 2016;30(2):363.
126. Giordano TJ. Gene expression profiling of endocrine tumors using DNA microarrays: progress and promise. *Endocr Pathol.* 2003;14(2):107-16.
127. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer.* 2006;42(8):1040-3.
128. Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2007;23:675-99.
129. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocrine-related cancer.* 2007;14(1):13-28.
130. Kim AC, Barlaskar FM, Heaton JH, Else T, Kelly VR, Krill KT, et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. *Endocr Rev.* 2009;30(3):241-63.
131. Penny MK, Finco I, Hammer GD. Cell signaling pathways in the adrenal cortex: Links to stem/progenitor biology and neoplasia. *Mol Cell Endocrinol.* 2017;445:42-54.
132. Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):2-11.
133. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1994;78(6):1444-53.
134. Gomes DC, Leal LF, Mermejo LM, Scrideli CA, Martinelli CE, Jr., Fragoso MC, et al. Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;99(7):E1209-16.
135. Leal LF, Mermejo LM, Ramalho LZ, Martinelli CE, Jr., Yunes JA, Seidinger AL, et al. Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(10):3106-14.

136. Simon DP, Giordano TJ, Hammer GD. Upregulated JAG1 enhances cell proliferation in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2012;18(9):2452-64.
137. Duncan AW, Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, et al. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005;6(3):314-22.
138. Palma V, Ruiz i Altaba A. Hedgehog-Gli signaling regulates the behavior of cells with stem cell properties in the developing neocortex. *Development.* 2004;131(2):337-45.
139. Ingle DJH, G. M. Autotransplantation and regeneration of the adrenal gland. *Endocrinology.* 1938;22(4):458-64.
140. Zubair M, Ishihara S, Oka S, Okumura K, Morohashi K. Two-step regulation of Ad4BP/SF-1 gene transcription during fetal adrenal development: initiation by a Hox-Pbx1-Prep1 complex and maintenance via autoregulation by Ad4BP/SF-1. *Mol Cell Biol.* 2006;26(11):4111-21.
141. Zubair M, Parker KL, Morohashi K. Developmental links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing. *Mol Cell Biol.* 2008;28(23):7030-40.
142. Ching S, Vilain E. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis.* 2009;47(9):628-37.
143. Huang CC, Miyagawa S, Matsumaru D, Parker KL, Yao HH. Progenitor cell expansion and organ size of mouse adrenal is regulated by sonic hedgehog. *Endocrinology.* 2010;151(3):1119-28.
144. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(50):21185-90.
145. Laufer E, Kesper D, Vortkamp A, King P. Sonic hedgehog signaling during adrenal development. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):19-27.
146. Wood MA, Acharya A, Finco I, Swonger JM, Elston MJ, Tallquist MD, et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in *M. musculus*. *Development.* 2013;140(22):4522-32.
147. Torres-Padilla ME, Chambers I. Transcription factor heterogeneity in pluripotent stem cells: a stochastic advantage. *Development.* 2014;141(11):2173-81.
148. Zeineddine D, Hammoud AA, Mortada M, Boeuf H. The Oct4 protein: more than a magic stemness marker. *Am J Stem Cells.* 2014;3(2):74-82.
149. Wagner RT, Cooney AJ. Minireview: the diverse roles of nuclear receptors in the regulation of embryonic stem cell pluripotency. *Mol Endocrinol.* 2013;27(6):864-78.
150. Pera MF. Defining pluripotency. *Nat Methods.* 2010;7(11):885-7.
151. Niakan KK, McCabe ER. DAX1 origin, function, and novel role. *Mol Genet Metab.* 2005;86(1-2):70-83.

152. Pan GJ, Chang ZY, Scholer HR, Pei D. Stem cell pluripotency and transcription factor Oct4. *Cell Res.* 2002;12(5-6):321-9.
153. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, et al. Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell.* 2003;113(5):643-55.
154. Raz R, Lee CK, Cannizzaro LA, d'Eustachio P, Levy DE. Essential role of STAT3 for embryonic stem cell pluripotency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999;96(6):2846-51.
155. Koo BS, Lee SH, Kim JM, Huang S, Kim SH, Rho YS, et al. Oct4 is a critical regulator of stemness in head and neck squamous carcinoma cells. *Oncogene.* 2015;34(18):2317-24.
156. Boumahdi S, Driessens G, Lapouge G, Rorive S, Nassar D, Le Mercier M, et al. SOX2 controls tumour initiation and cancer stem-cell functions in squamous-cell carcinoma. *Nature.* 2014;511(7508):246-50.
157. Jeter CR, Badeaux M, Choy G, Chandra D, Patrawala L, Liu C, et al. Functional evidence that the self-renewal gene NANOG regulates human tumor development. *Stem Cells.* 2009;27(5):993-1005.
158. Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, et al. An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet.* 2008;40(5):499-507.
159. Zhu Y, Xu Y, Chen D, Zhang C, Rui W, Zhao J, et al. Expression of STAT3 and IGF2 in adrenocortical carcinoma and its relationship with angiogenesis. *Clin Transl Oncol.* 2014;16(7):644-9.
160. Custodio G, Komechen H, Figueiredo FR, Fachin ND, Pianovski MA, Figueiredo BC. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):44-51.
161. Boechat GA, Stinghen ST, Custodio G, Pianovski MA, Figueiredo FR, Jenkins J, et al. Placental alkaline phosphatase in pediatric adrenocortical cancer. *J Pediatr Hematol Oncol.* 2011;33(4):e149-53.
162. Lorea CF, Moreno DA, Borges KS, Martinelli CE, Jr., Antonini SR, de Castro M, et al. Expression profile of apoptosis-related genes in childhood adrenocortical tumors: low level of expression of BCL2 and TNF genes suggests a poor prognosis. *Eur J Endocrinol.* 2012;167(2):199-208.
163. Soussi T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. *EMBO Rep.* 11(11):822-6.
164. Ragazzon B, Libe R, Gaujoux S, Assie G, Fratticci A, Launay P, et al. Transcriptome analysis reveals that p53 and β -catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res.* 2010;70(21):8276-81.
165. Pinto EM, Ribeiro RC, Kletter GB, Lawrence JP, Jenkins JJ, Wang J, et al. Inherited germline TP53 mutation encodes a protein with an aberrant C-terminal motif in a case of pediatric adrenocortical tumor. *Fam Cancer.* 2011;10(1):141-6.

166. Ko JH, Lee HS, Hong J, Hwang JS. Virilizing adrenocortical carcinoma in a child with Turner syndrome and somatic TP53 gene mutation. *Eur J Pediatr*. 2010;169(4):501-4.
167. Si N, Sun M, Lu CX, Liu YS, Qi Z, Yang W, et al. [Identification of a novel TP53 germline mutation in one child with adrenocortical carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2009;89(20):1402-4.
168. Lin MT, Shieh JJ, Chang JH, Chang SW, Chen TC, Hsu WH. Early detection of adrenocortical carcinoma in a child with Li-Fraumeni syndrome. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;52(4):541-4.
169. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, Olivier M, Martel-Planche G, Le Calvez-Kelm F, et al. 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*. 2010;31(2):143-50.
170. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*. 2002;9(1):12-6.
171. Testa JR, Hino O. Tumor suppressor genes and the two-hit model of recessive oncogenesis: celebrating Alfred Knudson's 80th birthday. *Genes Chromosomes Cancer*. 2003;38(4):286-7.
172. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(5):2976-81.
173. Bielinska M, Parviainen H, Kiiveri S, Heikinheimo M, Wilson DB. Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Vet Pathol*. 2009;46(2):194-210.
174. Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, Gugelmin ES, Oliveira Figueiredo MM, Watanabe F, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One*. 2011;6(3):e18015.
175. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, Pereira RM, Cheng C, Liu W, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet*. 2006;43(1):91-6.
176. Seidinger AL, Mastellaro MJ, Fortes FP, Assumpcao JG, Cardinalli IA, Ganazza MA, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil. *Cancer*. 2010.
177. Villani A, Tabori U, Schiffman J, Shlien A, Beyene J, Druker H, et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. *Lancet Oncol*. 2011;12(6):559-67.
178. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2008;40(7):577-94.

179. Conacci-Sorrell ME, Ben-Yedidia T, Shtutman M, Feinstein E, Einat P, Ben-Ze'ev A. Nr-CAM is a target gene of the beta-catenin/LEF-1 pathway in melanoma and colon cancer and its expression enhances motility and confers tumorigenesis. *Genes Dev.* 2002;16(16):2058-72.
180. Kuulasmaa T, Jaaskelainen J, Suppola S, Pietilainen T, Heikkila P, Aaltomaa S, et al. WNT-4 mRNA expression in human adrenocortical tumors and cultured adrenal cells. *Horm Metab Res.* 2008;40(10):668-73.
181. Rizvi AZ, Wong MH. Epithelial stem cells and their niche: there's no place like home. *Stem Cells.* 2005;23(2):150-65.
182. Reya T, Clevers H. Wnt signalling in stem cells and cancer. *Nature.* 2005;434(7035):843-50.
183. El Wakil A, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol.* 2011;332(1-2):32-7.
184. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2008;68(2):264-70.
185. Durand J, Lampron A, Mazzuco TL, Chapman A, Bourdeau I. Characterization of Differential Gene Expression in Adrenocortical Tumors Harboring {beta}-Catenin (CTNNB1) Mutations. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2011.
186. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, Baudry C, Chokri I, Ragazzon B, et al. Wnt/beta-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 2011;96(2):E419-26.
187. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet.* 2014;46(6):607-12.
188. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005;65(17):7622-7.
189. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Jossineau C, Damon-Soubeyrand C, Louiset E, et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1561-76.
190. Leal LF, Bueno AC, Gomes DC, Abduch R, de Castro M, Antonini SR. Inhibition of the Tcf/beta-catenin complex increases apoptosis and impairs adrenocortical tumor cell proliferation and adrenal steroidogenesis. *Oncotarget.* 2015;6(40):43016-32.
191. Ramalho-Santos M, Melton DA, McMahon AP. Hedgehog signals regulate multiple aspects of gastrointestinal development. *Development.* 2000;127(12):2763-72.

192. Liu S, Dontu G, Wicha MS. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. *Breast Cancer Res.* 2005;7(3):86-95.
193. Kawahira H, Scheel DW, Smith SB, German MS, Hebrok M. Hedgehog signaling regulates expansion of pancreatic epithelial cells. *Dev Biol.* 2005;280(1):111-21.
194. Kondo T. Brain cancer stem-like cells. *Eur J Cancer.* 2006;42(9):1237-42.
195. Werminghaus P, Haase M, Hornsby PJ, Schinner S, Schott M, Malendowicz LK, et al. Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2014;139:7-15.
196. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol.* 1992;6(8):1249-58.
197. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 1997;18(3):361-77.
198. Hammer GD, Krylova I, Zhang Y, Darimont BD, Simpson K, Weigel NL, et al. Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. *Mol Cell.* 1999;3(4):521-6.
199. Achermann JC, Ito M, Hindmarsh PC, Jameson JL. A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet.* 1999;22(2):125-6.
200. Correa RV, Domenice S, Bingham NC, Billerbeck AE, Rainey WE, Parker KL, et al. A microdeletion in the ligand binding domain of human steroidogenic factor 1 causes XY sex reversal without adrenal insufficiency. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(4):1767-72.
201. Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell.* 1994;77(4):481-90.
202. Sadovsky Y, Crawford PA, Woodson KG, Polish JA, Clements MA, Tourtellotte LM, et al. Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995;92(24):10939-43.
203. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, et al. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology.* 2002;143(8):3122-35.
204. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism.* 1999;84(3):1116-21.
205. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *British journal of cancer.* 1999;81(2):300-4.

206. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2005;90(2):615-9.
207. Sbiera S, Schull S, Assie G, Voelker HU, Kraus L, Beyer M, et al. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(10):E161-71.
208. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2010;95(3):1458-62.
209. Doghman M, Cazareth J, Douguet D, Madoux F, Hodder P, Lalli E. Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor-1 inverse agonists. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2009;94(6):2178-83.
210. Doghman M, Madoux F, Hodder P, Lalli E. Identification and characterization of steroidogenic factor-1 inverse agonists. *Methods Enzymol*. 2010;485:3-23.
211. Niakan KK, Davis EC, Clipsham RC, Jiang M, Dehart DB, Sulik KK, et al. Novel role for the orphan nuclear receptor Dax1 in embryogenesis, different from steroidogenesis. *Mol Genet Metab*. 2006;88(3):261-71.
212. Zanaria E, Muscatelli F, Bardoni B, Strom TM, Guioli S, Guo W, et al. An unusual member of the nuclear hormone receptor superfamily responsible for X-linked adrenal hypoplasia congenita. *Nature*. 1994;372(6507):635-41.
213. Guo W, Mason JS, Stone CG, Jr., Morgan SA, Madu SI, Baldini A, et al. Diagnosis of X-linked adrenal hypoplasia congenita by mutation analysis of the DAX1 gene. *JAMA*. 1995;274(4):324-30.
214. Bardoni B, Zanaria E, Guioli S, Floridia G, Worley KC, Tonini G, et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. *Nat Genet*. 1994;7(4):497-501.
215. Hossain A, Li C, Saunders GF. Generation of two distinct functional isoforms of dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X chromosome gene 1 (DAX-1) by alternative splicing. *Mol Endocrinol*. 2004;18(6):1428-37.
216. Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. *Nature*. 1997;390(6657):311-5.
217. Xu B, Yang WH, Gerin I, Hu CD, Hammer GD, Koenig RJ. Dax-1 and steroid receptor RNA activator (SRA) function as transcriptional coactivators for steroidogenic factor 1 in steroidogenesis. *Mol Cell Biol*. 2009;29(7):1719-34.
218. Wang XL, Bassett M, Zhang Y, Yin S, Clyne C, White PC, et al. Transcriptional regulation of human 11beta-hydroxylase (hCYP11B1). *Endocrinology*. 2000;141(10):3587-94.

219. Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA, Jameson JL. Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet.* 1998;20(4):353-7.
220. Babu PS, Bavers DL, Beuschlein F, Shah S, Jeffs B, Jameson JL, et al. Interaction between Dax-1 and steroidogenic factor-1 in vivo: increased adrenal responsiveness to ACTH in the absence of Dax-1. *Endocrinology.* 2002;143(2):665-73.
221. Ho J, Zhang YH, Huang BL, McCabe ER. NR0B1A: an alternatively spliced form of NR0B1. *Mol Genet Metab.* 2004;83(4):330-6.
222. Scheys JO, Heaton JH, Hammer GD. Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice. *Endocrinology.* 2011;152(9):3430-9.
223. Mizusaki H, Kawabe K, Mukai T, Ariyoshi E, Kasahara M, Yoshioka H, et al. Dax-1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the X chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. *Mol Endocrinol.* 2003;17(4):507-19.
224. Kim AC, Reuter AL, Zubair M, Else T, Serecky K, Bingham NC, et al. Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development.* 2008;135(15):2593-602.
225. Vilain E, Guo W, Zhang YH, McCabe ER. DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line. *Biochem Mol Med.* 1997;61(1):1-8.
226. Reincke M, Beuschlein F, Lalli E, Arlt W, Vay S, Sassone-Corsi P, et al. DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83(7):2597-600.
227. Shibata H, Ikeda Y, Mukai T, Morohashi K, Kurihara I, Ando T, et al. Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1-2):206-16.
228. Bassett MH, Mayhew B, Rehman K, White PC, Mantero F, Arnaldi G, et al. Expression profiles for steroidogenic enzymes in adrenocortical disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5446-55.
229. Almeida MQ. Expressão dos genes IGF-II, IGF-IR, SF-1 e DAX-1 em tumores adrenocorticais de crianças e adultos. São Paulo: Universidade de São Paulo; 2008.
230. de Sousa GR, Soares IC, Faria AM, Domingues VB, Wakamatsu A, Lerario AM, et al. DAX1 Overexpression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Synergic Role with SF1 in Tumorigenesis. *Horm Metab Res.* 2015.
231. Logan CY, Nusse R. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20:781-810.
232. Blanpain C, Horsley V, Fuchs E. Epithelial stem cells: turning over new leaves. *Cell.* 2007;128(3):445-58.
233. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

234. Handra-Luca A, Bilal H, Bertrand JC, Fouret P. Extra-cellular signal-regulated ERK-1/ERK-2 pathway activation in human salivary gland mucoepidermoid carcinoma: association to aggressive tumor behavior and tumor cell proliferation. *Am J Pathol*. 2003;163(3):957-67.
235. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res*. 1990;50(17):5488-96.
236. Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 2004;228(1-2):23-38.
237. Gomes DC, Leal LF, Mermejo LM, Scrideli CA, Martinelli Jr. CE, Fragoso MCBV, et al. Sonic Hedgehog Signaling is Active in Human Adrenal Cortex Development and Deregulated in Adrenocortical Tumors. Under Revision. 2014.
238. Mermejo LM. Vias Wnt canônica e não-canônicas em tumores adrenocorticais pediátricos e adultos. Ribeirão Preto: University of Sao Paulo; 2013.
239. de Sousa GR, Soares IC, Faria AM, Domingues VB, Wakamatsu A, Lerario AM, et al. DAX1 Overexpression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Synergic Role with SF1 in Tumorigenesis. *Horm Metab Res*. 2015;47(9):656-61.
240. Goto M, Piper Hanley K, Marcos J, Wood PJ, Wright S, Postle AD, et al. In humans, early cortisol biosynthesis provides a mechanism to safeguard female sexual development. *J Clin Invest*. 2006;116(4):953-60.
241. Natarajan TG, Ganesan N, Fitzgerald KT. Cancer stem cells and markers: new model of tumorigenesis with therapeutic implications. *Cancer Biomark*. 2010;9(1-6):65-99.
242. Duregon E, Volante M, Giorcelli J, Terzolo M, Lalli E, Papotti M. Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. *Hum Pathol*. 2013;44(5):822-8.
243. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol*. 2007;21(12):2968-87.
244. Houseley J, Tollervey D. The many pathways of RNA degradation. *Cell*. 2009;136(4):763-76.
245. Maekawa S, Imamachi N, Irie T, Tani H, Matsumoto K, Mizutani R, et al. Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance. *BMC Genomics*. 2015;16:154.
246. Moore MJ, Proudfoot NJ. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*. 2009;136(4):688-700.
247. Li M, Yang Y, He ZX, Zhou ZW, Yang T, Guo P, et al. MicroRNA-561 promotes acetaminophen-induced hepatotoxicity in HepG2 cells and primary human hepatocytes through downregulation of the nuclear receptor corepressor dosage-sensitive sex-

reversal adrenal hypoplasia congenital critical region on the X chromosome, gene 1 (DAX-1). *Drug Metab Dispos.* 2014;42(1):44-61.

248. Tong SJ, Liu J, Wang X, Qu LX. microRNA-181 promotes prostate cancer cell proliferation by regulating DAX-1 expression. *Exp Ther Med.* 2014;8(4):1296-300.

249. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, et al. Stat3 as an oncogene. *Cell.* 1999;98(3):295-303.

250. Darini CY, Pisani DF, Hofman P, Pedetour F, Sudaka I, Chomienne C, et al. Self-renewal gene tracking to identify tumour-initiating cells associated with metastatic potential. *Oncogene.* 2012;31(19):2438-49.

251. Gidekel S, Pizov G, Bergman Y, Pikarsky E. Oct-3/4 is a dose-dependent oncogenic fate determinant. *Cancer Cell.* 2003;4(5):361-70.

252. Abduch RH, Bueno AC, Leal LF, Cavalcanti MM, Gomes DC, Brandalise SR, et al. Unraveling the expression of the oncogene YAP1, a Wnt/beta-catenin target, in adrenocortical tumors and its association with poor outcome in pediatric patients. *Oncotarget.* 2016.

253. Bora-Singhal N, Nguyen J, Schaal C, Perumal D, Singh S, Coppola D, et al. YAP1 Regulates OCT4 Activity and SOX2 Expression to Facilitate Self-Renewal and Vascular Mimicry of Stem-Like Cells. *Stem Cells.* 2015;33(6):1705-18.

254. Mertens FM, Gremeaux L, Chen J, Fu Q, Willems C, Roose H, et al. Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics. *Endocr Relat Cancer.* 2015.

255. Mizrak SC, Chikhovskaya JV, Sadri-Ardekani H, van Daalen S, Korver CM, Hovingh SE, et al. Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod.* 2010;25(1):158-67.

256. Pietanza MC, Ladanyi M. Bringing the genomic landscape of small-cell lung cancer into focus. *Nat Genet.* 2012;44(10):1074-5.

257. Zhang X, Lou Y, Zheng X, Wang H, Sun J, Dong Q, et al. Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells. *Drug Des Devel Ther.* 2015;9:2399-407.

Anexo 1 - Ofício de aprovação do projeto de pesquisa no Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

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

CÓPIA

Ribeirão Preto, 07 de novembro de 2013

Ofício nº 4040/2013
CEP/FC

PROCESSO HCRP nº 3019/2013

Prezados Pesquisadores,

O trabalho intitulado **"AVALIAÇÃO DOS GENES DAX1, SF1 E SUA INTERAÇÃO COM CÉLULAS-TRONCO/PROGENITORAS EM TUMORES ADRENOCORTICAIS"** - Versão 26/07/2013, foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 377ª Reunião Ordinária realizada em 04/11/2013, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como a solicitação de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-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. De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Atenciosamente.

PROF. DR. FABIO CARMONA

Vice-Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores

MARCELO MACHADO CAVALCANTI

PROF. DR. SONIR ROBERTO RAUBER ANTONINI (Orientador)

Depto. de Puericultura e Pediatria

Campus Universitário - Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002188 e Registro PB/CONEP nº 5440
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo 2 - Termo de consentimento Livre e Esclarecido para paciente participante da pesquisa.

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS LEGAIS DE
PACIENTES COM IDADE INFERIOR A 18 ANOS

NOME DA PESQUISA:

“Avaliação dos genes DAX1, SF1 e sua interação com Células-tronco/progenitoras em Tumores Adrenocorticais”

PESQUISADORES RESPONSÁVEIS: Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini
Marcelo Machado Cavalcanti

PATROCINADOR QUE APÓIA FINANCEIRAMENTE A PESQUISA: FAPESP.

INFORMAÇÕES AOS INDIVÍDUOS DA PESQUISA:

Pedimos sua autorização, como responsável pelo menor portador de tumor na adrenal, para que o mesmo participe deste estudo. Para o estudo, será necessário um pequeno fragmento (pedacinho) de tecido do tumor que será retirado durante a cirurgia para o tratamento do menor, portador de tumor adrenal. A cirurgia será realizada no centro cirúrgico do Hospital das Clínicas. A cirurgia não sofrerá nenhuma modificação e será realizada conforme a indicação do caso. Este pedacinho de tecido do tumor será obtido após a finalização da cirurgia e será armazenado no laboratório para realização de estudos que têm como objetivo analisar o tumor para conhecer melhor a sua formação e comportamento.

Precisaremos também acessar aos dados do prontuário médico, a fim de podermos correlacionar possíveis achados do estudo com aspectos clínicos da doença.

Você, responsável pelo menor, não terá nenhum gasto com essa pesquisa. Ela não oferece nenhum risco ao menor e você tem a garantia de sigilo dos dados pessoais utilizados. Se você concordar com a participação do menor, sob sua responsabilidade, todas as dúvidas sobre a pesquisa serão respondidas. Caso você queira desistir durante a pesquisa, não haverá nenhum problema e o tratamento que o menor estiver fazendo continuará da mesma forma. Quanto aos resultados obtidos neste estudo, nossos telefones estão escritos nesta folha, e você poderá nos ligar a qualquer hora para tirar suas dúvidas.

No futuro, este estudo poderá ajudar a tratar de forma mais adequada estes tumores.

Portanto, EU,, responsável legal pelo menor, tendo sido esclarecido sobre todas as condições que constam do documento “TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA RESPONSÁVEIS LEGAIS DE PACIENTES MENORES DE 18 ANOS”, de que trata os Projetos de Pesquisa intitulados “Avaliações das vias de expressão gênica em tumores adrenocorticais”, que tem como pesquisadores responsáveis Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini, CRM 71.837-SP, Marcelo Machado Cavalcanti, CRM 142.781-SP, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

* A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida durante a realização do estudo;

- * A liberdade de retirar o meu consentimento e deixar de participar do estudo a qualquer momento;
- * A segurança de que meu filho não será identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação relacionada a sua privacidade;
- * O compromisso de que me será prestada informação atualizada durante o estudo, mesmo que essa possa afetar a minha vontade de continuar concordando em participar do mesmo;
- * O compromisso de que meu filho será devidamente acompanhado durante todo o período de sua participação no projeto e após a conclusão dos trabalhos da pesquisa.

Declaro, ainda, que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade em deixar meu filho participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, ____ de _____ de _____.

Assinatura do Paciente ou Responsável Legal pelo paciente menor de 18 anos

Assinatura do paciente (maior de 10 anos de idade)

Prof. Dr. Sonir R. R. Antonini
Fone: 16 3602-2937

Anexo 3 - Ofício de aprovação da criação do Biorrepositório - "Banco de amostras tumorais e DNA de pacientes com doenças endócrinas" no Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

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

Ribeirão Preto, 16 de maio de 2013

Ofício nº 1797/2013
CEP/MGV

CÓPIA

Processo HCRP nº 5856/2013

Prezada Senhora

O Comitê de Ética em Pesquisa em sua 366ª Reunião Ordinária realizada em 13/05/2013, recebeu a proposta para Criação de um Biorrepositório denominado, "BANCO DE AMOSTRAS TUMORAIS E DNA DE PACIENTES COM DOENÇAS ENDÓCRINAS" e o enquadrado na categoria: **APROVADO**, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico.

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

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

De acordo com a Resolução CNS nº 441, de 12 de maio de 2011, o prazo de armazenamento de material biológico humano em Biorrepositório deve estar de acordo com o cronograma da pesquisa, e pode ser autorizado por até dez anos.

Atenciosamente.

DR.ª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Com cópia para:

PROF.DR. SONIR ROBERTO RAUBER ANTONINI
Depto. de Puericultura e Pediatria

Ilustríssima Senhora

PROF.ª. DR.ª. MARGARET DE CASTRO
Depto. de Clínica Médica

Campus Universitário - Monte Alegre
14046-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
(016) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

Anexo 4 - Ofício de aprovação da utilização de amostras tumorais do Centro Infantil Boldrini.

Ofício CEP 07/2012
Em 06/09/2012
Registro CEP: 07/10

I – IDENTIFICAÇÃO

PROJETO: “Estudo de Genes candidatos a Marcadores Moleculares e Micrornas (MIRNAS) em Tumores Adrenocorticais de crianças e adultos”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL NO CENTRO INFANTIL BOLDRINI: José Andrés Yunes
CAAE: 0005.0.144.000-10

INSTITUIÇÃO: Centro Infantil de Investigações Hematológicas Dr. Domingos A. Boldrini

II - CONSIDERAÇÕES DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (CEP/Boldrini), atendendo a todos os dispositivos das Resoluções CNS 196/96 e complementares, aprovou a solicitação de Dispensa de novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para avaliação da expressão dos genes P63, DEK, DAX1, SF1, PRKAR1A, GR α e β e genes relacionados à via Sonic Hedgehog, e também na expressão dos marcadores de células-tronco/progenitoras adrenais STAT3, OCT4, NANOG e SOX2 nos tumores adrenocorticais. Desde que o objetivo das análises seja correlacionar os achados de expressão gênica com alterações na via WNT/Beta-Catenina, a expressão diferencial de miRNAs e com as características clínicas da doença. As amostras deverão ser as mesmas que constituíram o projeto. Com isso, nenhum procedimento adicional de coleta de material biológico deverá ser realizado.

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/BOLDRINI em 06 de Setembro de 2012.

Prof. Dr. Sérgio Santos Mühlen
Coordenador do CEP/BOLDRINI

Util. Públ. Municipal Lei nº 4967
Util. Públ. Estadual Dec. nº 22.018
Util. Públ. Federal Dec. nº 88.747
Registro no CNSS nº 23.002.000.591/84-0
Inscr. Estadual - Isento
CNPJ: 50.046.887/0001-27

Rua Dr. Gabriel Porto, 1270 - Cid. Universitária - Campinas SP
Cep: 13083-210 | Tel.: (55 19) 3787-5000
www.boldrini.org.br

Anexo 5 - Características clínicas, patológicas, moleculares e desfechos em TAC pediátricos.

ID	Sexo	Idade (anos)	Apresentação Clínica	Estágio Tumoral	Recorrência/ Metástase	Modalidade de Tratamento	Mutação p.R337H P53	Mutação β -catenin	Sobrevida Total (meses)	Morte
1	F	1,5	M	III	Não	CQ	Sim	Não	4,5	PS
2 ^{IHC}	F	1,9	M	I	Não	C	Sim	Não	103,9	Não
3 ^{IHC}	F	0,4	M	I	Não	C	Sim	Não	100,3	Não
4 ^{IHC}	M	3,0	M	I	Sim	CQ	Sim	Não	113,7	Não
5 ^{IHC}	M	2,8	V	IV	Sim	CQ	Sim	S45P	4,9	Sim
6 ^{IHC}	F	15,0	M	IV	Sim	CQ	Sim	Não	9,8	Sim
7 ^{IHC}	F	0,4	M	I	Não	C	Sim	Não	210,2	Não
8 ^{IHC}	F	1,7	M	I	Não	C	Sim	Não	12,5	PS
9 ^{IHC}	M	6,8	M	I	Sim	CQ	Sim	Não	7,7	Sim
10	F	11,6	C	II	Sim	CQ	Não	S45P	212,1	Não
11 ^{IHC}	F	1,8	V	I	Não	C	Sim	Não	67,9	PS
12 ^{IHC}	M	0,9	V	I	Não	C	Sim	Não	157,8	Não
13	M	1,7	M	I	Sim	CQ	Sim	Não	155,9	PS
14 ^{IHC}	F	1,3	M	I	N	C	Sim	Não	169,4	Não
15 ^{IHC}	F	3,0	M	I	Não	C	Sim	Não	92,4	PS
16 ^{IHC}	F	7,0	M	III	Sim	CQ	Sim	Não	16,8	PS
17	F	7,8	M	IV	Sim	C	Sim	Não	19,9	Sim
18 ^{IHC}	M	0,9	M	I	Não	C	Não	Não	182,9	Não
19	F	7,1	M	I	Não	C	Não	Não	181,9	Não
20	F	2,4	V	III	Não	CQ	Sim	Não	190,5	Não
21 ^{IHC}	M	15,5	M	IV	Sim	CQ	Sim	S37C	9,3	Sim
22 ^{IHC}	F	1,8	M	III	Não	C	Sim	Não	17,2	PS
23 ^{IHC}	F	12,3	M	I	Não	C	Não	Não	113,5	Não
24 ^{IHC}	F	3,3	V	I	Não	C	Não	Não	87,6	Não
25	F	8,3	M	IV	Sim	C	Sim	Não	23,3	Sim
26	M	2,3	M	I	Não	C	Sim	Não	230,1	Não
27	M	2,8	M	I	Não	C	Sim	Não	145,8	Não
28 ^{IHC}	F	5,5	M	IV	Sim	CQ	Sim	Não	15,5	Sim
29	F	1,4	M	I	Não	C	Sim	S37C	58,1	Não
30 ^{IHC}	F	2,8	M	I	Não	C	Sim	Não	56,7	Não
31 ^{IHC}	M	0,8	M	I	Não	C	Sim	S37C	100,4	Não
32 ^{IHC}	F	0,8	V	I	Não	C	Sim	Não	51,6	Não
33 ^{IHC}	F	1,5	V	III	Não	CQ	Sim	Não	50,4	Não
34 ^{IHC}	F	4,8	M	I	Não	C	Não	Não	41,8	Não
35 ^{IHC}	F	1,9	M	I	Não	CQ	Sim	Não	42,9	Não
36 ^{IHC}	F	1,7	M	I	Não	C	Sim	S45P	26,2	Não
37 ^{IHC}	F	1,2	M	I	Não	C	Sim	Não	24,4	Não
38	M	1,1	V	III	Não	CQ	Sim	ND	174,4	Não
39 ^{IHC}	F	9,1	V	I	Não	C	Não	ND	9,1	Não
40 ^{IHC}	F	13,0	M	I	Não	C	Não	ND	9,7	Não
41 ^{IHC}	F	6,5	M	I	Sim	CQ	Sim	Não	26,9	Sim
42	M	1,8	NS	IV	ND	ND	Não	Não	75,8	Não
43	F	1,4	V	II	ND	ND	Sim	Não	69,8	Não
44	F	0,8	V	I	ND	ND	Sim	Não	51,7	Não
45	F	15,6	V	II	ND	ND	Não	Não	75,8	Não
46	F	1,4	V	I	ND	ND	Sim	Não	116,2	Não
47	F	3,7	V	I	ND	ND	Sim	Não	110,4	Não
48	F	1,3	V	I	ND	ND	Sim	Não	30,6	Não
49	F	3,2	M	I	ND	ND	Sim	Não	9,8	Não

ID, identificação; IHC, amostras de imunoistoquímica do HCFMRP; F, feminino; M, masculino; V, tumor secretor de androgênios (virilizante); C, tumor secretor de cortisol; M, secretor tanto de androgênios quanto de cortisol (misto); NS, tumor não secretor; C, cirurgia; CQ, cirurgia + quimioterapia; PS, perda de seguimento; ND, não disponível.

Anexo 5 - Características clínicas, patológicas, moleculares e desfechos em TAC pediátricos.
(continuação)

ID	Sexo	Idade (anos)	Apresentação Clínica	Estágio Tumoral	Recorrência/ Metástase	Modalidade de Tratamento	Mutação p.R337H P53	Mutação β -catenin	Sobrevida Total (meses)	Morte
50	F	1,6	V	III	ND	ND	Sim	Não	49,6	Não
51	F	1,0	V	I	ND	ND	Sim	Não	29,3	Não
52	F	0,8	V	I	ND	ND	Sim	Não	57,3	Não
53	F	1,3	V	III	Não	C	Sim	Não	17	Não
54	F	9,0	M	II	ND	ND	Sim	Não	9,9	Sim
55	F	2,4	V	I	Sim	ND	Sim	S33F	15,7	Sim
56	M	1,0	V	II	ND	ND	Sim	Não	16	Não
57	M	4,3	V	III	Não	ND	Sim	Não	57,6	Não
58	F	1,1	V	I	ND	ND	Sim	Não	54,2	Não
59	F	1,1	V	III	ND	ND	Sim	Não	13	Não
60	F	2,4	V	I	ND	ND	Sim	Não	51,4	Não
61	M	0,4	V	I	ND	ND	Sim	Não	76,9	Não
62	F	1,2	V	II	ND	ND	Não	Não	86,5	Não
63	F	1,4	V	I	ND	ND	Sim	S45F	37,5	Não
64	F	1,3	NS	I	ND	ND	Sim	Não	19,4	Não
65	F	1,8	M	I	ND	ND	Sim	Não	7,7	Não
66	M	1,1	V	IV	ND	ND	Sim	Não	168,4	Não
67	F	1,0	V	I	ND	ND	Sim	Não	66,9	Não
68	F	2,1	V	I	ND	ND	Sim	Não	42,6	Não
69	F	1,6	V	III	ND	ND	Sim	S37P	7,6	Sim
70	F	1,5	V	I	Sim	ND	Sim	Não	97	Não
71	F	7,7	V	II	ND	ND	Sim	Não	35,7	Não
72 <i>IHC</i>	F	0,8	V	I	Não	C	Sim	ND	116,8	Não
73 <i>IHC</i>	F	2,4	V	I	Não	C	Sim	ND	51,4	Não
74 <i>IHC</i>	F	1,0	V	I	Não	C	Sim	ND	121,7	Não
75 <i>IHC</i>	F	1,3	M	II	Não	C	Sim	ND	0,3	Sim
76 <i>IHC</i>	F	15,6	V	II	Não	C	Não	ND	122,0	Não
77 <i>IHC</i>	F	1,5	V	I	Sim	C	Sim	ND	150,0	Não
78 <i>IHC</i>	F	7,7	V	II	Não	C	Sim	ND	64,1	Não
79 <i>IHC</i>	F	2,4	M	III	Não	CQ	Sim	ND	106,3	Não
80 <i>IHC</i>	F	1,1	V	II	Não	C	Não	ND	151,5	Não
81 <i>IHC</i>	F	1,3	V	I	Não	C	Sim	ND	82,4	Não
82 <i>IHC</i>	F	1,0	V	I	Não	C	Sim	ND	85,6	Não
83 <i>IHC</i>	F	5,3	V	I	Não	C	Sim	ND	153,0	Não
84 <i>IHC</i>	F	1,4	V	I	Não	C	Sim	ND	173,9	Não
85 <i>IHC</i>	F	3,2	V	I	Não	C	Sim	ND	70,2	Não
86 <i>IHC</i>	F	1,1	V	I	Não	C	Sim	ND	114,6	Não
87 <i>IHC</i>	F	1,3	V	III	Não	CQ	Sim	ND	60,2	Não
88 <i>IHC</i>	F	1,6	M	IV	Sim	CQ	Sim	ND	8,0	Sim
89 <i>IHC</i>	F	1,5	M	II	Não	C	Sim	ND	133,8	Não
90 <i>IHC</i>	F	0,8	V	I	Não	C	Sim	ND	115,8	Não
91 <i>IHC</i>	F	1,3	NS	I	Não	C	Sim	ND	80,7	Não
92 <i>IHC</i>	M	0,4	M	I	Não	C	Sim	ND	128,7	Não
93 <i>IHC</i>	M	1,0	V	II	Não	C	Sim	ND	67,8	Não
94 <i>IHC</i>	F	9,2	M	II	Sim	CQ	Sim	ND	10,0	Sim
95 <i>IHC</i>	F	2,4	V	I	Sim	C	Sim	ND	16,0	Sim
96 <i>IHC</i>	F	1,4	M	I	Não	C	Sim	ND	94,7	Não

ID, identificação; *IHC*, amostras de imunoistoquímica do Centro Infantil Boldrini; F, feminino; M, masculino; V, tumor secretor de androgênios (virilizante); C, tumor secretor de cortisol; M, secretor tanto de androgênios quanto de cortisol (misto); NS, tumor não secretor; C, cirurgia; CQ, cirurgia + quimioterapia; PS, perda de seguimento; ND, não disponível.

Anexo 5.1 - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por imunoistoquímica.

Dados Clínicos de TAC Pediátricos						
Gênero	Masculino	HCFMRP C.I. Boldrini		7 (23%) 2 (8%)	9 (16%)	
	Feminino	HCFMRP C.I. Boldrini		23 (77%) 23 (92%)	46 (84%)	
Óbitos	Vivos	HCFMRP C.I. Boldrini		20 21	41 (75%)	
	Mortos	HCFMRP C.I. Boldrini		5 4	9 (16%)	
	Desconhecido*	HCFMRP C.I. Boldrini		5 0	5 (9%)	
Idade ao Diagnóstico (anos)	Mediana	HCFMRP C.I. Boldrini		2,3 1,4	1,7	
	Média	HCFMRP C.I. Boldrini		4,3 2,7	3,6	
	Mínima; Máxima	HCFMRP C.I. Boldrini		0,4; 15,5 0,4; 15,6	0,4; 15,6	
Escore de Weiss	0	HCFMRP C.I. Boldrini		2 (7%) 0	2 (4%)	
	1	HCFMRP C.I. Boldrini		2 (7%) 0	2 (4%)	
	2	HCFMRP C.I. Boldrini		1 (3%) 0	1 (2%)	
	3	HCFMRP C.I. Boldrini		1 (3%) 1 (4%)	2 (4%)	
	4	HCFMRP C.I. Boldrini		10 (33%) 1 (4%)	11 (20%)	
	5	HCFMRP C.I. Boldrini		1 (3%) 4 (16%)	5 (9%)	
	6	HCFMRP C.I. Boldrini		3 (10%) 10 (40%)	13 (24%)	
	7	HCFMRP C.I. Boldrini		5 (17%) 3 (12%)	8 (14%)	
	8	HCFMRP C.I. Boldrini		4 (14%) 3 (12%)	7 (12%)	
	9	HCFMRP C.I. Boldrini		1 (3%) 3 (12%)	4 (7%)	
Mortes >5 anos sobrevida						
Estadiamento Tumoral (Sandrini)	Estágio I	HCFMRP C.I. Boldrini	1 (4%) 1 (7%)	12 (52%) 13 (87%)	23 (77%) 15 (60%)	38 (69%)
	Estágio II	HCFMRP C.I. Boldrini	0 2 (28%)	0 5 (71%)	0 7 (28%)	7 (13%)
	Estágio III	HCFMRP C.I. Boldrini	0 0	0 2 (100%)	3 (10%) 2 (8%)	5 (9%)
	Estágio IV	HCFMRP C.I. Boldrini	4 (100%) 1 (100%)	0 0	4 (13%) 1 (4%)	5 (9%)
Recidiva e/ou Metástase	Sim	HCFMRP C.I. Boldrini		7 (23%) 4 (16%)	11 (20%)	
	Não	HCFMRP C.I. Boldrini		19 (63%) 21 (84%)	39 (73%)	
	Desconhecido*	HCFMRP C.I. Boldrini		4 (14%) 0	4 (7%)	

* Perda de seguimento

Anexo 5.1 - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por imunoistoquímica. (continuação)

Quimioterapia	Sim	HCFMRP	2 (7%)	4 (7%)
		C.I. Boldrini	2 (8%)	
	Não	HCFMRP	24 (79%)	47 (86%)
		C.I. Boldrini	23 (92%)	
	Desconhecido*	HCFMRP	4 (14%)	4 (7%)
		C.I. Boldrini	0	
Tratamento cirúrgico	Sim		55	100%
	Não		0	-
		Feminino	Masculino	
Secreção Hormonal	Virilizante	HCFMRP	5 (22%)	2 (28%)
		C.I. Boldrini	16 (69%)	1 (50%)
	Cushing	HCFMRP	0	0
		C.I. Boldrini	0	0
	Misto (Virilizante + Cushing)**	HCFMRP	18 (88%)	5 (72%)
		C.I. Boldrini	6 (27%)	1 (50%)
	Não funcionante	HCFMRP	0	0
		C.I. Boldrini	1 (4%)	0

* Perda de seguimento; ** Cushing clínico ou subclínico.

Anexo 5.2 - Resumo dos dados clínicos dos 55 pacientes pediátricos com TAC avaliados por MLPA.

Dados Clínicos de TAC Pediátricos					
Gênero	Masculino		4	28,6%	
	Feminino		10	71,4%	
Óbitos	Vivos		8	57%	
	Mortos		3	21,5%	
	Desconhecido*		3	21,5%	
Idade ao Diagnóstico (anos)	Mediana		2,8		
	Média		4,5		
	Mínima; Máxima		0,4; 15,5		
Escore de Weiss	0		0	-	
	1		1	7,1%	
	2		0	-	
	3		0	-	
	4		3	21,5%	
	5		0	-	
	6		3	21,5%	
	7		4	28,5%	
	8		2	14,3%	
	9		1	7,1%	
		Mortes	>5 anos sobrevida		
Estadiamento Tumoral (Sandrini)	Estágio I	1 (10%)	4 (40%)	10	71,4%
	Estágio II	-	-	0	-
	Estágio III	0	1 (50%)	2	14,3%
	Estágio IV	2 (100%)	0	2	14,3%
Recidiva e/ou Metástase	Sim			6	42,85%
	Não			6	42,85%
	Desconhecido*			2	14,3%
Quimioterapia	Sim			8	57,15%
	Não			6	42,85%
Tratamento cirúrgico	Sim			100	100%
	Não			0	-
		Feminino	Masculino		
Secreção Hormonal	Virilizante	2	1	3	21,5%
	Cushing	0	0	0	-
	Misto (Virilizante + Cushing)**	8	3	11	78,5%
	Não funcionante	0	0	0	-

* Perda de seguimento; ** Cushing clínico ou subclínico.

Anexo 6 - Características clínicas, patológicas, moleculares e desfechos em TAC adultos.

ID	Sexo	Idade (anos)	Apresentação Clínica	Estágio Tumoral	Recorrência/ Metástase	Modalidade de Tratamento	Mutação p.R337H P53	Mutação β -catenin	Sobrevida Total (meses)	Morte
1 ^{IHC}	F	28	C	II	Não	C	Não	Não	96,7	Não
2 ^{IHC}	F	55	C	II	Não	C	Não	S45P	97,7	Não
3 ^{IHC}	F	53	C	II	Não	C	Não	P.S45_ G50del	66,1	Não
4 ^{IHC}	F	35	NS	II	Não	C	Não	Não	58,1	Não
5 ^{IHC}	M	43	M	IV	Sim	C	Não	Não	0,3	Sim
6	F	46	M	IV	Sim	CQ	Não	T41A	142,3	Não
7 ^{IHC}	F	39	V	I	Não	C	Sim	S37C/S4 5P	72,4	Não
8 ^{IHC}	F	29	M	I	Não	C	Não	Não	83,1	Não
9 ^{IHC}	F	27	M	II	Sim	CQ	Sim	S45F	17,3	Sim
10 ^{IHC}	F	21	C	I	Não	C	Não	Não	64,2	Não
11	F	42	M	IV	Sim	CQ	Não	S45P	45,1	Não
12 ^{IHC}	M	56	M	IV	Sim	CQ	Não	ND	27,4	Sim
13 ^{IHC}	F	22	V	III	Não	CQ	Sim	Não	21,6	Não
14 ^{IHC}	F	59	C	I	Não	C	Não	S45P	31,1	Não
15 ^{IHC}	F	55	M	II	Não	CQ	Não	Não	23,1	Não
16 ^{IHC}	F	66	C	I	Não	C	Sim	ND	40,6	Não
17 ^{IHC}	F	37	NS	I	Não	C	Não	ND	22,7	PS
18 ^{IHC}	F	55	C	I	Não	C	Não	ND	26,6	Não

ID, identificação; IHC, imunoistoquímica; F, feminino; M, masculino; V, tumor secretor de androgênios (virilizante); C, tumor secretor de cortisol; M, secretor tanto de androgênios quanto de cortisol (misto); NS, tumor não secretor; C, cirurgia; CQ, cirurgia + quimioterapia; PS, perda de seguimento; ND, não disponível.

Anexo 7 - Tabela de características das amostras de adrenal fetal e pós-natal.

ID	Sexo	Idade Gestacional	Idade Cronológica	Causa Mortis
1	M	22 semanas 5 dias	-	Corioamnionite
2	F	22 semanas	-	Prematuridade
3	M	22 semanas 2 dias	-	Anóxia/ prematuridade
4	F	25 semanas	-	Síndrome de Membranas Hialinas
5	M	21 semanas	-	Anóxia
6	F	25 semanas	-	Anóxia/ pré-eclâmpsia
7	M	22 semanas	-	Anóxia intra-útero/ corioaminionite
8	M	22 semanas	-	Anóxia intra-útero
9	M	24 semanas	-	Prematuridade/ Fôrame Oval Pérvio
10	M	21 semanas 4 dias	-	Anóxia/ pé torto/ hipoplasia de quadril
11	M	21 semanas 4 dias	-	Anóxia/ pé torto/ hipoplasia
12	M	21 semanas	-	Anóxia
13	F	24 semanas 4 dias	-	Sofrimento fetal
14	M	21 semanas 2 dias	-	Prematuridade
15	M	29 semanas	-	Hérnia diafragmática
16	F	28 semanas 1 dia	-	Pneumonia/ anóxia
17	F	30 semanas 1 dia	-	Anóxia/ gemelar
18	M	27 semanas	-	Anóxia
19	F	29 semanas	-	
20	F	26 semanas	-	Prematuridade/ amniorrexe
21	F	26 semanas 1 dia	-	Prematuridade
22	M	29 semanas 6 dias	-	Choque/ pneumonia
23	F	35 semanas	-	Anóxia Intrauterina
24	M	35 semanas	-	Descolamento Prematuro de Placenta
25	M	35 semanas 1 dia	-	Sepse/ Amniorrexe
26	M	37 semanas	-	Hérnia diafragmática/ hipoplasia pulmonar
27	M	36 semanas 3 dias	-	Anóxia Intrauterina
28	F	37 semanas	-	Descolamento Prematuro de Placenta
29	F	37 semanas	-	Anóxia/ pneumonia
30	M	34 semanas	-	Anóxia
31	F	-	4 dias	Cardiopatía/ anóxia
32	F	-	57 dias	Cardiopatía
33	M	-	38 dias	Cardiopatía/ macroglossia
34	M	-	1 ano	Choque Séptico
35	F	-	5 meses	Sepse pós cirúrgica
36	M	-	3,5 anos	RDNPM/ encefalite
37	M	-	3 meses	Choque séptico
38	M	-	5 meses	Cardiopatía/choque
39	M	-	4 meses	Pós-operatório de correção de cardiopatía
40	F	-	11 dias	Cardiopatía/ meningite
41	M	-	2 anos	Pós-operatório cirúrgico
42	M	-	8 dias	Insuficiência Cardíaca/ Cardiopatía
43	F	-	1 mês	Atresia jejunal/ Broncopneumonia
44	F	-	10 anos	Pós-operatório de correção de cardiopatía

ID, identificação; F, feminino; M, masculino; RDNPM, Retardo do desenvolvimento neuropsicomotor.

Anexo 8 - Tabela de características das amostras de adrenal normais de adultos e crianças.

ID	Sexo	Idade	Dados clínicos	Causa Mortis
167/09	F	51	Trombose venosa profunda, úlcera sacrococcígea infectada, colostomia fístula sacral, estado toxinfeciosa, desnutrição crônica.	Tromboembolia pulmonar.
218/09	M	41	Etilismo, desnutrição, hipertrofia de ventrículo esquerdo.	Pulmões em choque, pancreatite aguda.
456/09	M	54	Colocação de stent na artéria descendente anterior por angioplastia, aterosclerose coronariana grave, cardiopatia hipertensiva, edema pulmonar, nefrosclerose benigna.	Infarto agudo do miocárdio.
468/09	M	49	Etilismo.	Edema agudo pulmonar, causa indeterminada.
490/09	M	48	Miocardipatia dilatada, (segundo informações clínicas: etilismo crônico).	Edema agudo pulmonar.
492/09	M	54	Aterosclerose coronariana, cardiopatia hipertensiva, nefrosclerose benigna.	Infarto agudo do miocárdio.
559/09	M	44	Obesidade.	Edema e hemorragia aguda pulmonar, hemorragia aguda gástrica da mucosa, cardiopatia hipertensiva descompensada, pancreatite aguda necrohemorrágica, edema cerebral.
584/09	M	36	Congestão passiva crônica, cardiomiopatia crônica dilatada, hidrotorax bilateral, ascite.	Edema agudo pulmonar, insuficiência cardíaca congestiva.
661/09	F	48	Neuropatia de causa indeterminada, cardiopatia hipertensiva, nefrosclerose benigna, desnutrição crônica.	Broncopneumonia aspirativa, broncoaspiração de conteúdo gástrico.
703/09	M	45	Broncoespasmo grave, bronquite crônica, cardiopatia hipertensiva.	Morte súbita.
2200	AP			
2185	MRGS			
2219	MFG			
2232	LES			
2233	RAJ	75		Parada Cardiorrespiratória (???)
348		0,01		
2209		0,04		
5	F	0,1	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
33	F	2,0	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
35	F	3,6	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
36	F	0,4	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
37	M	5,3	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
40	F	2,3	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
41	F	4,2	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
43	M	2,2	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX
45	F	4,7	Operado por Tumor de Wilms	XXXXXXXXXX

ID, identificação; F, feminino; M, masculino.

EXPERT
REVIEWS

Pediatric adrenocortical tumors: diagnosis, management and advancements in the understanding of the genetic basis and therapeutic implications

Expert Rev. Endocrinol. Metab. 9(5), 445–464 (2014)

**Sonir R Antonini*,
Letícia F Leal and
Marcelo M Cavalcanti**

*Department of Pediatrics, Ribeirão Preto
Medical-School – University of São
Paulo, São Paulo, Brazil*

**Author for correspondence:
antonini@fmrp.usp.br*

Adrenocortical tumors (ACTs) may be sporadic or related to inherited genetic syndromes. Uncovering the molecular defects underlying these genetic syndromes has revealed key signaling pathways involved in adrenocortical tumorigenesis. Although the understanding of ACT biology has improved, to date, very few potential prognostic molecular markers of childhood ACTs have been identified. In this review, we summarize the current knowledge of the epidemiology, clinical presentation, diagnosis, prognosis and treatment options for pediatric patients with ACTs. A review of the genetic basis of adrenocortical tumorigenesis is presented, focusing on the main molecular abnormalities involved in the tumorigenic process and potential novel therapy targets that have been generated, or are being generated, with the discovery of these molecular defects.

KEYWORDS: adrenocortical tumor • childhood • molecular genetics

Pediatric adrenocortical tumors (ACTs) are primary masses of the adrenal cortex, generally diagnosed by clinical manifestations linked to hormone excess and less frequently by abdominal or an incidentally discovered mass. These tumors present varied behaviors in terms of progression and they likely result from complex molecular abnormalities, which are still largely unknown. Over the past two decades, significant progress has been achieved in the identification of the molecular mechanisms involved in adrenal tumorigenesis, but there are still many unanswered questions.

Childhood and adult ACTs may present with similar clinical manifestations, but they differ regarding the correlation between histopathological features and clinical outcomes. Even in the presence of similar histopathological

features, the survival rate is higher in children with ACT than in adults with adrenocortical carcinoma (ACC) [1,2]. Incidentally discovered ACTs and aldosterone-producing adenomas, which are frequent in adult patients [3], are rare in children and will not be thoroughly discussed here.

In agreement with these findings, evidence suggests many differences between children and adults in the molecular mechanisms involved in this disease. Microarray studies, most of them performed in adult ACTs, have considerably contributed to a better understanding of ACT pathogenesis [4–16]. However, to date, no clinical relevant prognostic molecular markers have been identified in childhood ACTs [17].

In this work, we will briefly review the most significant epidemiological and clinical

Figure 1. Hormone profiles of 62 consecutive pediatric patients with adrenocortical tumors [20].

features of pediatric ACTs. In the second section, we will concentrate on what is already known about the molecular abnormalities involved in the tumorigenic process and the potential therapy targets that have been, or are being, generated with the discovery of these molecular defects.

For clarity, in the present text the terms ACC and adrenocortical adenoma (ACA) are applied to adult patients, in which the histology differentiates carcinoma from adenoma. For pediatric patients, only the term ACT is used. For these patients, where appropriated, the term metastatic ACT is also applied.

Epidemiology

Benign ACTs are quite frequent in humans. The prevalence of adrenal adenomas or adrenal hyperplasia reaches up to 7.3% in

autopsy series. On the other hand, ACCs are rare and account for approximately 0.02% of all cancers reported worldwide [18]. ACTs have a bimodal incidence peak, commonly occurring in the first 5 years of life and between the 40th and 50th decades of life. They affect more women than men in any age group [18,19]. In our series of 62 pediatric patients, the median and mean of the age at diagnosis were 1.8 and 3.4 ± 2.7 (0.4–15.5) years, respectively [20].

Childhood ACTs are rare and account for about 0.2% of all pediatric malignancies [1,21]. However, the incidence of these tumors in southeast and southern Brazil is 10–15-times higher than in the rest of the world. In this region, the higher incidence of ACTs is linked to a low penetrance germline *TP53* mutation (R337H) [22–25].

Clinical features

A clinical syndrome resulting from excessive hormone secretion of the adrenal cortex is the most frequent clinical manifestation of ACTs in children. Childhood ACTs are more often functional than not [26]. Less frequently, there may be signs of the abdominal mass. In our experience, over 95% of these tumors are hormone secreting (FIGURE 1) [20]. The majority of childhood ACTs present with signs of isolated virilization (FIGURE 2A) or mixed virilizing and features of Cushing's syndrome (FIGURE 2B). Isolated hypercortisolism is rare in pediatric ACT patients; however, in our series of patients, we found subclinical hypercortisolism in 10% of those with apparently isolated signs of androgen excess [20]. For this reason, we recommend a dexamethasone suppression test (DST) in all pediatric patients with a provisional diagnosis of ACT to detect tumor cortisol secretion, as detailed below.

Hypertension has been reported in all kinds of functioning or nonfunctioning ACTs [27–30]. In functioning tumors, the most common excess profile causing hypertension was hypercortisolism. Aldosterone-secreting ACTs are very rare in children. In other types of functioning or nonfunctioning ACTs, the hypertension might be caused by tumor compression of the renal artery [27,28].

Feminization due to estrogen excess is very rare in childhood ACTs [19]. Other unusual manifestations of ACT in pediatric patients include hypoglycemia, insulin resistance not related to the secretion of glucocorticoids and polycythemia [31].

Diagnosis

Laboratory evaluation

A comprehensive laboratory evaluation is indicated in pediatric patients presenting with clinical signs of ACT. Basal plasma androgen levels need to be assessed, including dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), androstenedione, testosterone as well as the precursor 17 α -hydroxyprogesterone (17OHP). Pediatric ACTs may secrete variable amounts of 17OHP, making it necessary to rule out the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in some patients. In these cases, the 3–5 day DST (0.5 mg q.i.d. or 1 mg/m² in four divided doses) has been used [32]. However, it is important to avoid significant delay in performing surgery in

Figure 2. Clinical images. (A) A 1.7-year-old girl presenting with precocious pubarche and virilization caused by an androgen-secreting adrenocortical tumor and (B) a 6-year-old boy with a mixed cortisol and androgen-secreting adrenocortical tumor presenting with precocious pubarche, virilization and Cushing's syndrome.

ACT patients submitted to this functional test. In FIGURE 3, we present a flowchart showing our routine.

In addition, because pediatric ACTs may secrete estradiol, with or without clinical manifestation [30], plasma estradiol should be assessed. High estradiol plasma levels have been related to malignancy in adult males with ACTs, but no evidence has suggested the same in the pediatric counterparts [33–35].

In the presence of hypertension or hypokalemia, aldosterone levels and plasma renin activity should be measured [36–39]. Twenty-four-hour urine metanephrines and catecholamines should be measured in patients with clinical characteristics of pheochromocytoma.

In patients presenting with clinical signs of Cushing's syndrome, plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and cortisol secretion should be assessed. Hypercortisolism can be evaluated with a 1 mg (20 mcg/kg in children) DST, late night salivary cortisol (LNSC) levels or at least two measurements of urinary free cortisol (UFC) [40–43]. The combination of LNSC and post-1 mg (20 mcg/kg in children) DST morning salivary cortisol is very useful for hypercortisolism screening in children [44]. However, patients with hypercortisolism due to adrenal masses do not usually have consistently elevated UFC and LNSC levels. In such conditions, 1 mg DST is preferable to UFC and LNSC [42]. We routinely assess tumor cortisol secretion in all patients, even in the absence of overt Cushing's syndrome, because subclinical hypercortisolism is found in 10–15% of patients with apparently isolated signs of androgen excess. In patients with autonomous cortisol excess, with or without overt Cushing's syndrome, preoperative corticosteroid replacement is needed to prevent adrenal crisis [34,45]. On the other hand, no corticosteroid replacement is needed in patients without autonomous cortisol excess. Instead of performing hypercortisolism screening, some centers recommend preoperative and postoperative corticosteroid replacement for all patients.

Apparent nonfunctional adrenal tumors are very rare in children and adolescents. The finding of a clinically detectable adrenal mass or, less frequently, an adrenal incidentaloma in young patients indicates the need to perform a laboratory investigation, as mentioned above.

Some current guidelines for the laboratory investigation of a child suspected to have ACT recommend performing an extensive list of measurements, including evaluation of 'renin, aldosterone, androstenedione DHEAS, 17OHP, 11-deoxycortisol, ACTH, cortisol, glucose, testosterone, estradiol, thyroid

Figure 3. Basic biochemical evaluation of a child under investigation of adrenocortical tumor: proposed flowchart.

†Only in the case of hypertension.

‡Dexamethasone suppression test: overnight 20 µg/kg (1 mg in adults) or 3–5 days 1 mg/m²/day divided in four doses.

17-OHP: 17 hydroxyprogesterone; ACT: Adrenocortical tumor; DHEAS: Dehydroepiandrosterone; PRA: Plasma renin activity.

function, calcium, 24 h UFC, 24 h urinary steroid profile (mass spectrometry) and 24-h urine metanephrins and catecholamine, to exclude pheochromocytoma' [39]. We do not think that performing all of these measurements is always necessary. Certain tests should be performed only in selected cases, in which they could be useful in the diagnosis, treatment or follow-up. An example is testing 24-h urine metanephrins only when clinical and imaging suggests pheochromocytoma. However, measurement of a comprehensive panel of steroids based on gas chromatography/mass spectrometry in a 24-h urine sample may prove to be helpful. Recent studies have demonstrated that steroid profiles reveal a predominantly immature pattern of steroidogenesis in early stages of ACC in adult patients [46]; however, this investigation has not yet been tested in children with ACTs.

Imaging

Bone age has been suggested to indicate the impact of androgen excess in skeletal growth and to estimate potential final height impairment. In a large cohort of pediatric patients with ACT, bone age was found to be advanced by more than 1 year in 68% of patients. In most cases, the initial predicted adult height was smaller than the target height; however, the final predicted adult height did not differ from the target height [47].

Figure 4. Imaging evaluation in a pediatric patient with adrenocortical tumor. (A) Post-contrast axial CT image, (B) sagittal CT reconstruction, and (C) volumetric rendering coronal CT reconstruction, showing a large right adrenal mass (arrows), measuring 5.0 × 4.0 × 5.0 cm, with heterogeneous enhancement, irregular calcification foci (arrowhead) and with no signs of invasion of adjacent organs. Further imaging evaluation showed no distant metastases (not shown).

MRI, computed tomography (CT), and, more recently, positron emission tomography (PET) using 18-fluorodeoxyglucose have been the most indicated exams attempting to distinguish between ACC and ACA in adult patients [48,49]. In children, it is not, as of yet, possible to radiologically distinguish between malignant and benign ACTs, unless there is evidence of invasion, metastasis or venous spread [50]. Imaging exams in pediatric ACTs are helpful in determining the precise location and staging of the tumor, guiding the surgical planning and chemotherapy decisions.

CT allows the evaluation of important aspects of the tumor, such as size, homogeneity, presence of calcifications, areas of necrosis and local invasion (Figure 4). In adults, ACCs tend to be greater than 5 cm, have irregular borders, heterogeneously capture the contrast and invade neighboring structures, whereas ACAs are generally smaller than 3 cm, with regular borders and capture the contrast homogeneously [51]. In adult patients, a basal coefficient of attenuation of less than 10 Hounsfield Units (HU) and less than 30–40 HU at 15 min after contrast with an absolute percentage washout above 60% suggest adenoma [52–54]. Further assessment can be done with MRI, particularly using chemical shift sequences. As suggested, chemical shift sequences might be helpful in identifying a small group of ACAs with reduced intracellular lipid content (therefore >10 HU on CT) [53]. MRI also assists in the distinction between benign and malignant by signal strength: lesions with high signal intensity on T2 are suggestive of ACC and low signal T2 suggests ACA. Although these criteria are well established in adults, they may not be applicable in pediatric patients. In addition, contrast-enhanced MRI enables the assessment of retroperitoneal lymph nodes, vascular extension and thrombosis, and invasion of adrenal and renal veins or the inferior vena cava [53].

An increasing number of patients with cancer are now undergoing fluorine 18 fluorodeoxyglucose (F18-FDG) PET

(FDG-PET), which shows the metabolic activity of glucose in tumors. Furthermore, FDG-PET is useful in detecting ACC metastasis [48]. Meanwhile, pheochromocytomas and adrenal metastases also have high F18-FDG uptake and cannot be distinguished from ACCs by FDG-PET. Metomidate tracers, which combine specifically with CYP11B enzymes, may be an alternative functional test to ensure the adrenal cortex origin of a mass [55].

The effectiveness of ultrasound techniques in ACT assessment has not been thoroughly investigated; there is little information about this topic, but it seems useful in the detection of liver metastasis, vascular invasion and thrombosis [50,56]. Although abdominal ultrasound has frequently been used as first-line imaging in the assessment of pediatric patients, when investigating ACTs, the sensitivity and specificity of this method still requires further evaluation.

In our routine investigation of a child with ACT, we first perform abdominal CT or MRI. The latter is preferred to avoid radiation exposure. After the diagnosis of ACT is confirmed, tumor staging is completed with thorax imaging and bone scintigraphy.

Histology

The Weiss system has been the most adopted, worldwide, for the histological assessment and categorization of ACTs. It is based on the recognition of nine morphological features (Box 1) and the presence of three or more criteria correspond to the behavior of a malignant lesion in an adult patient. In children, this system is not accurately applicable in categorizing ACTs, however. Frequently, worrisome histological findings that are associated with malignancy and unfavorable outcome in adult patients behave in a clinically benign manner in pediatric patients with ACT [57].

To differentiate benign from malignant ACTs in pediatric patients, measures such as weight and clinical findings, whether

isolated or in conjunction with histological criteria, have also been proposed [2,58–60]. However, no single histological system can accurately differentiate benign from malignant ACTs in children.

In children, histological characteristics and tumor size may be suggestive of malignant potential, but, except for the detection of ACT metastasis, no single parameter allows the discrimination of benign from malignant ACTs. ACT metastasis generally affects the liver, lungs, kidneys and bones [19]. In our series of patients, at the diagnosis or during the follow-up, the most common affected sites of ACT metastasis were the lungs and the liver, respectively. None of our patients presented with bone metastasis, despite routine bone scintigraphy.

Tumor staging systems

To establish common criteria for the assessment of childhood ACTs, the International Pediatric ACT Registry was created in 1990. Their staging system is presented in TABLE 1 [61]. This system, developed specifically for pediatric ACT patients, was based on the extensive experience accumulated by Professor Romulo Sandrini's group from The Federal University of Parana, Brazil, located in the state of Parana, one of the areas with the highest incidences of these tumors worldwide [47].

Prognosis & current treatment options

The treatment of pediatric ACTs was primarily based on the studies and protocols developed in adult patients. Surgery is considered to be the most effective treatment. A complete surgical resection of the primary tumor, and its metastases, when feasible, is the only therapy that can cure or prolong survival, particularly if the tumor is detected in early stages.

Most reported series have shown that pediatric ACT patients present significantly better prognoses than adult patients [1,2,62]. The mean overall survival in pediatric patients is around 75–80%. Most patients present with early stage disease (I or II). The 5-year overall survival and disease-free survival are higher than 95% in patients with a stage I tumor, between 50 and 70% in stages II and III and around 20% in stage IV (FIGURE 5A). In addition to tumor stage, survival strongly correlates with age at diagnosis. Patients younger than 5 years present with higher survival rates (FIGURE 5B) [20].

Surgery

Pediatric ACTs are friable and have a high rate of tumor rupture and spillage, which are associated with a poor prognosis. Therefore, laparotomy is still the most recommended surgical approach [27,63,64]. Despite this, based on the advantages of laparoscopy over open surgery (shorter hospital stay, faster postoperative recovery and better cosmetic results), some services with experience in laparoscopy surgery have reported good results with this technique in pediatric ACTs [65–67]. The literature regarding laparoscopic outcomes in pediatric ACTs remains scarce and results seem to be limited to personal experience. Consequently, this approach is not generally recommended [27,33,64]. A second surgery may

Box 1. The Weiss scoring system for distinguishing benign from malignant adrenocortical tumors. The presence of more than two criteria correlates with subsequent malignant behavior in adult, but not in pediatric, patients.

Weiss criteria (0–9)

- High nuclear grade
- Mitotic rate greater than 5 per 50 high-power fields
- Atypical mitoses
- Clear cells comprising 25% or less of the tumor
- Diffuse architecture (greater than one-third of the tumor)
- Necrosis
- Invasion of venous structures
- Invasion of sinusoidal structures
- Invasion of capsule of tumor

Adapted with permission from [57] © Elsevier (2009).

be considered in case of local or remote metastases recurrence. At diagnosis and during follow-up, we have performed surgery for metastasis whenever possible, even in patients presenting with more than one metastasis. Patients who have apparently been surgically cured still require rigorous and continuous monitoring [27,68].

Pharmacological treatment

There are few pharmacological treatment options for patients with ACTs in stages III and IV. Regimens with mitotane and chemotherapeutic drugs are often used before (neoadjuvant) or after (adjuvant) tumor resection, either to reduce the tumor size to enable a more complete resection or to prevent or treat recurrence [27,69,70]. Incomplete surgical resection is associated with a poor prognosis [71].

In some cases, hypertension may require management before, and sometimes even for days or weeks after, resection surgery. Angiotensin-converting enzyme inhibitors, solely or

Table 1. Pediatric adrenocortical tumor staging systems according to the IPACTR.

Tumor stage	IPACTR staging system
I	Completely resected, small tumors (<200 cm ³ and <100 g) with normal postoperative hormone levels
II	Completely resected, large tumors (≥100 g or ≥200 cm ³) with normal postoperative hormone levels
III	Unresectable, gross or microscopic residual disease tumor spillage Patients with stage I and II tumors who fail to normalize hormone levels after surgery Patients with retroperitoneal lymph node involvement
IV	Presence of distant metastases
IPACTR: International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. Adapted with permission from [61] © Elsevier (2012).

Figure 5. Overall survival rates in pediatric patients with adrenocortical tumors. (A) According to tumor staging (I–IV) and (B) age at diagnosis (<5 or >5 years).

in association with diuretics, have been reported with good results [27].

Mitotane

Mitotane, an adrenotoxic agent, is a mainstay therapy for invasive and metastatic tumors. Mitotane is a metabolite of the insecticide diclorodifenilicloroetano and has been the most frequently used drug as adjuvant treatment after surgical resection [18,38,72–76]. In animal models, administration of mitotane is able to destroy the adrenals [77] and trigger various enzymatic steps to inhibit adrenal steroidogenesis [78]. The serum mitotane levels needed to maintain therapeutic and nontoxic plasma concentrations are between 14 and 20 mg/l [28,79–81]. Recently, a trial in Germany reported an association between better outcomes and plasma levels ≥ 14 mg/l, as well as mitotane treatment duration ≥ 6 months in children, for whom this drug is indicated [70]. Although, the use of mitotane in children remains controversial, due to low response rates (25–30%) and high toxicity, improvements in the central determination of mitotane plasma levels have increased its acceptance as a first-line therapy in recent years [70,82–85]. The main reported side effects have been gastrointestinal and neurological, including nausea, vomiting, diarrhea and abdominal pain. Less frequent reactions include somnolence, lethargy, ataxic gait, depression and vertigo. Fatal adrenal insufficiency is the most serious documented side effect, making high doses of glucocorticoid and mineralocorticoid replacement mandatory [47,69]. Mitotane use in pediatric patients was also suggested to cause mild developmental delay, stemming from damage to the development of the CNS [83,86]. A confounding factor in mitotane treatment is that it alters steroid hormone metabolism; therefore, serum and urine steroid measurements cannot be used to forecast tumor relapse [47].

Chemotherapy

Little information is available about the efficacy of chemotherapy regimens in pediatric ACTs. The most reportedly used chemotherapeutic drugs are doxorubicin (DOX), cisplatin (CDDP)

and etoposide (ETO) [19,87]. In 2006, Zancanella *et al.* conducted a study in 11 pediatric patients with recurrent and metastatic ACT disease, using mitotane associated with CDDP, ETO and DOX; powdered mitotane was dissolved in a medium chain triglyceride oil to enhance its absorption in the body. Partial tumor remission was observed in five patients and complete remission in two. Of the three patients who survived, one was disease free for 16 months and two had progressive disease [87].

In 2012, a nonrandomized, single-arm German study (GPOH-MET 97 trial) reported data regarding treatment of 60 pediatric patients since 1997. Systemic therapy with vincristine, ifosfamide, DOX, carboplatin and ETO, as well as mitotane therapy, was integrated into a regimen based on surgery, chemotherapy and, in some cases, radiotherapy. Thirty-four of the patients required chemotherapy. Neoadjuvant chemotherapy and mitotane had been administered to 11 primarily inoperable tumors; in eight of these, subsequent surgery became possible, with complete removal of the tumor in five patients. Adjuvant chemotherapy after surgery was given to 20 patients. Salvage chemotherapy for local and distant metastatic recurrence was administered in 16 patients, but eight of these died. However, the impact of chemotherapy was difficult to determine because conducting randomized trials was not feasible and confounding factors had to be considered [70].

In adult patients with stages III and IV ACC, and for those who do not respond to or cannot tolerate the side effects of mitotane, combined chemotherapy may be used, such as CDDP, ETO and DOX, or isolated chemotherapy, such as streptozocin. In general, these schemes have little effectiveness in controlling tumor growth and metastases. A major European and North American multicenter study compared the following chemotherapy regimens in adult patients: ETO + CDDP + DOX + mitotane (EDP-M) with streptozocin + mitotane (Sz-M). The authors found a higher response rate in the EDP-M group than in the Sz-M group (23.2 vs 9.2%) and longer disease-free survival (21×5 months; HR: 0.55), but no difference was discernable in

the overall survival rate between the groups [88]. To date, no such comparative study has been performed in pediatric patients with ACTs.

Recently, Pinto *et al.* established a pediatric malignant ACT xenograft model. The adrenal tumor from an 11-year-old boy with previously untreated metastatic ACT was subcutaneously deployed in immunocompromised CB17 scid ^{-/-} mice. The xenograft maintained the histopathological and molecular features of the primary tumor and was screened for drug responsiveness. Among the usual chemotherapeutic drugs, CDDP had a potent antitumor effect and topotecan significantly inhibited tumor growth. In a child with relapsed ACT, topotecan was used as a single agent and resulted in disease stabilization [89].

Collaboration between the ACT subcommittee of the Children's Oncology Group and Brazilian institutions, based in the IPACR experience, has suggested the ARAR0332 protocol (Treatment of Adrenocortical Tumors with Surgery plus Lymph Node Dissection and Multiagent Chemotherapy), as shown in Table 2. This ongoing protocol aims to investigate three main clinical questions: the efficacy of surgery alone for stage I tumors; the role of retroperitoneal lymph node resection in reducing local recurrence of stage II tumors and the impact of mitotane and CDDP-based chemotherapy for unresectable and metastatic disease [61]. The results of this protocol are awaited and will shed light on this yet open field.

Genetics of pediatric ACT & therapeutic implications

Genetic syndromes associated with ACTs

ACTs might be sporadic or related to inherited genetic syndromes. Uncovering the molecular defects underlying these genetic syndromes has revealed key signaling pathways involved in adrenocortical tumorigenesis. We will review the genetic basis of adrenocortical tumorigenesis, focusing on the main molecular alterations found in these tumors. In addition, we assess the potential of targeting these molecular abnormalities to find new therapeutic strategies to treat pediatric patients with ACTs. Hereafter, aspects of inherited genetic syndromes associated with ACTs will be briefly reviewed.

Li-Fraumeni syndrome

Li-Fraumeni syndrome (LFS) is an autosomal dominant disorder, first described in 1969. It is characterized by multiple tumors, such as sarcomas, breast cancer, leukemia, nervous system tumors and ACTs. ACTs in patients with LFS commonly have an early onset and are found in 1–3% of patients with LFS [90–92]. Worldwide, a child diagnosed with ACT should be considered as a potential index case of LFS. Families presenting with some characteristics but not all criteria for the diagnosis of LFS have been classified as having Li-Fraumeni-like syndrome.

Germline mutations in the *TP53* gene have been associated with LFS and have been described in approximately 70% of patients with LFS. However, the absence of *TP53* mutations in families with LFS suggests that other unidentified genes may be involved in the pathogenesis of this syndrome [93].

Table 2. Ongoing experimental treatment protocol (ARAR0332) proposed by the Children's Oncology Group for pediatric patients with adrenocortical tumors.

Stage	Treatment
Stage I	Surgery alone
Stage II	Surgery + RPLN dissection
Stage III	Surgery + RPLN dissection + mitotane + CDDP/ETO/DOX
Stage IV	Surgery + RPLN dissection + mitotane + CDDP/ETO/DOX

CDDP: Cisplatin; DOX: Doxorubicin; ETO: Etoposide; RPLN: Retroperitoneal lymph node.
Adapted with permission from [61] © Elsevier (2012).

Beckwith–Wiedemann syndrome

Beckwith–Wiedemann syndrome (BWS) is characterized by organomegalia, omphalocele, microcephalia and fetal and pediatric neoplasms, such as Wilms' tumor, neuroblastoma, rhabdomyosarcoma, hepatoblastoma and ACTs [94]. Approximately, 3% of patients with BWS develop ACTs, which are commonly cortisol- and androgen-secreting tumors [92]. Most occurrences of BWS are sporadic, but a few cases are inherited in an autosomal dominant manner. BWS is caused by genetic or epigenetic alterations in the 11p15 chromosome, including imprinting of genes, such as the *H19* gene, paternal isodisomy and loss of heterozygosity resulting in *IGF2* hyperexpression. Interestingly, *IGF2* hyperexpression is also a hallmark of sporadic pediatric ACTs, as will be elaborated below. On the other hand, imprinting of *KCNQ1OT1* and *CDKN1C* results in *CDKN1C* hypoeexpression [95–97].

Carney complex

Carney complex is a syndrome characterized by spotty skin pigmentation and tumors, including skin tumors, myxomas, schwannomas, liver, pancreatic, breast and endocrine neoplasias, such as follicular thyroid cancer, pituitary adenomas/hyperplasia and primary pigmented nodular adrenocortical hyperplasia (PPNAD). PPNAD is an endocrine disorder most commonly associated with Carney complex, affecting 60% of patients with the disease, mostly children and young adults [98,99]. The formation in both right and left adrenal cortices of small pigmented and benign nodules is characteristic of PPNAD.

Inactivating mutations in the 1α regulatory subunit of the protein kinase A gene (*PRKARIA*), located in chromosome 17q22–q24, are related in 45–80% of Carney complex families [100]. Additionally, mutations in phosphodiesterase 11A and 8B genes (*PDE11A* and *PDE8B*) have been described in most, but not all, patients with isolated adrenal hyperplasia, Cushing's syndrome and PPNAD [101,102].

In addition to PPNAD, 17q22–24 loss of heterozygosity (LOH) was found in ACAs and ACCs [103]. *PRKARIA* mutations were identified in 10% of ACAs, but were not found in sporadic ACCs. Furthermore, *PDE11A* somatic mutations were

found in 19% of ACAs and 16% of ACCs [104]. However, so far, there is a lack of consistent studies on the enrollment of the *PRKARIA* gene in pediatric ACTs.

Multiple endocrine neoplasia type 1

Multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1) is an autosomal dominant syndrome caused by alterations in the *MEN1* gene, located in chromosome 11q13, which codifies the tumor suppressor protein menin. Abnormal function of menin causes a predisposition to tumors, such as parathyroid, pituitary, pancreatic islets and ACTs. Bilateral nonsecreting ACTs or adrenal hyperplasia can be found in 20–40% of patients with *MEN1* mutations [105].

MEN1 mutations have been identified in around 70% of MEN cases, and adrenal lesions commonly develop in patients with mutations in exons 2 and 10 of the *MEN1* gene [105–107]. *MEN1* mutations have not been identified in sporadic ACTs to date; however, 11q13 LOH, where the *MEN1* gene is located, has been described in sporadic ACCs [108].

McCune–Albright syndrome

McCune–Albright syndrome is characterized by polyostotic bone dysplasia, café-au-lait spots and endocrine disorders, including gonadotropin-independent precocious puberty, pituitary adenomas, hyperthyroidism and Cushing's syndrome. It is caused by somatic activating mutations in the α subunit of stimulatory G protein (*GNAS1*) [109]. *GNAS* mutations have been described in ACAs and ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia [110,111] and, in childhood ACTs, *GNAS* mutations have been identified in ACCs to date [112].

Lynch syndrome

Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominantly inherited disease related to cancer predisposition, caused by germline mutations in the genes involved in DNA mismatch repair. Colorectal and endometrial cancers are the most reported sites related to LS, with a lifetime occurrence risk of 35–80 and 34–71%, respectively. Less frequently, LS is related to cancers in the ovaries, hepatobiliary tract, urinary tract, small bowel and others [113].

Recently, one study found clinical criteria for the diagnosis of LS in 3.2% of patients with ACC. In addition, genetic testing for DNA mismatch repair genes detected mutations in these patients. Furthermore, occurrence of ACC in patients with LS has occasionally been reported since the first families with this syndrome were described. The authors concluded that LS should be considered as another cancer predisposition syndrome to be suspected in patients with ACC [114]. This new finding requires further evaluation in cohorts of pediatric ACT patients.

Molecular basis of adrenocortical tumorigenesis & potential therapeutic implications

Monoclonal origin

Several studies have demonstrated that ACTs have a monoclonal origin, suggesting that an initial event in one cell could

trigger these tumors [115]. However, recent studies have increasingly been demonstrating that tumorigenesis is a complex process that requires multiple molecular events, and which culminates in intracellular signaling interactions among pathways by means of crosstalk.

Classical evidence obtained from an X-chromosome analysis model in heterozygosis from female somatic cells demonstrated that ACCs are derived from monoclonal cells, whereas ACAs may originate from either monoclonal and/or polyclonal cells [116]. These evidences were obtained from adult patients and data on pediatric ACTs are limited.

Genomic instability

Cytogenetic alterations found in ACTs reinforce the hypothesis that multiple genetic events must concur for the occurrence of ACT, as demonstrated by means of comparative genomic hybridization (CGH), among other methods.

Using the CGH technique in adult patients, chromosome region gains in 4, 5, 12 and 19 and chromosome region losses in 1p, 17p, 22p, 2q and 11q were identified in 61% of ACAs and 62% of ACCs [117]. Studies applying microsatellite markers identified LOH in 11q13, 11p15, 17p13 and 2p16 regions in ACCs [118,119].

Genomic instability seems to be frequent in pediatric ACTs, as well. A study of a subgroup of pediatric ACTs, using the CGH technique, demonstrated that ACTs with a Weiss score of lower than 3 presented around 20 chromosomal abnormalities, whereas ACTs with a Weiss score equal to or greater than 3 presented around 35 chromosomal abnormalities [120]. An additional study enrolling pediatric ACT patients from the state of Parana, Brazil, demonstrated gains and losses of chromosomes in several regions [121]. These data were recently confirmed by high-resolution single nucleotide polymorphism arrays in a study comparing Brazilian pediatric ACTs with mutated *TP53* and wild-type *TP53* and non-Brazilian pediatric ACTs. Furthermore, this study revealed that non-Brazilian tumors with mutated *TP53* are similar to Brazilian tumors with mutated *TP53* and displayed distinct genomic profiles compared with non-Brazilian pediatric ACTs with a wild-type *TP53* [122]. These cytogenetic alterations occur in regions where genes that have already been related to ACTs are located as well as in regions where no candidate genes have yet been identified.

The potential origin of pediatric ACTs due to defective apoptosis & transformation of the fetal adrenal zone

An attractive hypothesis has been proposed which states that pediatric ACTs, more specifically those diagnosed in the very first years of life, may originate from the fetal adrenal zone [123]. One clinical argument to support this is that most pediatric ACTs secrete large amounts of dehydroepiandrosterone and its sulfate metabolite DHEAS to the fetal zone. Although this hypothesis has not yet been proven, there is evidence in its support. In this model, selected fetal zone cells survive due to impaired apoptosis and progress into

ACTs, preserving certain characteristics of the embryonic phase.

Boechat *et al.* have shown that placental alkaline phosphatase, an oncofetal protein, is expressed in pediatric ACTs, but not in normal postnatal adrenal tissue [124]. Additionally, Lorea *et al.* demonstrated evidence about impaired apoptosis in our cohort of pediatric ACTs. This study showed a different profile of apoptosis-related genes in childhood ACT samples compared to childhood nonneoplastic adrenal samples. These findings suggested that antiapoptotic mechanisms might be involved in the biology and prognosis of these tumors. It is important to note that our patients have a high prevalence of the P53 R337H mutation, which is an important gene in the control of the apoptotic pathway. Therefore, these findings may not be generalizable to pediatric ACTs without *TP53* mutations [125].

P53

The *TP53* gene, which is located in chromosome 17p13.1, is the suppressor gene most frequently associated with human neoplasias. The P53 protein is a transcriptional factor enrolled in cell cycle regulation, activating apoptosis when triggered by damaged DNA [126].

TP53 mutations have also been described in sporadic pediatric and adult ACTs around the world. Ragazzon *et al.* described different somatic mutations in the *TP53* gene in a subset of sporadic adult patients (p.L188WfsX2, p.E346X, p.C176F, p.R342P, p.A129del, p.R283C, p.E343X, p.R342P and p.K132N) [127]. Case studies have also reported pediatric ACT patients carrying *P53* mutations, such as IVS10-2-A > G [128], p.V143A [129], p.R175AfsX6 [130] and the p.T220C mutation, which has also been found in an ACT pediatric patient associated with LFS [131].

Most Brazilian pediatric ACT patients from southeast and south Brazil carry a specific inherited P53 R337H mutation. Haplotype analysis of this mutation has shown that the likelihood of this mutation occurring independently is very small, demonstrating a potential founder effect. This study revealed that Brazilian families carrying the mutant allele dwell in locations where Portuguese merchants frequented as a route in the 18th and 19th centuries. Additionally, this mutation was found in a Portuguese subject with no other relation to Brazil, reinforcing the hypothesis that the P53 R337H mutation has a Portuguese origin [132].

The P53 R337H mutation is located in the hotspot region of this gene, which has been identified in other tumors. This mutation is located in the P53 tetramerization domain that contributes to the highly sensitive stability of the mutant protein to higher pH, a situation that might occur in the adrenal glands. The adrenal glands undergo deep modifications in the pre- and postnatal periods, which require intensive apoptotic activity. Apoptotic cells have increased pH and, during adrenal development, this increase may contribute to the instability of the R337H P53 tetramerization domain. This disruption leads to a loss of P53 tumor

suppressor activity. Cells in a pH around 7.0, even those carrying the P53 R337H mutation, can have a sufficiently stable protein to adequately function. The P53 disruption in adrenal cells triggers disorderly cell growth, leading to tumor development [133]. Loss of the native allele would represent a second injury, according to the literature [134], and might be crucial to the development of this kind of tumor [135,136].

In southeast and southern Brazil, around 75–90% and 20–30% of pediatric and adult ACT patients, respectively, carry the heterozygous P53 R337H mutation, and present a loss of the native allele in tumoral tissue [22–24].

Although patients carrying the P53 R337H mutation did not fulfill the criteria for LFS, it is possible that these patients and family carriers present increased risk for tumors other than those commonly found in LFS, which might characterize a type of Li-Fraumeni like syndrome. Recent data have shown that childhood carriers of the P53 R337H mutation have an increased risk of choroid plexus carcinoma and adult carriers present an increased risk of osteosarcoma, breast, stomach and lung cancers [137–139]. One recent study, analyzing the frequency and the penetrance of the P53 R337H mutation, found that 1 out of 432 neonates born in the state of Parana, Brazil, carry this mutation. The penetrance of this mutation, regarding ACT development in the first decade of life, was found to be as low as 2–3% [25].

To date, the best counseling and follow-up protocol for affected children and related carriers of the P53 R337H mutation has not yet been well established. A recent report of a 6-year follow-up of families with LFS and *TP53* mutations (not including the R337H mutation) showed increased survival among the carriers that agreed to follow a comprehensive screening protocol compared to those who did not agree to be enrolled. In children, this protocol included abdominal ultrasound, blood count, biochemical and hormone measurements every 4 months, and yearly CNS and full body MRI. In addition, yearly mammography and colonoscopy were also performed in adults [140]. The cost-benefit ratio of this procedure in P53 R337H carriers has yet not been addressed and deserves future attention.

In our center, ACT patients carrying the P53 R337H mutation have a close follow-up for 5 years after the diagnosis and every year thereafter. We still do not know when or whether this follow-up should be ceased. Despite the recently reported risk of developing other tumors, such as those discussed above, we do not routinely perform imaging screening for these malignancies. However, parents of the patients are informed about this uncertainty and the possible need of long-term surveillance.

IGF signaling pathway

The IGF/IGFR system has not only been described as being involved in patients with BWS but also seems to play a key role in the pathogenesis of sporadic ACTs [141,142]. LOH, rearrangements and abnormal imprinting of the 11p15.5 locus,

Figure 6. Potential mechanisms involved in abnormal Wnt/β-catenin activation in pediatric adrenocortical tumors. (A) In addition to exon 3 *CTNNB1* mutations and **(B)** still unknown mechanisms resulting in increased Wnt ligand availability or increased affinity of the Wnt-frizzled complex may occur.

resulting in increased *IGF2* expression and decreased *p57kip2* and *H19* expression, have frequently been found in sporadic ACTs [143–145].

In the adrenal glands, IGF1 and IGF2 act as growth factors and contribute to steroidogenesis. *IGF2* mRNA expression is increased in 8.5 and 90% of adult ACAs and ACCs, respectively. In adult patients, but not in pediatric patients, *IGF2* overexpression was associated with unfavorable outcome and increased recurrence risk [5,15,144–146].

IGF1R inhibitors: still a promising ACT treatment

In a Brazilian cohort consisting of adult and pediatric ACTs, Almeida *et al.* identified increased *IGF2* expression in adult ACCs compared with adult ACAs. They also identified IGF1R, which is an IGF2 receptor, as a pediatric ACC marker [145]. Subsequently, preclinical studies were developed using IGF1R antagonists as a therapeutic approach to inhibit ACC growth in humans [145,147]. From these data, a Phase I clinical trial has been developed using 'figitumumab' (CP-751 871), a monoclonal antibody that prevents IGF1R activation blocking IGF1 and IGF2 binding. Early clinical trials with IGF1R inhibitors have demonstrated beneficial effects in some patients with advanced disease [148]. The results of this clinical trial showed disease stabilization in 43% of patients in the first 3 months of follow-up [148]. A Phase III trial with an IGF1R inhibitor for metastatic ACC was recently completed, but no results have yet been published [149]. Disease stabilization in a portion of these patients, but not all, indicates that additional abnormalities are involved in adrenocortical tumorigenesis and might contribute to tumor development and progression.

IGF2 transgenic mice models

A recent study analyzed the role of the IGF2 and Wnt pathways in mouse models. The study demonstrated that isolated IGF2 overexpression is not sufficient to trigger adrenal hyperplasia or tumors [7]. A similar finding was also described by another group, indicating that isolated IGF2 overexpression does not generate tumors [150]. However, in double transgenic mice, combining IGF2 overexpression and Wnt pathway activation, APC KO-H19ΔDMD, IGF2 seems to have contributed to tumor development and progression, characterized by larger adrenals, displayed earlier onset of hyperplasia and developed more frequent macroscopic adenomas, as well as one carcinoma [7]. These results reinforce the hypothesis that two or more genetic or epigenetic events are necessary for adrenal tumorigenesis.

The Wnt/β-catenin signaling pathway

It is widely known that the activation of the Wnt/β-catenin pathway plays an important role in the development of human cancers and, specifically, it has recently been implicated as playing a relevant role in adrenocortical tumorigenesis [151,152]. Mutations in exon 3 of the β-catenin gene, *CTNNB1*, which result in impaired β-catenin degradation, have frequently been found in adult ACT [4,153,154]. *CTNNB1* mutations have been found in up to 36% of adult ACTs, predominantly in nonsecreting tumors [154]. Moreover, in adults, *CTNNB1* mutations were found in similar frequencies in adult ACA and ACC [155]. In adult ACCs, abnormal activation of the Wnt pathway, defined by the presence of *CTNNB1* mutations and/or abnormal cytoplasmic and nuclear β-catenin accumulation, had been associated with a more aggressive phenotype [127]. In adult patients of a French cohort, *CTNNB1* and *TP53* mutations were clustered within different sets of a poor prognosis group of adult ACT patients. Interestingly, in these patients, *CTNNB1* and *TP53* mutations were mutually exclusive [127].

Analyzing our cohort of pediatric ACTs, we detected *CTNNB1*-activating mutations in only four of 62 (6%) patients, all harboring the P53 R337H mutation, in contrast to adult ACTs. We found an association between the presence of *CTNNB1* mutations and death, but the number of mutated cases was too small to generalize this finding. In addition, we found diffuse β-catenin accumulation in the cytoplasm and/or the nucleus in 71% of ACTs. Therefore, abnormal β-catenin accumulation was present in most tumors, even in those without *CTNNB1* mutations. In agreement, these tumors presented decreased expression of Wnt inhibitor genes, *DKK3*, *SFRP1* and *AXIN1*, and increased expression of *WISP2*, but not of *MYC*, both of which are β-catenin targets [20]. We believe that mechanisms other than *CTNNB1* might be involved in deregulation of the Wnt/β-catenin pathway, particularly in pediatric ACTs (FIGURE 6). Interestingly, in our pediatric patients, *CTNNB1* mutations were found in those harboring the R337H P53 mutation. Thus, unlike in adult European

patients, *CTNNB1* and *TP53* mutations were seen to coexist in our patients.

Transgenic mice model with β -catenin activation

Recently, mice were engineered with β -catenin constitutive activation (Δ Cat mice). This activation in the adrenal cortex of the Δ Cat mice results in progressive steroidogenesis and undifferentiated cell hyperplasia as well as dysplasia of the cortex and medulla. Adrenals in these mice develop malignant characteristics, such as uncontrolled neovascularization and locoregional metastatic invasion [156]. Due to its abnormal activation in some types of ACT, the Wnt signaling pathway may serve as a potential therapeutic target in patients with benign and malignant tumors with abnormal β -catenin accumulation [156].

The Tcf/ β -catenin complex inhibitors: a potential tool for ACT treatment

A recent study described Wnt target gene overexpression, such as *RALBP1*, *PDE2A* and *ENCI*, in adult ACTs carrying β -catenin mutations. After treatment with Wnt pathway inhibitors, PKF115-584 and PNU74654, decreased expression of *RALBP1*, *PDE2A* and *ENCI* was observed in a dose-dependent manner in H295R cells [4]. One previous work had already demonstrated that PKF115-584 dose dependently inhibited β -catenin-dependent transcription and H295R proliferation, even in the presence of increased SF-1 levels, which promote proliferation in this cell line. Additionally, nuclear localization of β -catenin and constitutive activation of β -catenin-dependent transcription were observed in H295R cells, which carry the β -catenin S45P mutation. Moreover, the drug had no effect on HeLa cells, a cell line in which the β -catenin pathway is not activated. Furthermore, PKF115-584 decreased the percentage of H295R cells in the S phase and increased the percentage of apoptotic cells [157].

Altogether, this evidence indicates that inhibitors of the Tcf/ β -catenin complex may be useful in the treatment of ACT, particularly those presenting abnormal behavior of the Wnt/ β -catenin pathway. However, to date, clinical studies using this approach have not been reported.

cAMP/PKA signaling

The Wnt/ β -catenin pathway is activated in PPNADs and ACAs with *PRKARIA* mutations, suggesting a link between the cAMP and Wnt/ β -catenin pathways in ACT development [158]. It has been shown that PKA phosphorylates serine 9 of GSK-3 β and inhibits its activity in the β -catenin degradation complex, leading to β -catenin stabilization [159,160]. This mechanism could contribute to the accumulation of β -catenin in PPNADs. Another possible link between the cAMP and Wnt/ β -catenin signaling pathways could be due to a direct phosphorylation of β -catenin on serine 675 by PKA, inhibiting the degradation of β -catenin or promoting its binding to its transcriptional coactivator, cAMP response element-binding protein-binding protein [161,162]. This link between the cAMP and Wnt/ β -catenin pathways is supported

by real-time PCR experiments in the H295R cells showing that 6 h of forskolin treatment stimulates the cDNA levels of *AXIN2* twofold, one of the main targets of Wnt/ β -catenin [158]. Expression studies in PPNAD and ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasias demonstrated the overexpression of genes that are part of, or regulate, the Wnt signaling pathway, such as *WISP2*, *GSK3 β* and *CTNNB1* [101,163]. Additionally, a transcriptome profiling of tumors produced by mouse models of *Prkar1a* haploinsufficiency identified the Wnt pathway as the main pathway activated by abnormal cAMP signaling. Moreover, siRNA of *CTNNB1* and *WNT3* inhibited proliferation of human PPNAD cells and *Prkar1a*^{+/−} mouse embryonic fibroblasts, and arrested both cell lines at the G0/G1 phase of the cell cycle [164]. Therefore, *Prkar1a* haploinsufficiency acts as a generic, albeit relatively weak, tumorigenic sign, which can work together with other tumor suppressors, tissue-specific factors or even chemicals to induce tumors [165].

The sonic hedgehog signaling pathway

The sonic hedgehog (SHH) pathway plays a key role in the development of the adrenal glands in mice [166] and is involved in tumorigenesis in several human tissues; data on adrenal tumors, however, are limited. Recently, Hedgehog (HH) signaling was described to be involved in adrenocortical tumorigenesis. In cortisol-producing adenomas [167], HH signaling expression was similar to that of a normal adrenal cortex, otherwise, higher mRNA expression of *GLI1*, *SMO* and *SHH* was observed in nonproducing adenomas [168]. Evaluating a panel of normal adrenal human cortices in different phases of fetal and postnatal development, we showed that SHH pathway proteins were present in fetal and postnatal normal adrenals and showed distinct patterns of spatiotemporal expression throughout development. Adult ACCs presented with higher expression of SHH pathway components such as *PTCH1*, *SMO*, *GLI3* and *SUFU* compared with normal adult adrenal cortices. Conversely, pediatric ACTs showed lower mRNA expression of *SHH*, *PTCH1*, *SMO*, *GLI1* and *GLI3* compared with normal pediatric adrenal cortices. Moreover, *in vitro* treatment of H295A cells with cyclopamine, a SHH pathway inhibitor, resulted in decreased *GLI3*, *SFRP1* and *CTNNB1* mRNA expression and β -catenin staining as well as decreased cell viability [169].

SHH signaling pathway antagonist: potentially useful adjuvant for ACT treatment

In vitro analysis showed that antagonism of HH signaling with cyclopamine treatment resulted in a lower proliferation rate of NCI-H295 adrenocortical cells, whereas HH agonism had no significant effect on adrenal cell proliferation [168,169].

Activation of the PKA pathway by forskolin results in reduced expression of HH signaling proteins, which may explain the lower expression of the HH components *GLI1* and *SMO* in CPA, compared with higher expression in nonproducing adenomas [168]. In brief, HH signaling may be involved in

the adrenocortical tumorigenesis and HH antagonists might represent a useful target for ACT therapy. It is worth mentioning that several HH pathway inhibitors are currently undergoing Phase I and II clinical trials for the treatment of different neoplasms [170].

mTOR

The mTOR pathway is a target of IGF1R signaling and coordinates a variety of processes, such as protein translation, growth factor signals, cell survival, proliferation and metabolism. mTOR signaling is hyperactivated in several types of human cancers and interacts with the PI3K signaling pathway, which regulates the proto-oncogene Akt [171,172]. A few studies have suggested that the mTOR pathway is activated in both adult ACCs and pediatric ACTs [173–175].

mTOR inhibition: a potential target therapy for ACT patients

Inhibition of mTOR and upstream targets, such as PI3K and IGF1R, may enhance antitumor activity by inhibiting Akt overactivation. Moreover, preclinical studies have demonstrated that inhibition of PI3K and mTOR with the inhibitor NVP-BEZ235 prevented Akt hyperphosphorylation in H295R cells and significantly decreased their proliferation *in vitro*, as well as *in vivo*, in xenograft models. Additionally, NVP-BEZ235 induced activation of Erk phosphorylation, which could be inhibited by simultaneous treatment with the Erk inhibitor FR180204. This latter drug synergized with NVP-BEZ235 in the *in vitro* inhibition of H295R proliferation [173,175]. A Phase I treatment trial combining cixutumumab and temsirolimus, inhibitors of IGF1R and mTOR, respectively, demonstrated antitumor activity in metastatic ACC [176]. Recently, a study in adult patients with metastatic or refractory ACC reinforced this finding. The combination of cixutumumab with temsirolimus was well tolerated and more than 40% of patients achieved prolonged stable disease [177]. These data could suggest that dual PI3K/mTOR inhibitors may represent a useful pharmacological tool in the therapy of advanced adrenocortical cancer.

Despite these promising preclinical findings, no clinically significant response was observed after treatment with everolimus, a rapamycin analog, in patients with metastatic or refractory ACC [178]. The failure of effectiveness could be related to the interaction with mitotane, signaling pathways and downstream IGF effectors working in the pathogenesis of ACC. A critical problem regarding patients or tumor cells treated with rapamycin is that cancer cells frequently develop resistance. While mTOR is inhibited by rapamycin, rapamycin can stimulate the PI3K/mTOR pathway. As a result, rapamycin treatment may aggravate cancer progress in some cases. To solve this problem, a small molecular compound could target both mTOR and its upstream regulator [179].

BUB1B/PINK1

A microarray study identified genes that could strongly discriminate adult ACAs and ACCs and also identified two clusters of

ACCs with distinct outcomes. The combined expression of three genes was a strong predictor of overall survival and disease-free survival. Therefore, the difference between the expression values of *DLGAP5* and *PINK1* was a strong predictor of recurrence and malignancy. In addition, the difference between the expression values of *BUB1B* and *PINK1* was a reliable predictor of overall survival [11]. These findings were also reported in a different cohort of adult patients [180]. However, these differences were not confirmed in pediatric ACTs.

Steroidogenic factor 1

The steroidogenic factor 1 (SF1), a member of the superfamily of orphan nuclear receptors, is a transcription factor that is important in adrenal embryogenesis and regulates the proximal promoter region of several steroidogenic enzymes of the P450 cytochrome in postnatal life [181]. Furthermore, SF1 is also expressed in other parts of the hypothalamus–pituitary–adrenal axis in nonsteroidogenic tissues, such as the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotropes [182].

In 1999, a copy number gain of this chromosomal region was demonstrated in pediatric ACTs [121,183]. In 2005, a study confirmed an SF1 copy number gain in eight of nine pediatric ACTs, suggesting the association between SF1 amplification and adrenocortical tumorigenesis [184]. Furthermore, nonsecreting ACTs in adult patients did not express the SF1 protein [185]. A critical role for SF1 dosage was demonstrated in regulating human adrenocortical cell proliferation and triggering tumor formation in mice [186]. SF1 protein overexpression and gene copy number gain were evidenced to be more common in pediatric than in adult ACTs [187]. SF1 overexpression does not seem to have any correlation with neither clinical manifestations nor histological features in pediatric patients [188]. However, SF1 overexpression was correlated with poor prognosis in adult ACCs [185].

SF1 inhibition: a potential target therapy for pediatric ACT patients

Preliminary evidence has shown that the use of SF1 inverse agonists in the treatment of ACT seems a promising field. Drugs of the isoquinolinone class were tested in the ACT cell line, demonstrating selective SF1 inhibition in H295R cells, which express the SF1 protein. In addition, the drug diminished aldosterone secretion stimulated by angiotensin II and both cortisol and DHEAS secretion stimulated by forskolin [189,190].

MYC

MYC participates in energy-consuming processes, such as proliferation and ribosome biosynthesis, and it has been described to be overexpressed in several tumors. However, downregulation of *MYC* has been found in cancer cell lines and might be a strategy for cancer cells to survive under conditions of limited energy [191]. Microarray studies have described *MYC* underexpression in adult ACTs. In addition, loss of chromosome 8q24, where *MYC* is located, has been shown in ACTs [9]. Our

group also identified *MYC* underexpression in childhood ACTs [20]. Therefore, ACTs might represent a unique class of tumors characterized by low *MYC* expression, since *MYC* hyperexpression has frequently been observed in many nonadrenal cancers [192].

Expert commentary

The precise differentiation between benign and malignant ACTs is a challenging issue in the pediatric population. Recurrence, local invasion and presence of metastasis are still the only ways to discriminate adenoma from carcinoma in these patients, leading to a delay in the initiation of adjuvant therapy. Furthermore, there are few pharmacological treatment options for pediatric ACTs and the efficacy of the current drugs are far from ideal. Advances in ACT biology knowledge are essential to achievement of new therapeutic strategies.

A recent study evaluated SF1 siRNA silencing effects in the NCI-H295R adrenocortical tumor cell line and results indicated that several Wnt-related genes seem to be regulated by SF1. The expression of WNT5a, a ligand that activates the noncanonical Wnt pathway, increased after SF1 silencing [193]. Interestingly, we recently showed that adult and pediatric ACTs overexpress WNT5a [194]. Genes potentially regulated by SF1 are *Cyclin D2* and *AXIN2*, which are Wnt pathway target genes, as well as *DKK3*, which is a Wnt pathway inhibitor, indicating that SF1 might be a transcriptional repressor of these genes. Moreover, increased expression of SF1 results in gene transcription inhibition induced by β -catenin, indicating that SF1 might directly repress the Wnt pathway, which may explain the increased expression of Wnt pathway target genes, such as *AXIN2* and *Cyclin D2*, observed in the NCI-H295R cell line under SF1 silencing [193]. In agreement with these data, preliminary findings in our lab have demonstrated that *NR5A1*/SF1 mRNA had decreased expression in a significant proportion of ACT samples.

Furthermore, several pathways might interact with the Wnt pathway and stem cell maintenance, such as the SHH pathway. Underneath the capsular region, where β -catenin plays an important role, there are also mesenchymal Gli1-positive cells recruited in reply to Shh production by SF1-positive cells [195]. The Wnt and SHH pathways play an important role in stem cell recruitment in different systems [196]. Considering this fact, it might be speculated that β -catenin may be involved in adrenocortical progenitor cell

Figure 7. Schematic figure demonstrating the contribution of the well-known and the putative distinct molecular and cellular pathways abnormalities on adrenocortical tumorigenesis. Green arrows: stimuli; red arrows: inhibition; dashed arrows: potential involvement.

recruitment by means of Shh interaction [197]. Studies involving evaluation of signaling pathways, such as Wnt and SHH, and stem cell markers in ACTs may contribute to increased knowledge in this field (FIGURE 7).

Five-year view

In summary, a great deal of progress has been achieved in the understanding of the molecular basis of pediatric ACTs. However, it is likely that additional genetic and epigenetic abnormalities, which remain unknown, are involved in adrenocortical tumorigenesis. The identification of these abnormalities may lead to the identification of prognostic markers and new treatment strategies for the management of pediatric patients with ACT. By the introduction of next-generation sequencing technologies, including exome and transcriptome analyses, exciting discoveries are anticipated.

Financial & competing interests disclosure

This work was supported by Sao Paulo State Research Council (FAPESP), grant no. 2011-13807-4 and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). SR Antonini, MM Cavalcanti and LF Leal were supported by Ribeirão Preto Medical-School – University of São Paulo, Pediatrics. The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Key issues

- Adrenocortical tumors (ACTs) are rare in children, but their frequency is 10–15-times higher in southeast and southern Brazil than worldwide. This high incidence is associated with an inherited low penetrance germline P53 R337H mutation, which can be detected in most of these patients.
- There are few available pharmacological options to treat metastatic and refractory adrenocortical carcinomas.
- Recently, a panel of chemotherapeutic drugs, tested in a pediatric ACT xenograft model, has demonstrated cisplatin and topotecan to be the best options in disease control.
- No histomorphological features distinguish ACT behavior as benign or malignant. In addition, prognostic molecular markers have not been identified in childhood ACTs.
- The identification of novel molecular abnormalities in ACTs may lead to the identification of prognostic markers and new treatment strategies for the management of pediatric patients with ACT.
- GF2 is overexpressed in most pediatric ACTs. However, the results of clinical trials with IGF1R inhibitors have been quite disappointing.
- The Wnt/ β -catenin pathway is activated in most pediatric ACTs. Inhibition of this pathway *in vitro* impaired H295R adrenocortical carcinomas cell proliferation in a dose-dependent manner.
- Other molecular and cellular pathways are likely to contribute to adrenocortical tumorigenesis. Among these pathways, potential novel therapy targets that need to be further evaluated include the inhibition of SF1 as well as sonic hedgehog and mTOR signaling.
- Despite a great deal of progress in the understanding of the molecular basis of pediatric ACTs, it is likely that additional unknown genetic and epigenetic abnormalities are involved in adrenocortical tumorigenesis. By the introduction of next-generation sequencing technologies, including exome and transcriptome analyses, exciting discoveries are anticipated.

References

Papers of special note have been highlighted as:

- of interest
- of considerable interest

- Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 2007;39(6):461-6
- Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003;27(7):867-81
- Arnaldi G, Boscaro M. Adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(4):405-19
- Durand J, Lampron A, Mazzucco TL, et al. Characterization of Differential Gene Expression in Adrenocortical Tumors Harboring β -Catenin (CTNNB1) Mutations. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(7):E1206-11
- Giordano TJ. Gene expression profiling of endocrine tumors using DNA microarrays: progress and promise. *Endocr Pathol* 2003;14(2):107-16
- Giordano TJ, Kuick R, Else T, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res* 2009;15(2):668-76
- We have interest in this study because it was the first publication reporting data from transcriptoma analysis in adrenocortical tumors and it is a rich source of potential diagnostic and prognostic markers to be further explored and replicated. The results of this study has been contributing to improve our understanding in the adrenocortical tumorigenesis field.**
- Heaton JH, Wood MA, Kim AC, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol* 2012;181(3):1017-33
- Tombol Z, Szabo PM, Patocs A, et al. Differences in MicroRNA expression profiles of adrenocortical tumors – letter. *Clin Cancer Res* 2010;16(10):2915
- Szabo PM, Tamasi V, Molnar V, et al. Meta-analysis of adrenocortical tumour genomics data: novel pathogenic pathways revealed. *Oncogene* 2010;29(21):3163-72
- Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(3):895-906
- de Reynies A, Assie G, Rickman DS, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol* 2009;27(7):1108-15
- Soon PS, Gill AJ, Benn DE, et al. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer* 2009;16(2):573-83
- Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. *Arch Surg* 2008;143(9):841-6.discussion 6
- Lombardi CP, Raffaelli M, Pani G, et al. Gene expression profiling of adrenal cortical tumors by cDNA macroarray analysis. Results of a preliminary study. *Biomed Pharmacother* 2006;60(4):186-90
- de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(3):1819-29
- Laurell C, Velazquez-Fernandez D, Lindsten K, et al. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol* 2009;161(1):141-52
- Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(1):52-7
- Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, et al. Adrenocortical

- carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000;88(4):711-36
19. Rodriguez-Galindo C, Figueiredo BC, Zambetti GP, Ribeiro RC. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Blood Cancer* 2005;45(3):265-73
 20. Leal LF, Mermejo LM, Ramalho LZ, Martinelli CE, Jr., Yunes JA, Seidinger AL, et al. Wnt/ β -catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96(10):3106-14
 - **We have interest in this study because it suggested that, in addition to CTNNB1 gene mutations, yet unknown additional mechanisms of Wnt/ β -catenin pathway activation may play a role in the development or progression of pediatric adrenocortical tumors.**
 21. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. SEER cancer statistics review. National Cancer Institute. Bethesda, MD; 1975-2010. 2013. Available from: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2010/
 22. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(10):4970-3
 23. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98(16):9330-5
 - **We have considerable interest in this study because it described for the first time that the germline p.R337H P53 mutation is recurrent in pediatric patients with adrenocortical tumors in Brazil.**
 24. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, et al. Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res* 2005;37(4):231-5
 25. Custodio G, Parise GA, Kiesel Filho N, et al. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol* 2013; 31(20):2619-26
 - **We have considerable interest in this study because it describes effectively the frequency and the penetrance of the p. R337H mutation and raises the discussion whether the screening for this mutation should or not be part of the newborn screening in highly affected areas.**
 26. Ciftci AO, Senocak ME, Tanyel FC, Buyukpamukcu N. Adrenocortical tumors in children. *J Pediatr Surg* 2001;36(4): 549-54
 27. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol* 2004;22(5):838-45
 - **We have considerable interest in this study because it summarizes the clinical characteristics, tumor staging, treatment and outcome of the largest cohort of pediatric patients with adrenocortical tumors.**
 28. Pereira RM, Michalkiewicz E, Pianovski MA, et al. [Treatment of childhood adrenocortical tumor]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005;49(5):747-52
 29. Mittal R, Ramadan DG, Khalifa NM, et al. Adrenocortical tumors in children: a Kuwait experience. *Gulf J Oncol* 2012(12):38-46
 30. Ghazi AA, Mofid D, Salehian MT, et al. Functioning adrenocortical tumors in children-secretory behavior. *J Clin Res Pediatr Endocrinol* 2013;5(1):27-32
 31. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(5):1317-24
 32. Hochberg Z. Practical algorithms in pediatric endocrinology. 2nd edition. Karger; Berlin, Germany: 2007
 33. Antonini SR, Colli LM, Ferro L, et al. [Childhood adrenocortical tumors: from a clinical to a molecular approach]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2011;55(8):599-606
 34. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M. Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *Eur Urol* 2011; 60(5):1055-65
 35. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol* 2011;7(6): 323-35
 36. Ross NS, Aron DC. Hormonal evaluation of the patient with an incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med* 1990;323(20):1401-5
 37. Young WF Jr. Clinical practice. The incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med* 2007;356(6):601-10
 38. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(12):4551-64
 39. Spoudeas HA. Paediatric endocrine tumours. Novo Nordisk; West Sussex, UK: 2005
 40. Castro M, Elias PC, Quidute AR, et al. Out-patient screening for Cushing's syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(3): 878-82
 41. Castro M, Elias PC, Martinelli CE Jr, et al. Salivary cortisol as a tool for physiological studies and diagnostic strategies. *Braz J Med Biol Res* 2000;33(10):1171-5
 42. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93(5):1526-40
 43. Elias P, Martinez E, Barone B, et al. Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2014;99(6):2045-51
 44. Martinelli CE Jr, Sader SL, Oliveira EB, et al. Salivary cortisol for screening of Cushing's syndrome in children. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1999;51(1):67-71
 45. Nieman LK. Approach to the patient with an adrenal incidentaloma. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(9):4106-13
 46. Arlt W, Biehl M, Taylor AE, et al. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(12): 3775-84
 47. Ribeiro RC, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, et al. Adrenocortical tumors in children. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33(10):1225-34
 48. Boland GW, Dwamena BA, Jagtiani Sangwaiya M, et al. Characterization of adrenal masses by using FDG PET: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test performance. *Radiology* 2011;259(1):117-26
 49. McDermott S, O'Connor OJ, Cronin CG, Blake MA. Radiological evaluation of adrenal incidentalomas: current methods and future prospects. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(1):21-33
 50. Martinez Leon MI, Romero Chaparro S, Weil Lara B, et al. [Adrenocortical tumors in children: imaging adenomas and carcinomas]. *Radiologia* 2012;54(4):342-9
 51. Lee MJ, Hahn PF, Papanicolaou N, et al. Benign and malignant adrenal masses: CT distinction with attenuation coefficients,

- size, and observer analysis. *Radiology* 1991; 179(2):415-18
52. Hamrahan AH, Ioachimescu AG, Remer EM, et al. Clinical utility of noncontrast computed tomography attenuation value (hounsfield units) to differentiate adrenal adenomas/hyperplasias from nonadenomas: cleveland Clinic experience. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(2):871-7
 53. Ilias I, Sahdev A, Reznek RH, et al. The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(3):587-99
 54. Korobkin M, Brodeur FJ, Francis IR, et al. Delayed enhanced CT for differentiation of benign from malignant adrenal masses. *Radiology* 1996;200(3):737-42
 55. Hahner S, Sundin A. Metomidate-based imaging of adrenal masses. *Horm Cancer* 2011;2(6):348-53
 56. Bauditz J, Quinkler M, Beyersdorff D, Wermke W. Improved detection of hepatic metastases of adrenocortical cancer by contrast-enhanced ultrasound. *Oncol Rep* 2008;19(5):1135-9
 57. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum Pathol* 2009;40(6): 757-68
 58. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer* 1985;55(4):766-73
 59. Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, et al. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. *Am J Clin Pathol* 1994;101(5):625-9
 60. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol* 1979;72(3):390-9
 61. 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. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(1):37-43
 62. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995;154(6):2004-9
 63. Tucci S Jr, Martins AC, Suaid HJ, et al. The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. *J Urol* 2005;174(6):2338-42.discussion 42
 64. Hubertus J, Boxberger N, Redlich A, et al. Surgical aspects in the treatment of adrenocortical carcinomas in children: data of the GPOH-MET 97 trial. *Klin Padiatr* 2012;224(3):143-7
 65. St Peter SD, Valusek PA, Hill S, et al. Laparoscopic adrenalectomy in children: a multicenter experience. *J Laparoendosc Adv Surg Tech A* 2011;21(7):647-9
 66. Lopes RI, Denes FT, Bissoli J, et al. Laparoscopic adrenalectomy in children. *J Pediatr Urol* 2012;8(4):379-85
 67. Gelas T, Frappaz D, Berlier P, et al. Mini-invasive surgery for adrenocortical carcinoma in children: is it safe? *Pediatr Hematol Oncol* 2013;30(4):288-90
 68. Latronico AC. Tumores adrenocorticaes. In: Saad MJA, Maciel RMB, Mendonca BB, editors. *Endocrinologia*. Editora Atheneu; São Paulo, Brazil: 2007. p. 555-60
 69. Sutter JA, Grimberg A. Adrenocortical tumors and hyperplasias in childhood – etiology, genetics, clinical presentation and therapy. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006; 4(1):32-9
 70. Redlich A, Boxberger N, Strugala D, et al. Systemic treatment of adrenocortical carcinoma in children: data from the German GPOH-MET 97 trial. *Klin Padiatr* 2012;224(6):366-71
 71. Marques-Pereira R, Delacerda L, Lacerda HM, et al. Childhood adrenocortical tumours: a review. *Hered Cancer Clin Pract* 2006;4(2):81-9
 72. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2027-37
 73. Icard P, Goudet P, Charpenay C, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg* 2001;25(7): 891-7
 74. Pommier RF, Brennan MF. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. *Surgery* 1992;112(6):963-70.discussion 70-1
 75. Schteingart DE, Motazed A, Noonan RA, Thompson NW. Treatment of adrenal carcinomas. *Arch Surg* 1982;117(9):1142-6
 76. Bodie B, Novick AC, Pontes JE, et al. The Cleveland Clinic experience with adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 1989;141(2): 257-60
 77. Nelson AA, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis (parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Arch Pathol* 1949;48(5): 387-94
 78. Veytsman I, Nieman L, Fojo T. Management of endocrine manifestations and the use of mitotane as a chemotherapeutic agent for adrenocortical carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(27): 4619-29
 79. Berruti A, Terzolo M, Pia A, et al. Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer* 1998;83(10):2194-200
 80. Andersen A, Kasperlik-Zaluska AA, Warren DJ. Determination of mitotane (o, p-DDD) and its metabolites o,p-DDA and o,p-DDE in plasma by high-performance liquid chromatography. *Ther Drug Monit* 1999;21(3):355-9
 81. Andersen A, Warren DJ, Nome O, et al. A high-pressure liquid chromatographic method for measuring mitotane [1,1-(o,p'-Dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethane] and its metabolite 1,1-(o,p'-Dichlorodiphenyl)-2,2-dichloroethene in plasma. *Ther Drug Monit* 1995;17(5):526-31
 82. Teinturier C, Pauchard MS, Brugieres L, et al. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. *Med Pediatr Oncol* 1999;32(2):106-11
 83. De Leon DD, Lange BJ, Walterhouse D, Moshang T. Long-term (15 years) outcome in an infant with metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(10):4452-6
 84. Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs* 2005;6(4):386-94
 85. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003;169(1):5-11
 86. Korth-Schutz S, Levine LS, Roth JA, et al. Virilizing adrenal tumor in a child suppressed with dexamethasone for three years. Effect of o,p'-DDD on serum and urinary androgens. *J Clin Endocrinol Metab* 1977;44(3):433-9
 87. Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, et al. Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006;28(8): 513-24

88. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* 2012;366(23):2189-97
89. Pinto EM, Morton C, Rodriguez-Galindo C, et al. Establishment and characterization of the first pediatric adrenocortical carcinoma xenograft model identifies topotecan as a potential chemotherapeutic agent. *Clin Cancer Res* 2013;19(7):1740-7
90. Hisada M, Garber JE, Fung CY, et al. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(8):606-11
91. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969;71(4):747-52
92. Lodish MB, Stratakis CA. Rare and unusual endocrine cancer syndromes with mutated genes. *Semin Oncol* 2010;37(6):680-90
93. Mai PL, Malkin D, Garber JE, et al. Li-Fraumeni syndrome: report of a clinical research workshop and creation of a research consortium. *Cancer Genet* 2012;205(10):479-87
94. Wexsberg R, Shuman C, Beckwith JB. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Eur J Hum Genet* 2010;18(1):8-14
95. Cohen MM Jr. Beckwith-Wiedemann syndrome: historical, clinicopathological, and etiopathogenetic perspectives. *Pediatr Dev Pathol* 2005;8(3):287-304
96. Wexsberg R, Shuman C, Smith AC. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 2005;137C(1):12-23
97. Maher ER, Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 2000;105(3):247-52
98. Bertherat J, Horvath A, Groussin L, et al. Mutations in regulatory subunit type 1A of cyclic adenosine 5'-monophosphate-dependent protein kinase (PRKARIA): phenotype analysis in 353 patients and 80 different genotypes. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2085-91
99. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4041-6
100. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, et al. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKARIA gene in patients with the carney complex. *Hum Mol Genet* 2000;9(20):3037-46
101. Horvath A, Boikos S, Giatzakis C, et al. A genome-wide scan identifies mutations in the gene encoding phosphodiesterase 11A4 (PDE11A) in individuals with adrenocortical hyperplasia. *Nat Genet* 2006;38(7):794-800
102. Horvath A, Mericq V, Stratakis CA. Mutation in PDE8B, a cyclic AMP-specific phosphodiesterase in adrenal hyperplasia. *N Engl J Med* 2008;358(7):750-2
103. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, et al. Molecular and functional analysis of PRKARIA and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res* 2003;63(17):5308-19
104. Libe R, Fratticci A, Coste J, et al. Phosphodiesterase 11A (PDE11A) and genetic predisposition to adrenocortical tumors. *Clin Cancer Res* 2008;14(12):4016-24
105. Brandi ML, Gagel RF, Angeli A, et al. Guidelines for diagnosis and therapy of MEN type 1 and type 2. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(12):5658-71
106. Newey PJ, Thakker RV. Role of multiple endocrine neoplasia type 1 mutational analysis in clinical practice. *Endocr Pract* 2011;17(Suppl 3):8-17
107. Pellegata NS, Quintanilla-Martinez L, Siggekkow H, et al. Germ-line mutations in p27Kip1 cause a multiple endocrine neoplasia syndrome in rats and humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(42):15558-63
108. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(1):216-19
109. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. *Eur J Endocrinol* 2001;145(5):543-59
110. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(5):2147-51
111. Kobayashi H, Usui T, Fukata J, et al. Mutation analysis of Gsalpha, adrenocorticotropin receptor and p53 genes in Japanese patients with adrenocortical neoplasms: including a case of Gsalpha mutation. *Endocr J* 2000;47(4):461-6
112. Sidhu A, Debelenko L, Misra VK. Infantile adrenocortical tumor with an activating GNAS1 mutation. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(1):E115-18
113. Dinh TA, Rosner BI, Atwood JC, et al. Health benefits and cost-effectiveness of primary genetic screening for Lynch syndrome in the general population. *Cancer Prev Res* 2011;4(1):9-22
114. Raymond VM, Everett JN, Furtado LV, et al. Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer. *J Clin Oncol* 2013;31(24):3012-18
115. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer* 2007;14(1):13-28
116. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994;78(6):1444-53
117. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(7):3467-74
118. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2001;61(18):6762-7
119. Kjellman M, Roshani L, Teh BT, et al. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(2):730-5
120. Mateo EC, Lorea CF, Duarte AA, et al. A study of adrenocortical tumors in children and adolescents by a comparative genomic hybridization technique. *Cancer Genet* 2011;204(6):298-308
121. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(3):1116-21
122. Letouze E, Rosati R, Komechen H, et al. SNP array profiling of childhood adrenocortical tumors reveals distinct pathways of tumorigenesis and highlights candidate driver genes. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(7):E1284-93
123. Custodio G, Komechen H, Figueiredo FR, et al. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(1):44-51
124. Bochat GA, Stingham ST, Custodio G, et al. Placental alkaline phosphatase in pediatric adrenocortical cancer. *J Pediatr Hematol Oncol* 2011;33(4):e149-53

125. Lorea CF, Moreno DA, Borges KS, et al. Expression profile of apoptosis-related genes in childhood adrenocortical tumors: low level of expression of BCL2 and TNF genes suggests a poor prognosis. *Eur J Endocrinol* 2012;167(2):199-208
126. Soussi T. The history of p53. A perfect example of the drawbacks of scientific paradigms. *EMBO Rep* 2010;11(11):822-6
127. Ragazzon B, Libe R, Gaujoux S, et al. Transcriptome analysis reveals that p53 and [beta]-catenin alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancers. *Cancer Res* 2010;70(21):8276-81
- **We have interest in this study because it shows that P53 and Wnt/beta-catenin pathway abnormalities are the most frequent abnormalities in adrenocortical tumors in adult patients.**
128. Pinto EM, Ribeiro RC, Kletter GB, et al. Inherited germline TP53 mutation encodes a protein with an aberrant C-terminal motif in a case of pediatric adrenocortical tumor. *Fam Cancer* 2011;10(1):141-6
129. Ko JH, Lee HS, Hong J, Hwang JS. Virilizing adrenocortical carcinoma in a child with Turner syndrome and somatic TP53 gene mutation. *Eur J Pediatr* 2010;169(4):501-4
130. Si N, Sun M, Lu CX, et al. [Identification of a novel TP53 germline mutation in one child with adrenocortical carcinoma]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2009;89(20):1402-4
131. Lin MT, Shieh JJ, Chang JH, et al. Early detection of adrenocortical carcinoma in a child with Li-Fraumeni syndrome. *Pediatr Blood Cancer* 2009;52(4):541-4
132. Garritano S, Gemignani F, Palmero EI, et al. 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* 2010;31(2):143-50
133. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol* 2002;9(1):12-16
134. Testa JR, Hino O. Tumor suppressor genes and the two-hit model of recessive oncogenesis: celebrating Alfred Knudson's 80th birthday. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;38(4):286-7
135. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, et al. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(5):2976-81
136. Bielska M, Parviainen H, Kiiveri S, et al. Review paper: origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Vet Pathol* 2009;46(2):194-210
137. Custodio G, Taques GR, Figueiredo BC, et al. Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. *PLoS One* 2011;6(3):e18015
138. Figueiredo BC, Sandrini R, Zambetti GP, et al. Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. *J Med Genet* 2006;43(1):91-6
139. Seidinger AL, Mastellaro MJ, Fortes FP, et al. Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in Southeast Brazil. *Cancer* 2011;117(10):2228-35
140. Villani A, Tabori U, Schiffman J, et al. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: a prospective observational study. *Lancet Oncol* 2011;12(6):559-67
141. Haluska P. Insulin-like growth factor pathway. *J Thorac Oncol* 2010;5(12 Suppl 6):S478-9
142. Ragazzon B, Assie G, Bertherat J. Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer* 2011;18(2):R15-27
143. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(8):2559-65
144. Gicquel C, Boule N, Logie A, et al. [Involvement of the IGF system in the pathogenesis of adrenocortical tumors]. *Ann Endocrinol (Paris)* 2001;62(2):189-92
145. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(9):3524-31
- **We have interest in this study because it showed that overexpression of IGF1R may be a marker of bad prognosis in pediatric adrenocortical tumors.**
146. Boule N, Logie A, Gicquel C, et al. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(5):1713-20
147. Barlaskar FM, Spalding AC, Heaton JH, et al. Preclinical targeting of the type I insulin-like growth factor receptor in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(1):204-12
148. Haluska P, Worden F, Olmos D, et al. Safety, tolerability, and pharmacokinetics of the anti-IGF-1R monoclonal antibody figitumumab in patients with refractory adrenocortical carcinoma. *Cancer Chemother Pharmacol* 2010;65(4):765-73
149. ClinicalTrials.gov. Available from: <http://clinicaltrials.gov/show/NCT00924989>
150. Drelon C, Berthon A, Ragazzon B, et al. Analysis of the role of Igf2 in adrenal tumour development in transgenic mouse models. *PLoS One* 2012;7(8):e44171
151. Chen X, Yang J, Evans PM, Liu C. Wnt signaling: the good and the bad. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2008;40(7):577-94
152. El Wakil A, Lalli E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2011;332(1-2):32-7
153. Tadjine M, Lampron A, Ouadi L, Bourdeau I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2008;68(2):264-70
154. Bonnet S, Gaujoux S, Launay P, et al. Wnt/[beta]-catenin pathway activation in adrenocortical adenomas is frequently due to somatic CTNNB1-activating mutations, which are associated with larger and nonsecreting tumors: a study in cortisol-secreting and -nonsecreting tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96(2):E419-26
155. Tissier F, Cavard C, Groussin L, et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2005;65(17):7622-7
156. Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, et al. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet* 2010;19(8):1561-76
157. Doghman M, Cazareth J, Lalli E. The T cell factor/beta-catenin antagonist PKF115-584 inhibits proliferation of adrenocortical carcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(8):3222-5

158. Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, et al. Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(10):4135-40
159. Khattak MN, Buchfelder M, Kleindienst A, et al. CRH and SRIF have opposite effects on the Wnt/beta-catenin signalling pathway through PKA/GSK-3beta in corticotroph pituitary cells. *Cancer Invest* 2010;28(8):797-805
160. Li M, Wang X, Meintzer MK, et al. Cyclic AMP promotes neuronal survival by phosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta. *Mol Cell Biol* 2000;20(24):9356-63
161. Taurin S, Sandbo N, Qin Y, et al. Phosphorylation of beta-catenin by cyclic AMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* 2006;281(15):9971-6
162. van Veelen W, Le NH, Helvensteijn W, et al. beta-catenin tyrosine 654 phosphorylation increases Wnt signalling and intestinal tumorigenesis. *Gut* 2011;60(9):1204-12
163. Bourdeau I, Antonini SR, Lacroix A, et al. Gene array analysis of macronodular adrenal hyperplasia confirms clinical heterogeneity and identifies several candidate genes as molecular mediators. *Oncogene* 2004;23(8):1575-85
164. Almeida MQ, Muchow M, Boikos S, et al. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53^{+/+} or Rb1^{+/+} backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2010;19(8):1387-98
165. Almeida MQ, Stratakis CA. How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol* 2010;336(1-2):162-8
166. Ching S, Vilain E. Targeted disruption of Sonic Hedgehog in the mouse adrenal leads to adrenocortical hypoplasia. *Genesis* 2009;47(9):628-37
167. Armstrong R, Sridhar M, Greenhalgh KL, et al. Pheochromocytoma in children. *Arch Dis Childhood* 2008;93(10):899-904
168. Werminghaus P, Haase M, Hornsby PJ, et al. Hedgehog-signaling is upregulated in non-producing human adrenal adenomas and antagonism of hedgehog-signaling inhibits proliferation of NCI-H295R cells and an immortalized primary human adrenal cell line. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2014;139:7-15
169. Gomes DC, Leal LF, Mermejo LM, et al. Jr., Frago MC, et al. Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2014. [Epub ahead of print]
170. Sandhiya S, Melvin G, Kumar SS, Dkhar SA. The dawn of hedgehog inhibitors: vismodegib. *J Pharmacol Pharmacother* 2013;4(1):4-7
171. Liu Q, Thoreen C, Wang J, et al. mTOR mediated anti-cancer drug discovery. *Drug Discov Today Ther Strateg* 2009;6(2):47-55
172. Liu FY, Zhao ZJ, Li P, et al. Mammalian target of rapamycin (mTOR) is involved in the survival of cells mediated by chemokine receptor 7 through PI3K/Akt in metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010;48(4):291-6
173. De Martino MC, van Koetsveld PM, Pivonello R, Hofland LJ. Role of the mTOR pathway in normal and tumoral adrenal cells. *Neuroendocrinology* 2010;92(Suppl 1):28-34
174. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, et al. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2010;70(11):4666-75
- **We have interest in this study because it originally showed that miRNAs and the mTOR pathway may be important to the tumorigenesis of adrenocortical tumors and may be a new potential therapy target to be further explored.**
175. Doghman M, Lalli E. Efficacy of the novel dual PI3-kinase/mTOR inhibitor NVP-BEZ235 in a preclinical model of adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2012;364(1-2):101-4
176. Naing A, Kurzrock R, Burger A, et al. Phase I trial of cixutumumab combined with temsirolimus in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 2011;17(18):6052-60
177. Naing A, Lorusso P, Fu S, et al. Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. *Br J Cancer* 2013;108(4):826-30
178. Fraenkel M, Gueorguiev M, Barak D, et al. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine* 2013;44(1):187-92
179. Liu X, Yue Z. Recent patents and patent applications relating to mTOR pathway. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2009;3(1):44-52
180. Frago MC, Almeida MQ, Mazzuco TL, et al. Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients. *Eur J Endocrinol* 2012;166(1):61-7
181. Lala DS, Rice DA, Parker KL. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 1992;6(8):1249-58
182. Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev* 1997;18(3):361-77
183. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer* 1999;81(2):300-4
184. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2005;90(2):615-19
185. Sbiera S, Schull S, Assie G, et al. High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(10):E161-71
186. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 2007;21(12):2968-87
187. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(3):1458-62
188. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 2006;42(8):1040-3
189. Doghman M, Cazareth J, Douquet D, et al. Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor-1 inverse agonists. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(6):2178-83
190. Doghman M, Madoux F, Hodder P, Lalli E. Identification and characterization of steroidogenic factor-1 inverse agonists. *Methods Enzymol* 2010;485:3-23

191. Okuyama H, Endo H, Akashiika T, et al. Downregulation of c-MYC protein levels contributes to cancer cell survival under dual deficiency of oxygen and glucose. *Cancer Res* 2010;70(24):10213-23
192. Szabo PM, Racz K, Igaz P. Underexpression of C-myc in adrenocortical cancer: a major pathogenic event? *Horm Metab Res* 2011; 43(5):297-9
193. Ehrlund A, Jonsson P, Vedin LL, et al. 1 and RNF31 affects components of steroidogenesis, TGFbeta, and Wnt/beta-catenin signaling in adrenocortical carcinoma cells. *PLoS One* 2012;7(3): e32080
194. Mermejo LM, Leal LF, Colli LM, et al. Deregulation of noncanonical wnt pathways is present in pediatric and adult adrenocortical tumors. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2014. [Epub ahead of print]
195. King P, Paul A, Laufer E. Shh signaling regulates adrenocortical development and identifies progenitors of steroidogenic lineages. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(50):21185-90
196. Silva-Vargas V, Lo Celso C, Giangreco A, et al. Beta-catenin and Hedgehog signal strength can specify number and location of hair follicles in adult epidermis without recruitment of bulge stem cells. *Dev Cell* 2005;9(1):121-31
197. Simon DP, Hammer GD. Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2012;351(1):2-11

Anexo 10 - Artigo de original a ser submetido.

Analysis of *DAX1* and *SF1* genes and their interaction with genes involved in stem cell maintenance in adrenocortical tumors

Marcelo M. Cavalcanti, MD.¹, Leticia F. Leal, PhD.¹, Fernanda B. Coeli-Lacchini, PhD.², Carlos Eduardo Martinelli Jr., MD. PhD.¹, Carlos A. Scrideli, MD. PhD.¹, Silvio Tucci Jr, MD. PhD.³, Carlos Augusto F. Molina, MD. PhD.³, José A. Yunes, PhD.⁴, Maria José Mastellaro, MD.⁴, Silvia R. Brandalise, MD. PhD.⁴, Izilda Aparecida Cardinalli, MD. PhD.⁴, Leandra N. Z. Ramalho, MD. PhD.⁵, Ayrton C. Moreira, MD, PhD², Margaret Castro, MD. PhD.² and Sonir R. Antonini, MD. PhD.¹

- *Departments of Pediatrics¹, Internal Medicine², Surgery³ and Pathology⁵,
Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo.*
- *Boldrini Children's Center, Campinas, Brazil⁴.*

Summary

Introduction: Increased *SF1* (*NR5A1*) copy number and/or *SF1* protein overexpression are described in pediatric adrenocortical tumors (ACTs). Activation of the Wnt/beta-catenin pathway is frequent in pediatric and adult ACTs. *SF1* and *DAX1* as well as the Wnt/beta-catenin pathway are important for adrenocortical development by interaction with genes involved in stem cell maintenance, such as *SOX2*, *NANOG* and *STAT3*. The role of stem/progenitor cells is not well established in the pathogenesis of ACTs.

Aim: to evaluate the status of *DAX1*, *SF1*, *SOX2*, *NANOG* and *STAT3* in ACTs and its relationship with abnormalities of the Wnt/beta-catenin pathway.

Patients and Methods: We evaluated 70 pediatric patients (77% female; 5,7 [0,4 – 19,2] years at the diagnosis) and 18 adult patients (89% female; 4,3 [1,4 – 11,9] years at the diagnosis). Normal adrenal cortices were used as controls (12 pediatric/14 adults). mRNA expression levels of *DAX1*, *SF1*, *SOX2*, *NANOG* and *STAT3* were evaluated by qPCR and protein expression of *SF1* and *DAX1* by immunohistochemistry (IHC). Copy number variation of *SF1* and *DAX1* was evaluated by multiple ligand probe assay (MLPA). In NCI-H295 cells, the *in vitro* effect on *NANOG* mRNA expression of the Wnt/beta-catenin pathway inhibition by PNU-74654 was evaluated.

Results: Compared with controls, lower *SF1* mRNA expression was found in 84% of pediatric ACTs ($P < 0.01$) but not in adult ACT ($P = 0.48$). Conversely, increased expression of *DAX1* mRNA was found in 89% of adult ACT ($P < 0.01$) but not in pediatric ACT ($P = 0.83$). There was a strong positive correlation between mRNA expression of *DAX1* and *SF1* ($r = 0.63$; $P < 0.01$). At protein level, moderate or strong nuclear staining of *SF1* was found in 77% and 19% of pediatric and adult ACTs, respectively. Moderate or strong nuclear staining of *DAX1* was found in 48% of pediatric ACTs and it was not found in adult ACTs. MLPA analysis revealed that *SF1* gene amplification is more frequent in pediatric than in adult ACTs (71% vs. 33%, respectively). *SOX2* mRNA expression was lower in both pediatric and adult ACTs compared with controls ($P < 0.01$ and $P < 0.01$). No differential *STAT3* mRNA expression was found in pediatric and adult ACTs compared with controls. *STAT3* mRNA expression was higher in ACAs compared with ACCs in adult patients ($P < 0.01$). There was a positive correlation between *SF1* staining and *STAT3* mRNA expression ($r = 0.7$; $P < 0.01$). *NANOG* mRNA expression was higher in ACTs

harboring the p.S45P beta-catenin mutation (fold change= 5; $P<0.01$). *In vitro* inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway in NCI-H295 cells, which harbors the p.S45P beta-catenin mutation, impaired *NANOG* mRNA expression in a dose-dependent manner ($P<0.01$). **Conclusion:** In pediatric ACTs, SF1 gene amplification and increased SF1 staining are frequent, even in the absence of increased SF1 mRNA expression, as well as strong DAX1 staining, suggesting a bidirectional mutual activation with SF1. Adrenocortical tumorigenesis occurs in an intricate manner in both adults and children but in different ways.

INTRODUCTION

Adrenocortical tumors (ACTs) are relatively common benign neoplasms in humans and the prevalence of adrenocortical adenomas (ACA) reaches 7.3% in autopsy series. Adrenocortical carcinomas (ACC) are rare and account for approximately 0.02% of all cancers reported around the world {Wajchenberg, 2000 #8}. ACTs occurs mainly in the first five years of life and between the forth and the fifth decades of life. Independently of the age, they affect more frequently females {Antonini, 2014 #143;Almeida, 2007 #1;Rodriguez-Galindo, 2005 #9;Wajchenberg, 2000 #8;Lalli, 2015 #144}. In children, ACTs are rare causes of malignancy. However, in the South and Southeast of Brazil, the incidence of pediatric ACTs is 10-15 times higher than worldwide {Sandrini, 1997 #2;Stiller, 1994 #4;Lalli, 2015 #144;Antonini, 2014 #143}. This increased incidence is linked to the presence of a specific germline mutation in the *TP53* gene (R337H) found in most of the affected children {Garritano, #35;Latronico, 2001 #10;Ribeiro, 2001 #11}.

Activation of the Wnt/beta-catenin pathway signaling has been widely reported in ACT, either in pediatric or adult patients. Somatic *CTNNB1* (beta-catenin encoding gene) mutations are more frequent in adult patients (15-36%) than in children (<10%) with ACT {Bonnet, 2010 #32;Gaujoux, 2011 #161;Tadjine, 2008 #123;Tissier, 2005 #166;Leal, 2011 #9;Mermejo, 2014 #142}. In addition to *CTNNB1* mutations, we had previously suggested that the activation of both Wnt canonical and non-canonical pathways is frequent in ACT, even in the absence of *CTNNB1* mutations {Leal, 2011 #9;Mermejo, 2014 #142}. This hypothesis was recently reinforced by whole exome sequencing data showing that loss-of-function mutations in *ZNRF3*, a Wnt/beta-catenin pathway inhibitor, is found in 21% of adult ACCs. To date, *CTNNB1* and *ZNRF3* mutations, both leading to increased Wnt/beta-catenin signaling, are the most recurrent genetic abnormalities in adult ACCs {Assie, 2014 #145}.

Previously, copy number gain of the chromosomal region 9q34 locus was detected in pediatric ACTs {Figueiredo, 1999 #105;Figueiredo, 1999 #105;James, 1999 #158}. Later, amplification of the steroidogenic factor 1 (SF1) encoding gene (*NR5A1*), located at the 9q33.3 locus, was evidenced by fluorescence *in situ* hybridization (FISH) in 8 of 9 Brazilian pediatric ACTs. These findings pointed to an association between increased copy number of *SF1* and adrenocortical tumorigenesis {Figueiredo, 2005 #159}. Furthermore, increased expression of SF1 protein and increased copy number of *SF1* gene were more frequent in pediatric ACTs than in adult ones {Almeida, 2010 #162}. However, no correlation was found between increased SF1

expression and histological variables and/or clinical features of pediatric ACTs {Pianovski, 2006 #163}. On the other hand, increased protein expression of SF1 correlated with poor prognosis in adult patients {Sbiera, 2010 #160}. SF1 is a transcriptional factor that is important in adrenal embryogenesis and regulates the proximal promoter region of several P450 cytochrome steroidogenic enzymes in postnatal life {Lala, 1992 #156}. To date, it is not well established whether increased *SF1* copy number leads to increased *SF1* mRNA levels nor whether increased SF1 protein levels are related to increased *SF1* transcription {Almeida, 2010 #162; Pianovski, 2006 #163; Doghman, 2007 #171}.

The dosage-sensitive sex reversal, adrenal hypoplasia critical region, on chromosome X, gene 1 (*DAX1*), member of the superfamily of nuclear receptors, is encoded by the *NR0B1* gene. *DAX1* has predominantly repressor function of the transcription of other nuclear receptors, such as SF1 {Niakan, 2005 #67}. On the other hand, it was seen, *in vivo*, that high doses of *DAX1* can form complexes with coactivators stimulating *SF1* expression. Thus, *DAX1* may present dual regulatory function, either as coactivator or corepressor of SF1, depending on the amount transcribed {Xu, 2009 #74}. To date, scarce data is available about *DAX1* involvement in adrenocortical tumorigenesis. Reincke et al. analyzed *DAX1* mRNA and *DAX1* protein expression in a panel including 11 aldosterone-producing adenomas, 8 cortisol-producing adenomas, 3 nonfunctional adenomas and 5 ACCs. They found high *DAX1* mRNA and *DAX1* protein expression in 3 non-functional adenomas {Reincke, 1998 #81}. Shibata et al. detected high *DAX1* protein expression in two deoxycorticosterone-secreting adenomas and low expression in 20 cortisol-secreting adenomas {Shibata, 2001 #82}.

SF1, *DAX1*, and β -catenin are important for adrenocortical development and are coexpressed in adrenal subcapsular region, which denotes likely physiological interaction in the maintenance of adrenal stem/progenitor cells niche {Kim, 2008 #79; Scheys, 2011 #50; Simon, 2012 #171; Wood, 2011 #190}. There is a regulatory interaction of *SF1*, *DAX1* and the Wnt pathway with genes involved in stem cells maintenance such as *SOX2*, *NANOG* and *STAT3* {Marucci, 2014 #188; Kelly, 2011 #189; Doghman, 2007 #171; Niakan, 2005 #67; Zhang, 2015 #186}. A recent study reported that *STAT3* protein staining was positive in 19 of 24 (79%) ACCs whereas only 4 of 20 (20%) ACAs presented positive staining {Zhu, 2014 #183}. There are no available data concerning *NANOG* or *SOX2* expression in ACTs.

In this study, we aimed to evaluate the involvement of *DAX1*, *SF1* and genes involved in stem cells maintenance (*STAT3*, *NANOG* and *SOX2*) in the pathogenesis of ACTs and its relationship with abnormalities of the Wnt/beta-catenin pathway.

MATERIAL AND METHODS

Patients

We evaluated 88 patients (70 pediatric/ 18 adult) with ACT diagnosed between 1991 and 2014 and followed at two reference centers in southeastern Brazil (School of Medicine of Ribeirao Preto and School of Medicine of Sao Paulo – University of Sao Paulo; and Boldrini Children's Center, Campinas). Routine diagnostic tests and imaging evaluations were performed before surgical treatment and the patients were followed up after surgery, as previously reported {Leal, 2011 #9;Mermejo, 2014 #142;Gomes, 2014 #167}. ACT disease stage were classified accordingly to Sandrini's classification {Sandrini, 1997 #2} and Macfarlane modified by Sullivan staging {Sullivan, 1978 #12} for children and adults, respectively. In adult ACT, the Weiss score was assessed to classify ACA (score < 3) or ACC (score ≥ 3) {Lau, 2009 #32}. In the pediatric group, we also assessed the Weiss score but did not categorize ACTs as ACA or ACC according to this criterion because it is not entirely applicable and does not accurately predict clinical outcomes for children {Lau, 2009 #32}. Twenty-six normal adrenal cortices were used as controls: 12 pediatric specimens obtained after surgical treatment of Wilms tumor and 14 specimens from adult subjects who had sudden death and were underwent routine autopsy. This study was approved by the local Ethics Committee (HCRP Process 3019/2013). Informed written consent was obtained from patients and controls or their parents.

Detailed Clinical and Pathological Characteristics of the Patients

Pediatric Patients

We evaluated 70 children (77% female) with median age at the diagnosis of 1.8 years (0.4-15.5 years). Fifty-one patients (72%) were diagnosed in the first five years of life, 12 of them (17%) in the first year. Virilization due to androgens excess was the most common clinical manifestation in this group and it was observed in 67 patients (96%), 34 patients with androgens-secreting tumors and 33 patients with mixed cortisol and androgens-secreting tumors (mixed tumors). Only an 11 year-old girl

presented with Cushing syndrome without virilization at diagnosis (patient #10, **Supplementary Table 1**) and only 2 patients presented with non-secreting ACT, which were incidentally discovered (patients #41 and #63, **Supplementary Table 1**). The germline p.R337H P53 mutation was detected in 59 pediatric patients (84%) and somatic *CTNNB1* exon 3 mutations were found in 9 pediatric ACTs (12%; **Supplementary Table 1**).

Complete clinical and pathological features including sex, age, clinical presentation, *TP53* and *CTNNB1* mutational status, tumor stage, treatments and outcome are described in **Supplementary Table 1**. Part of these clinical data had been previously reported {Gomes, 2014 #167; Leal, 2011 #9}.

Adult Patients

We evaluated 18 adults (89% female) with a median age at the diagnosis of 42.5 years (21-66 years). Ten patients (55%) were older than 40 years. Cortisol-secreting tumors were found in 14 patients (77%), being 50% of the mixed tumors. Two patients presented with androgens-secreting tumors and the other two patients had non-secreting tumors. According to the Weiss score, 44% of these tumors were carcinomas. The germline *TP53* p.R337H mutation was detected in 4 patients (22%) and *CTNNB1* exon 3 mutations were detected in 7 patients (39%).

Clinical and pathological features including sex, age, clinical presentation, tumor stage, treatment and outcome are described in **Supplementary Table 2**.

RNA extraction, DNase digestion and cDNA synthesis

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen®, Karlsruhe, Germany) according to manufacturer's protocol. RNA integrity was checked according to the 28S/18S rate, with an acceptable range of 1.6 to 2.0 and confirmed by 1.2% agarosis gel. RNA concentrations were quantified by spectrometry (Nanodrop2000, Thermo Fisher Scientific Inc, Waltham, MA, USA). To guarantee a pure RNA without DNA contamination, RNA samples (1µg) were exposed to DNase (1µL) for 15 min at room temperature, after it was inactivated with 1 µL EDTA 25mM for 10 min at 65° C. Total RNA was reverse transcribed using MultiScribe™ enzyme and the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Life Technologies). cDNA was diluted (1:5) for quantitative Real time - PCR (qPCR).

mRNA Quantification by Real-Time PCR (qPCR)

The mRNA expression levels were performed in duplicate using TaqMan assay (Life Technologies, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's recommendation. The target genes evaluated were: *SF1/NRA51* (Hs_00610436), *DAX1/NR0B1* (Hs00230864_m1), *STAT3* (Hs01047580_m1) and *NANOG* (Hs04260366_g1). The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method was used to determine relative mRNA expression. The results were normalized with *GUSB* (Hs99999908_m1) as endogenous control. The median value obtained from the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of tumoral tissue was compared with the median value obtained from $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of controls, obtaining the value which shows the number of times (fold change) that the gene is hyper or hypo expressed in tumoral tissue compared with normal tissue {Livak, 2001 #105}.

DNA extraction

Genomic DNA from tumors and normal adrenal tissues were extracted using the QIAmp® DNA Mini Kit (QIAGEN Inc.,Valencia,CA) following the manufacturer's protocol. We used the Bioanalyzer to verify the integrity and quality of samples. DNA concentrations were quantified by fluorimetry Qubit® assay (Invitrogen) using the Qubit® dsDNA HS Assay kit (Life Technologies).

Multiplex Ligation Probe Amplification (MLPA)

MLPA was used to evaluate the copy number variation of the genes *DAX1* and *SF1* with the SALSA MLPA kit P185-B2 Intersex® (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands), according to the manufacturer's protocol. Beyond of target genes, this kit contains probes for other important genes for sexual differentiation, such as *WNT4*, *SOX9*, *PHEX*, *SRY*, *ZFY* and *UTY*. Separation and relative quantification of the amplification products were carried out using an ABI Prism 3130 Genetic Analyzer® (Applied Biosystem, Foster City, California, USA). Normal adrenal samples of male subjects were used as controls for the analysis. We evaluated 26 ACT samples: 14 pediatric (10 females and 4 males) and 12 adult ACT (10 females and 2 males). Data were analysed using COFFALYSER MLPA data analysis software (MRC- Holland, Amsterdam, the Netherlands). Normalized relative values ranging from 0.7 to 1.3 corresponded to two copies of each gene in the genotype, except for the genes of chromosomes X and Y, which corresponded to one gene copy in the genotype. This confidence interval was established by data obtained with five controls in each MLPA assay.

Immunohistochemistry (IHC) analysis

IHC studies were performed in a subset of 45 ACT samples (29 pediatric / 16 adult). Paraffin-embedded sections were deparaffinized, rehydrated, submitted to antigen retrieval with Diva Decloaker®, 10X (pH 6.0) in water bath at 90 °C with subsequent cooling with distilled water blocking of the endogenous peroxidases for 20 minutes, blocking nonspecific proteins for 30 minutes and then incubated with primary antibodies anti-SF1 (PP-N1665-00) and anti-DAX1 (ab-60144) for 1 h at room temperature, followed by application of the polymer at room temperature for 30 minutes. The nuclear and/or cytoplasmic labeling was developed with diaminobenzidine substrate (DAB) and counterstained with Harri's hematoxylin. As negative controls, all specimens were incubated with an isotype-matched control antibody under identical conditions. Preparations for each marker were evaluated randomly in at least 10 representative high-power fields (x400) by an experienced pathologist (L.N.R.). Two samples stained for SF1 had to be excluded due to bending the material during preparation. A picture of the positive controls of these antibodies is shown in Supplementary Data (figure 4).

The intensity score of nuclear staining for SF1 and DAX1 was classified in scale ranging from 0 (absent) to 3 (strong). In addition, the percentage of positive tumor cells was calculated in each tumor sample and it was scored as follows: 0% score 0; 1 to 9%, score 0.1; 10-49% score 0.5; $\geq 50\%$ score 1.0. Then, this positivity score (0, 0.1, 0.5 or 1) was multiplied by the intensity score (0, 1, 2 or 3) in order to obtain a final semi quantitative score (score H), which ranges from 0 to 3.

PNU-74654 treatment in NCI-H295 cells

The NCI-H295 adrenocortical tumor cell line was kindly provided by Professor Claudimara Lofti (University of Sao Paulo). Cells were cultured in RPMI 1640 medium (GIBCO, Life Technologies, Foster City, CA) supplemented with 2% fetal bovine serum (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), 1% ITS Premix (BD Biosciences) and 1% penicillin/streptomycin (100 mg/mL; GIBCO Life Technologies). Cells were maintained under standard conditions at 37° C in a humidified atmosphere (5% CO₂ - 95% air) and were harvested weekly. The presence of the p.S45P beta-catenin mutation was confirmed in our own stock of NCI-H295 cells, which constitutively activates the Wnt/beta-catenin pathway signaling.

To assess the potential interaction between a specific beta-catenin mutation (p.S45P) and *NANOG* mRNA expression, we analyzed *NANOG* mRNA levels in NCI-H295 cells under basal conditions and 48h after treatment with vehicle and increasing doses of PNU-74654 (Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA). PNU-74654 inhibits the Wnt/beta-catenin signaling by preventing the interaction of T cell factor (Tcf) and beta-catenin. PNU-74654 compound was resuspended in Dymetil sufoxide (DMSO; Sigma Aldrich) at stock concentrations of 31.2mM and 0.16% DMSO was used as vehicle. For working solutions, PNU-74654 was diluted 100X in growth medium and then diluted to 10μM, 50μM and 100μM concentrations. Total RNA from NCI-H295 cells was isolated using TRIzol® according to manufacturer's protocol (Life Technologies). RNA extraction and cDNA synthesis were performed as describe above. For quantitative Real-Time PCR (qPCR), TaqMan® assay *NANOG* (Hs04260366_g1) was used according to the manufacturer's recommendation using cDNA (diluted 1:5) as template. Relative expression values were determined by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method using *GUSB* (ID: 4326320E) as endogenous control.

Statistical analysis

Mann-Whitney test was used for comparisons of mRNA expression levels between ACT samples and controls. Kruskal-Wallis test was used for comparisons between mRNA expression and different tumor stages. Spearman's test was used to analyze the correlations between the gene expressions. Log-rank test and Kaplan-Meier plot were used to analyze association between gene expressions and overall survival. For survival analysis, ACT samples were categorized as hypo or hyperexpressed for each gene. ACT samples presenting mRNA expression under and over of the median of $2^{-\Delta\Delta Ct}$ of the control group were considered hypoexpressed and hyperexpressed, respectively. One-way ANOVA followed by Holm-Sidak's multiple comparisons post-test were used to evaluate differences among vehicle and all PNU-74654 concentrations. Non-continuous variables were expressed in the plots as median and interquartile range and continuous variables were expressed as median and standard error (SEM). The significant limit for all tests was established in 95% ($P \leq 0.05$). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA).

RESULTS

Ex vivo data

mRNA expression

Normal Adrenal Cortices (controls)

We compared the mRNA expression levels of all analyzed genes between pediatric (n=12) and adult (n=14) adrenal control samples (**Supplementary Data**). There was no difference in the mRNA expression of *SF1* (pediatric vs adults: 1.00 [0.02 - 1.75] vs. 0.85 [0.03 - 1.64]; $P=0.92$), *DAX1* (pediatric vs. adults: 1.01 [0.58 - 5.01] vs. 0.90 [0.01 - 3.90]; $P=0.10$) and *STAT3* (pediatric vs. adults: 1.00 [0.12 - 1.95] vs. 1.21 [0.05 - 5.67]; $P=0.60$). Therefore, all the analyses were conducted using adult and pediatric controls combined.

Pediatric ACT

Pediatric ACT presented lower mRNA expression levels of *SF1* ($P < 0.01$) than normal adrenal cortices (**Figure 1A**). *DAX1* mRNA expression levels did not differ between pediatric ACT and controls ($P=0.65$; **Figure 1B**). Mixed-secreting tumors presented higher *SF1* and *DAX1* mRNA expression levels than isolated cortisol or androgen-secreting tumors ($P= 0.01$ and $P= 0.03$, respectively; **Figures 2A and 2B**). There was a positive correlation between *DAX1* and *SF1* mRNA expression (Spearman's correlation, $r= 0.63$; $P = 0.01$; **Figure 1C**). Regarding the mRNA expression of stem cell maintenance transcription factors, pediatric ACT presented lower mRNA expression of *SOX2* than controls ($P < 0.01$; **Figure 1E**), while the expression of *STAT3* and *NANOG* did not differ between ACTs and controls ($P=0.31$ and $P = 0.48$, respectively; **Figures 1D and 1F**).

Adult ACT

There was no difference of the *SF1* mRNA expression levels between adult ACTs and the normal adult adrenal cortices ($P= 0.48$; **Figure 1A**). Adult ACTs presented higher mRNA expression levels of *DAX1* ($P < 0.01$; **Figure 1B**) than normal adrenal cortices. In addition, adult ACTs presented higher mRNA expression levels of *DAX1* than pediatric ACTs ($P < 0.01$). *SF1* and *DAX1* mRNA expression levels did not differ among all secretion types of tumors. Differentially from pediatric ACTs, in adult ACTs, *DAX1* mRNA expression levels did not correlated with *SF1* mRNA expression levels

(Spearman's correlation, $r = 0.09$; $P = 0.70$). Regarding the mRNA expression of stem cell maintenance transcription factors, adult ACTs presented lower mRNA expression levels of *SOX2* ($P < 0.01$; **Figure 1E**) than normal adrenal cortices. *STAT3* and *NANOG* did not differ ($P = 0.15$ and $P = 0.85$, respectively; **Figures 1D and 1F**) between adult ACTs and the normal adrenal cortices. Cortisol-secreting tumors presented higher *STAT3* mRNA expression levels than other secreting tumors ($P = 0.01$; **Figure 2C**). Among the adult ACT group, *STAT3* mRNA expression levels were higher in ACAs than in ACCs ($P < 0.01$; **Figure 3A**). Although, neither ACA nor ACC groups had *STAT3* mRNA expression levels distinguished from normal adult adrenal cortices ($P = 0.13$ and $P = 0.77$, respectively). Furthermore, survival time was not different regarding the *STAT3* mRNA expression levels (log-rank test, $P = 0.87$; **Figure 3B**). mRNA expression levels of *NANOG* were higher among patients carrying the p.S45P *CTNNB1* mutation ($P < 0.01$), in both adults and children (**Figure 4A**). No differential mRNA expression was observed in association with *TP53* p.R337H. No association was observed among mRNA expression of any gene of this study, stage of the tumor and overall survival neither in the adult nor pediatric ACT groups.

IHC

Pediatric Patients

IHC for SF1 and DAX1 was evaluated in a subset of pediatric ACTs. Moderate or strong nuclear SF1 staining was found in 21 out of 27 (78%) samples (**Figures 5 and 6**). In addition, according to the positivity score, 63% of these samples presented a diffuse staining pattern. Moderate or strong nuclear DAX1 staining was found in 14 out of 29 samples (48%) and diffuse pattern was observed in 41% of these samples. Moderate to strong nuclear SF1 staining was found in 6 out of 10 samples presenting increased *SF1* copy number variation (see MLPA results). Fisher's exact test showed a trend of association between moderate to strong nuclear SF1 staining and tumor stage I according to Sandrini's classification in pediatric ACT ($P = 0.06$). Neither DAX1 nor SF1 staining pattern were associated with clinical phenotype or outcome.

Adult Patients

IHC for SF1 and DAX1 was evaluated in a subset of adult ACT (11 ACAs, 5 ACCs) samples (**Figures 5 and 6**). Moderate or strong nuclear SF1 staining was found in 4 out of 16 samples (25%), all of them ACAs. Among the ACA group, a diffuse pattern was observed in 2 out of 4 samples. Moderate or strong nuclear DAX1 staining was

not found in adult samples, whereas weak DAX1 nuclear staining was found in 68% of the samples. There was a positive correlation between the staining pattern of SF1 and the mRNA expression levels of *STAT3* (Spearman's correlation, $r = 0.70$; $P < 0.01$).

According to the H score ACTs were classified as positive (moderate or strong nuclear staining) or negative (absent or weak nuclear staining). Positive SF1 staining was more frequent in the pediatric group than in the adult group (67% vs. 19%, Fisher's exact test: $P < 0.01$). Similarly, DAX1 moderate to strong nuclear staining was also found more frequently in the pediatric group, than in adult group (45% vs. 0%, Fisher's exact test: $P < 0.01$).

DAX1 and SF1 staining was not associated neither with clinical phenotype nor with outcome in both pediatric and adult ACT patients.

MLPA

Increased *SF1* copy number was detected in 10 out 14 pediatric ACTs (71%), being complete (all exons) in 4 samples and partial (2 to 6 exons) in 6 samples. In adults ACTs, increased *SF1* copy number was found in 4 out 12 samples (33%), being complete in 3 samples, all of them were ACCs. Reduced *DAX1* copy number was shown in 1 pediatric and 1 adult ACT, both females. Interestingly, 3 pediatric ACTs presented reduced copy number in the promoter region of *DAX1*. Increased *DAX1* copy number was detected in 1 male adult ACT. A summary of these results is shown in **table 1**.

In both, pediatric and adult groups, *SF1* mRNA expression levels did not differ between ACTs with increased *SF1* copy number compared with ACTs without *SF1* amplification ($P = 0.86$ and $P = 0.08$, respectively). Similarly, there was no association between *DAX1* copy number variations and *DAX1* mRNA levels neither pediatric nor in adult ACTs. No *SF1* deletion was observed. Graphics exemplifying the MLPA results are shown in the **Supplementary Data**.

In vitro data

Effect of the inhibition of the Wnt/beta-catenin signaling by PNU-7654 on NANOG mRNA expression in H295 cells

NANOG mRNA expression in NCI-H295 cells was detected under basal conditions. We observed decreased *NANOG* mRNA expression 48h after treatment with 50 and 100 μ M PNU-74654 (25% and 46% of reduction, respectively; ANOVA: $P < 0.01$; **Figure 4B**).

DISCUSSION

In the present study, we analyzed in adrenocortical tumorigenesis the role of SF1 and DAX1, which are key transcription factors involved in adrenal embryogenesis. Moreover, we also evaluated in pediatric and in adult ACTs the expression pattern of *STAT3*, *NANOG* and *SOX2* genes, which are essential for stem cell maintenance. We found that most pediatric ACTs presented increased *SF1* copy number variation and moderate to strong SF1 nuclear staining despite the low *SF1* mRNA levels observed in most samples. On the other hand, adult ACTs exhibited lower SF1 copy number variation, less frequent SF1 staining and no differential *SF1* mRNA expression. In pediatric ACTs, *DAX1* mRNA expression did not differ from control adrenals but positive DAX1 staining was observed in 48% of the samples. Conversely, in adult ACTs we observed high *DAX1* mRNA expression levels, but weak DAX1 nuclear staining in 73% of the samples. In both groups, most tumors exhibited decreased expression of *SOX2* mRNA but no differential expression of *STAT3* was observed. Particularly, increased mRNA expression of *NANOG* was found in the subset of ACTs harboring the p.S45P beta-catenin mutation.

We found moderate to strong nuclear SF1 staining in 77% of pediatric ACTs and less frequently in tumor from adult patients (25%). Nuclear SF1 staining detected by immunohistochemistry appear to be more frequent in pediatric ACTs than in adult ACTs {Almeida, 2010 #162}. In pediatric patients, neither the pattern of SF1 staining nor the mRNA expression was associated with overall survival or disease-free survival. Previous reports analyzing SF1 in pediatric ACT had not evaluated whether SF1 expression associates with survival or outcome {Pianovski, 2006 #163}. In contrast, strong SF1 nuclear staining, which has been found in 19-35% of the adult tumors, has been associated with poor prognosis in ACCs but not in ACAs {Sbiera, 2010 #160; Duregon, 2013 #195; Almeida, 2010 #162}. In our series of adult patients, we did not find this association probably due to the small number of adult patients enrolled. Among our adult patients analyzed by IHC only two of them died, one of them presenting low and the other negative SF1 staining. Relatedly, these two patients had ACTs carrying amplification in the *SF1* gene. Moderate to strong SF1 nuclear staining was found in only three adult ACT patients and all of them were ACA.

By means of MLPA analysis, we found increased copy number variation of *SF1* gene in 71% of pediatric ACTs (complete in 29% and partial in 42% of the tumors) and in 33% of adult ACTs (complete in 25% and partial in 8% of the tumors). These

findings are in agreement with previous report that analyzed abnormalities in the *SF1* in both pediatric and adults ACTs {Almeida, 2010 #162}. Additionally, it was described that pediatric ACTs showed amplification of *SF1* in 8 out of 9 samples using fluorescent *in situ* hybridization (FISH) and this finding was further confirmed by the same group {Pianovski, 2006 #163;Figueiredo, 2005 #159}. Another group, analyzing 17 ACT pediatric patients, using MLPA and qPCR found amplification in 47% of the samples. However, it was not reported whether *SF1* amplification was partial or complete {Almeida, 2010 #162}.

It is not known whether the increased *SF1* protein expression in ACTs is related to increased *SF1* gene transcription. Compared with the mRNA levels in normal adrenal cortices, we found decreased *SF1* mRNA levels in pediatric ACTs, in spite of moderate to strong nuclear *SF1* staining in most tumors. Therefore, the mechanism underlying higher *SF1* protein levels appears not to be linked to increased *SF1* gene transcription. One possibility is that the increased *SF1* copy number can be involved. In addition, there may exist a feedback mechanism involved, in this model higher *SF1* protein levels would inhibit *SF1* gene transcription. Alternatively, *SF1* degradation may be reduced in ACTs due to posttranslational modification. Reinforcing the feedback theory, many mechanisms have been found uncovering the regulatory systems involved in RNA degradation {Houseley, 2009 #176;Maekawa, 2015 #178} and their intricate interaction with proteins and ribonucleoprotein complexes, which mediate communication between upstream and downstream steps, providing both feed forward and feedback information {Moore, 2009 #177}.

We found that *SF1* mRNA expression correlated positively with *DAX1* mRNA expression in pediatric ACTs. This finding probably reflects the interaction of the *SF1* with the *SF1* response element in the *DAX1* promoter, which binds *SF1* specifically and up regulates *DAX1* gene expression {Vilain, 1997 #175}. In addition, in high doses, *DAX1* can also recruit coactivators and stimulate *SF1* expression {Xu, 2009 #74}. Therefore, the positive correlation between *SF1* and *DAX1* mRNA expression and the high expression of both *SF1* and *DAX1* proteins in pediatric ACTs suggest a mutual stimulating regulation between these transcription factors in pediatric ACT tumorigenesis. Supporting this hypothesis, a recent study evaluating 34 pediatric ACTs has also found a positive correlation between *SF1* and *DAX1* proteins in pediatric ACTs {de Sousa, 2015 #194}.

We did not find differential *DAX1* mRNA levels between pediatric ACTs and controls. On the other hand, *DAX1* mRNA expression was higher in adult ACTs than in

controls. Regarding the protein levels, we observed 48% of the pediatric ACTs exhibiting moderate or strong DAX1 nuclear staining whereas, in adult ACTs, no moderate or strong DAX1 nuclear staining was observed. These findings were also recently found in another study showing that strong *DAX1* expression was more frequent in pediatric than in adult ACTs (74% vs. 24%, respectively) {de Sousa, 2015 #194}. Thus, as we observed in the *SF1* analysis, there is an apparent discordance between *DAX1* mRNA and protein levels but in another way. In adult ACTs, increased *DAX1* mRNA expression was found in tumors with weak or absent DAX1 staining. It is possible that post-transcription mechanisms inhibit *DAX1* mRNA translation or that post-translation mechanisms accelerate its degradation.

SF1 is a key transcription factor involved in adrenal transcription of several steroidogenic enzymes and is also important in ACTH signaling requires the action of steroidogenic factor 1 (SF1) {Miller, 2013 #196; Schimmer, 2010 #198}. Considering the steroids profile, we observed that pediatric cortisol-secreting ACTs presented higher *SF1* and *DAX1* mRNA expression levels than androgen-secreting tumors. An *in vitro* study has shown that increased SF1 levels selectively modulate the steroid secretion profile of adrenocortical cells, reducing cortisol and aldosterone production and maintaining dehydroepiandrosterone sulfate secretion {Doghman, 2007 #171}. There are no studies analyzing the association between steroids secretion pattern and mRNA expression. One previous study reported an association between positive SF1 staining with androgen secretion {Almeida, 2010 #162}. Another study did not find association between steroid secretion profile and *SF1* amplification or SF1 protein expression {Pianovski, 2006 #163}.

We found higher *STAT3* mRNA expression levels in ACA than in ACC in adult patients. Moreover, SF1 staining positively correlated with *STAT3* mRNA expression. An *in vivo* study has suggested that overexpression of SF1 protein may trigger adrenal tumor formation {Doghman, 2007 #171}. In this study, *Sf1* transgenic mice (*Sf1* TR) rapidly developed adrenocortical nodular hyperplasia with subsequent tumor formation, due to high *Sf1* protein levels and it occurred in a manner that was not directly proportional to copy number gene. Furthermore, the same study revealed that phosphorylated Stat3 is expressed in the subcapsular region of the adrenal cortex in young *Sf1* TR mice {Doghman, 2007 #171}. Phosphorylation of Stat3 has important oncogenic properties {Bromberg, 1999 #173}. In the *Sf1* TR model, local cytokine and inflammatory pathways activated during *Sf1* TR-induced transformation of adrenocortical cells likely increased Stat3 phosphorylation {Doghman, 2007 #171}.

Altogether, these data may suggest that the high SF1 protein levels may occur as an initial event of adrenocortical tumorigenesis in adult patients. We found lower expression of SOX2 mRNA in both pediatric and adult ACTs, but these findings did not associated with any clinical phenotype or outcome. SOX2 is a transcriptional factor required for the maintenance of embryonic pluripotent stem cells {Takahashi, 2006 #184}, which have been associated with cancer stem cells in various sites such as testis, pituitary, lung {Mertens, 2015 #180; Mizrak, 2010 #181; Chen, 2012 #182; Pietanza, 2012 #183}.

NANOG is a transcription factor that confers self-renewal to embryonic cells and maintain its pluripotency state {Jeter, 2015 #202}. Overall, we did not observe differential *NANOG* mRNA expression in most ACTs. However, in the subset of ACTs harboring the p.S45P beta-catenin mutation, *NANOG* mRNA expression was five times greater than in the beta-catenin wild-type tumors or in ACTs harboring other beta-catenin mutations. To investigate this apparently specific interaction between this specific somatic beta-catenin mutation and *NANOG*, we performed *in vitro* studies using the NCI-H295 cell line, which carries the p.S45P beta-catenin mutation. We observed a dose-dependent decrease of *NANOG* mRNA expression in NCI-H295 cell line 48h after blocking the Wnt/beta-catenin pathway with 10-100 μ M PNU-74654 treatment. In agreement, a recent study also showed reduction of *NANOG* mRNA expression after inhibition of the Wnt pathway in lung cell lines {Zhang, 2015 #186}. Apparently, there is a specific beta-catenin mutation in ACTs that triggers *NANOG* mRNA expression. However, currently we do not have an explanation to this interesting finding, which deserves further investigation.

CONCLUSIONS

Adrenocortical tumorigenesis occurs differentially in adults and children but both in an intricate manner. Increased SF1 gene amplification and increased SF1 staining are common in pediatric ACTs, event in the absence of increased SF1 mRNA expression. In these tumors, strong DAX1 staining was frequent suggesting a bidirectional mutual activation with SF1.

REFERENCES

- Almeida, M.Q., and Latronico, A.C. (2007). The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res* 39, 461-466.
- Almeida, M.Q., Soares, I.C., Ribeiro, T.C., Fragoso, M.C., Marins, L.V., Wakamatsu, A., Ressio, R.A., Nishi, M.Y., Jorge, A.A., Lerario, A.M., *et al.* (2010). Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, 1458-1462.
- Antonini, S.R.L., L.F. and Cavalcanti, M.M. (2014). Pediatric adrenocortical tumors: diagnosis, management and advancements in the understanding of the genetic basis and therapeutic implications. *Expert Reviews of Endocrinology & Metabolism* 9, 445-464.
- Assie, G., Letouze, E., Fassnacht, M., Jouinot, A., Luscap, W., Barreau, O., Omeiri, H., Rodriguez, S., Perlemoine, K., Rene-Corail, F., *et al.* (2014). Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* 46, 607-612.
- Bonnet, S., Gaujoux, S., Launay, P., Baudry, C., Chokri, I., Ragazzon, B., Libe, R., Rene-Corail, F., Audebourg, A., Vacher-Lavenu, M.C., *et al.* (2010). Wnt/{beta}-Catenin Pathway Activation in Adrenocortical Adenomas Is Frequently due to Somatic CTNNB1-Activating Mutations, Which Are Associated with Larger and Nonsecreting Tumors: A Study in Cortisol-Secreting and -Nonsecreting Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*.
- Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C., and Darnell, J.E., Jr. (1999). Stat3 as an oncogene. *Cell* 98, 295-303.
- Chen, S., Xu, Y., Chen, Y., Li, X., Mou, W., Wang, L., Liu, Y., Reisfeld, R.A., Xiang, R., Lv, D., *et al.* (2012). SOX2 gene regulates the transcriptional network of oncogenes and affects tumorigenesis of human lung cancer cells. *PLoS One* 7, e36326.
- de Sousa, G.R., Soares, I.C., Faria, A.M., Domingues, V.B., Wakamatsu, A., Lerario, A.M., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Mendonca, B.B., Fragoso, M.C., *et al.* (2015). DAX1 Overexpression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Synergic Role with SF1 in Tumorigenesis. *Horm Metab Res*.
- Doghman, M., Karpova, T., Rodrigues, G.A., Arhatte, M., De Moura, J., Cavalli, L.R., Virolle, V., Barbry, P., Zambetti, G.P., Figueiredo, B.C., *et al.* (2007). Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol* 21, 2968-2987.
- Duregon, E., Volante, M., Giorcelli, J., Terzolo, M., Lalli, E., and Papotti, M. (2013). Diagnostic and prognostic role of steroidogenic factor 1 in adrenocortical carcinoma: a validation study focusing on clinical and pathologic correlates. *Hum Pathol* 44, 822-828.
- Figueiredo, B.C., Cavalli, L.R., Pianovski, M.A., Lalli, E., Sandrini, R., Ribeiro, R.C., Zambetti, G., DeLacerda, L., Rodrigues, G.A., and Haddad, B.R. (2005). Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 90, 615-619.
- Figueiredo, B.C., Stratakis, C.A., Sandrini, R., DeLacerda, L., Pianovsky, M.A., Giatzakis, C., Young, H.M., and Haddad, B.R. (1999). Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 84, 1116-1121.
- Garritano, S., Gemignani, F., Palmero, E.I., Olivier, M., Martel-Planche, G., Le Calvez-Kelm, F., Brugieres, L., Vargas, F.R., Brentani, R.R., Ashton-Prolla, P., *et al.* (2010). 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* 31, 143-150.
- Gaujoux, S., Grabar, S., Fassnacht, M., Ragazzon, B., Launay, P., Libe, R., Chokri, I., Audebourg, A., Royer, B., Sbiera, S., *et al.* (2011). beta-catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res* 17, 328-336.

- Gomes, D.C., Leal, L.F., Mermejo, L.M., Scrideli, C.A., Martinelli, C.E., Jr., Fragoso, M.C., Latronico, A.C., Tone, L.G., Tucci, S., Yunes, J.A., *et al.* (2014). Sonic hedgehog signaling is active in human adrenal cortex development and deregulated in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 99, E1209-1216.
- Houseley, J., and Tollervey, D. (2009). The many pathways of RNA degradation. *Cell* 136, 763-776.
- James, L.A., Kelsey, A.M., Birch, J.M., and Varley, J.M. (1999). Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *British journal of cancer* 81, 300-304.
- Jeter, C.R., Yang, T., Wang, J., Chao, H.P., and Tang, D.G. (2015). Concise Review: NANOG in Cancer Stem Cells and Tumor Development: An Update and Outstanding Questions. *Stem Cells*.
- Kelly, V.R., and Hammer, G.D. (2011). LRH-1 and Nanog regulate Dax1 transcription in mouse embryonic stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 332, 116-124.
- Kim, A.C., Reuter, A.L., Zubair, M., Else, T., Serecky, K., Bingham, N.C., Lavery, G.G., Parker, K.L., and Hammer, G.D. (2008). Targeted disruption of beta-catenin in Sf1-expressing cells impairs development and maintenance of the adrenal cortex. *Development* 135, 2593-2602.
- Lala, D.S., Rice, D.A., and Parker, K.L. (1992). Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. *Mol Endocrinol* 6, 1249-1258.
- Lalli, E., and Figueiredo, B.C. (2015). Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 23.
- Latronico, A.C., Pinto, E.M., Domenice, S., Fragoso, M.C., Martin, R.M., Zerbini, M.C., Lucon, A.M., and Mendonca, B.B. (2001). An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 86, 4970-4973.
- Lau, S.K., and Weiss, L.M. (2009). The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Human pathology* 40, 757-768.
- Leal, L.F., Mermejo, L.M., Ramalho, L.Z., Martinelli, C.E., Jr., Yunes, J.A., Seidinger, A.L., Mastellaro, M.J., Cardinalli, I.A., Brandalise, S.R., Moreira, A.C., *et al.* (2011). Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 96, 3106-3114.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Maekawa, S., Imamachi, N., Irie, T., Tani, H., Matsumoto, K., Mizutani, R., Imamura, K., Kakeda, M., Yada, T., Sugano, S., *et al.* (2015). Analysis of RNA decay factor mediated RNA stability contributions on RNA abundance. *BMC Genomics* 16, 154.
- Marucci, L., Pedone, E., Di Vicino, U., Sanuy-Escribano, B., Isalan, M., and Cosma, M.P. (2014). beta-catenin fluctuates in mouse ESCs and is essential for Nanog-mediated reprogramming of somatic cells to pluripotency. *Cell Rep* 8, 1686-1696.
- Mermejo, L.M., Leal, L.F., Colli, L.M., Fragoso, M.C.B.V., Latronico, A.C., Tone, L.G., Scrideli, C.A., Tucci, S., Martinelli, C.E., Yunes, J.A., *et al.* (2014). Altered expression of noncanonical Wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. *Clin Endocrinol* 81, 503-510.
- Mertens, F.M., Gremeaux, L., Chen, J., Fu, Q., Willems, C., Roose, H., Govaere, O., Roskams, T., Cristina, C., Becu-Villalobos, D., *et al.* (2015). Pituitary tumors contain a side population with tumor stem cell-associated characteristics. *Endocr Relat Cancer*.

- Miller, W.L. (2013). Steroid hormone synthesis in mitochondria. *Mol Cell Endocrinol* 379, 62-73.
- Mizrak, S.C., Chikhovskaya, J.V., Sadri-Ardekani, H., van Daalen, S., Korver, C.M., Hovingh, S.E., Roepers-Gajadien, H.L., Raya, A., Fluiter, K., de Reijke, T.M., *et al.* (2010). Embryonic stem cell-like cells derived from adult human testis. *Hum Reprod* 25, 158-167.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.
- Niakan, K.K., and McCabe, E.R. (2005). DAX1 origin, function, and novel role. *Mol Genet Metab* 86, 70-83.
- Pianovski, M.A., Cavalli, L.R., Figueiredo, B.C., Santos, S.C., Doghman, M., Ribeiro, R.C., Oliveira, A.G., Michalkiewicz, E., Rodrigues, G.A., Zambetti, G., *et al.* (2006). SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 42, 1040-1043.
- Pietanza, M.C., and Ladanyi, M. (2012). Bringing the genomic landscape of small-cell lung cancer into focus. *Nat Genet* 44, 1074-1075.
- Reincke, M., Beuschlein, F., Lalli, E., Arlt, W., Vay, S., Sassone-Corsi, P., and Allolio, B. (1998). DAX-1 expression in human adrenocortical neoplasms: implications for steroidogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 2597-2600.
- Ribeiro, R.C., Sandrini, F., Figueiredo, B., Zambetti, G.P., Michalkiewicz, E., Lafferty, A.R., DeLacerda, L., Rabin, M., Cadwell, C., Sampaio, G., *et al.* (2001). An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9330-9335.
- Rodriguez-Galindo, C., Figueiredo, B.C., Zambetti, G.P., and Ribeiro, R.C. (2005). Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Blood Cancer* 45, 265-273.
- Sandrini, R., Ribeiro, R.C., and DeLacerda, L. (1997). Childhood adrenocortical tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 82, 2027-2031.
- Sbiera, S., Schull, S., Assie, G., Voelker, H.U., Kraus, L., Beyer, M., Ragazzon, B., Beuschlein, F., Willenberg, H.S., Hahner, S., *et al.* (2010). High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 95, E161-171.
- Scheys, J.O., Heaton, J.H., and Hammer, G.D. (2011). Evidence of adrenal failure in aging Dax1-deficient mice. *Endocrinology* 152, 3430-3439.
- Schimmer, B.P., and White, P.C. (2010). Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. *Mol Endocrinol* 24, 1322-1337.
- Shibata, H., Ikeda, Y., Mukai, T., Morohashi, K., Kurihara, I., Ando, T., Suzuki, T., Kobayashi, S., Murai, M., Saito, I., *et al.* (2001). Expression profiles of COUP-TF, DAX-1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. *Mol Genet Metab* 74, 206-216.
- Simon, D.P., and Hammer, G.D. (2012). Adrenocortical stem and progenitor cells: implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 351, 2-11.
- Stiller, C.A. (1994). International variations in the incidence of childhood carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3, 305-310.
- Sullivan, M., Boileau, M., and Hodges, C.V. (1978). Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 120, 660-665.
- Tadjine, M., Lampron, A., Ouadi, L., and Bourdeau, I. (2008). Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 68, 264-270.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
- Tissier, F., Cavard, C., Groussin, L., Perlemoine, K., Fumey, G., Hagnere, A.M., Rene-Corail, F., Jullian, E., Gicquel, C., Bertagna, X., *et al.* (2005). Mutations of beta-catenin in

adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res* 65, 7622-7627.

Vilain, E., Guo, W., Zhang, Y.H., and McCabe, E.R. (1997). DAX1 gene expression upregulated by steroidogenic factor 1 in an adrenocortical carcinoma cell line. *Biochem Mol Med* 61, 1-8.

Wajchenberg, B.L., Albergaria Pereira, M.A., Medonca, B.B., Latronico, A.C., Campos Carneiro, P., Alves, V.A., Zerbini, M.C., Liberman, B., Carlos Gomes, G., and Kirschner, M.A. (2000). Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 88, 711-736.

Wood, M.A., and Hammer, G.D. (2011). Adrenocortical stem and progenitor cells: unifying model of two proposed origins. *Mol Cell Endocrinol* 336, 206-212.

Xu, B., Yang, W.H., Gerin, I., Hu, C.D., Hammer, G.D., and Koenig, R.J. (2009). Dax-1 and steroid receptor RNA activator (SRA) function as transcriptional coactivators for steroidogenic factor 1 in steroidogenesis. *Mol Cell Biol* 29, 1719-1734.

Zhang, X., Lou, Y., Zheng, X., Wang, H., Sun, J., Dong, Q., and Han, B. (2015). Wnt blockers inhibit the proliferation of lung cancer stem cells. *Drug Des Devel Ther* 9, 2399-2407.

Zhu, Y., Xu, Y., Chen, D., Zhang, C., Rui, W., Zhao, J., Zhu, Q., Wu, Y., Shen, Z., Wang, W., *et al.* (2014). Expression of STAT3 and IGF2 in adrenocortical carcinoma and its relationship with angiogenesis. *Clin Transl Oncol* 16, 644-649.

LEGENDS OF THE FIGURES

Figure 1: Relative mRNA expression levels of *SF1* (A), *DAX1* (B), *STAT3* (D), *NANOG* (E) and *SOX2* (F). Compared to normal adrenal cortices (controls), the mRNA expression of *SF1* and *SOX2* was lower in pediatric ACTs. The mRNA expression levels of *DAX1*, *STAT3* and *NANOG* did not differ between controls and pediatric ACTs. Compared to controls, Adult ACT presented higher mRNA expression of *DAX1*. There was no difference in the mRNA expression between normal adrenal cortices and adult ACTs of *SF1*, *STAT3* and *NANOG*. Positive correlation between *DAX1* mRNA and *SF1* mRNA levels (B). Values are reported as median $\pm$ interquartile range. * $P < 0.01$; NS: non-significant.

Figure 2: Pattern of tumor secretions varied in accordance with mRNA expressions. Differential expression between cortisol secreting (mixed and only cortisol-secreting) tumors and only androgen-secreting tumors in children: (A) *SF1* mRNA expression ($P = 0.01$); (B) *DAX1* mRNA expression ($P = 0.03$). (C) Cortisol-secreting tumors in adults presented higher *STAT3* mRNA expression levels than other secretion types of ACTs ($P = 0.01$). CS, Cortisol-secreting tumors; AS, androgen-secreting tumors; MS, mixed-secreting tumors; NS, Non-secreting tumors. Values are reported as median $\pm$ interquartile range.

Figure 3: Differential mRNA expression levels of *STAT3* higher in ACAs than in ACCs among adult patients (A). Kaplan-Meier plot and log Rank-test showed no association with between *STAT3* mRNA expression and overall survival in adult patients (B). mRNA expression levels are reported as median $\pm$ interquartile range.

Figure 4: Higher mRNA expression of *NANOG* in ACTs harboring the somatic p.S45P beta-catenin mutation than in wild type (WT) tumors or in tumors harboring other beta-catenin mutations (A). Reduction of *NANOG* mRNA expression in NCI-H295 cells 48h after treatment with 50 μ M and 100 μ M PNU-74654 (25% and 46%, respectively; ANOVA: $P < 0.01$) (B). Values are reported as mean $\pm$ SEM. NS: non-significant.

Figure 5: Immunohistochemistry analysis in ACTs. Representative images of SF1 staining (scale 100 μ m; inserts show higher magnification of highlighted areas). Pediatric adrenocortical tumors showing absence (A) or strong nuclear SF1 staining

(B). Adult adrenocortical tumors showing absence of nuclear SF1 staining (C) or strong nuclear SF1 staining (D). Protein staining was developed with DAB (brown) and counterstained with Harris' hematoxylin (blue). (E) Intensity, positivity and H scores of positive SF1 protein staining in pediatric and adult ACTs.

Figure 6: Immunohistochemistry: representative images of DAX1 staining (scale 100 mm; inserts show higher magnification of highlighted areas). Pediatric adrenocortical tumors showing absence (A) or strong nuclear DAX1 staining (B). Adult adrenocortical tumors showing absence of nuclear DAX1 staining (C) or weak nuclear DAX1 staining (D). Protein staining was developed with DAB (brown) and counterstained with Harris' hematoxylin (blue). (E) Intensity, positivity and H scores of positive DAX1 protein staining in pediatric and adult ACTs.

Table 1: Summary of copy number variation results by MLPA in Adrenocortical Tumors.

Copy Number Variations of Adrenocortical Tumors (ACTs)									
	Total coding region amplification		Partial coding region amplification		Total coding region deletion		Partial coding region deletion		Normal
	Pediatric	Adult	Pediatric	Adult	Pediatric	Adult	Pediatric	Adult	
SF1 (NR5A1)	4	3	6	1	-	-	-	4	Pediatric 14 Adult 8
DAX1 (NR0B1)	-	1	-	-	1	1	3	10	Pediatric 14 Adult 12

FIGURES

Figure 1

Figure 1: Relative mRNA expression levels of *SF1* (A), *DAX1* (B), *STAT3* (D), *NANOG* (E) and *SOX2* (F). Compared to normal adrenal cortices (controls), the mRNA expression of *SF1* and *SOX2* was lower in pediatric ACTs. The mRNA expression levels of *DAX1*, *STAT3* and *NANOG* did not differ between controls and pediatric ACTs. Compared to controls, Adult ACT presented higher mRNA expression of *DAX1*. There was no difference in the mRNA expression between normal adrenal cortices and adult ACTs of *SF1*, *STAT3* and *NANOG*. Positive correlation between *DAX1* mRNA and *SF1* mRNA levels (B). Values are reported as median $\pm$ interquartile range. * $P < 0.01$; NS: non significant.

Figure 2

Figure 2: Pattern of tumor secretions varied in accordance with mRNA expressions. Differential expression between cortisol secreting (mixed and only cortisol-secreting) tumors and only androgen-secreting tumors in children: (A) *SF1* mRNA expression ($P=0.01$); (B) *DAX1* mRNA expression ($P=0.03$). (C) Cortisol-secreting tumors in adults presented higher *STAT3* mRNA expression levels than other secretion types of ACTs ($P=0.01$). CS, Cortisol-secreting tumors; AS, androgen-secreting tumors; MS, mixed-secreting tumors; NS, Non-secreting tumors. Values are reported as median $\pm$ interquartile range.

Figure 3

Figure 3: Differential mRNA expression levels of *STAT3* higher in ACAs than in ACCs among adult patients (A). Kaplan-Meier plot and log Rank-test showed no association with between *STAT3* mRNA expression and overall survival in adult patients (B). mRNA expression levels are reported as median $\pm$ interquartile range.

Figure 4

Figure 4: Higher mRNA expression of *NANOG* in ACTs harboring the somatic p.S45P beta-catenin mutation than in wild type (WT) tumors or in tumors harboring other beta-catenin mutations (A). Reduction of *NANOG* mRNA expression in NCI-H295 cells 48h after treatment with 50 μ M and 100 μ M PNU-74654 (25% and 46%, respectively; ANOVA: $P < 0.01$) (B). Values are reported as mean $\pm$ SEM. NS: non significant.

Figure 5

Figure 5: Immunohistochemistry analysis in ACTs. Representative images of SF1 staining (scale 100 mm; inserts show higher magnification of highlighted areas). Pediatric adrenocortical tumors showing absence (A) or strong nuclear SF1 staining (B). Adult adrenocortical tumors showing absence of nuclear SF1 staining (C) or strong nuclear SF1 staining (D). Protein staining was developed with DAB (brown) and counterstained with Harris' hematoxylin (blue). (E) Intensity, positivity and H scores of positive SF1 protein staining in pediatric and adult ACTs.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Table 1. Clinical, pathological, molecular features and outcome of pediatric patients with adrenocortical tumors.

Patient ID	Gender	Age (years)	Clinical presentation	Tumor Stage	Recurrence/ Metastasis	Treatment	p.R337 H P53	β -catenin mutation	Overall Survival (months)	Death
1	F	1,5	M	III	No	SC	Yes	No	4,5	LF
2	F	1,9	M	I	No	S	Yes	No	103,9	No
3	F	0,4	M	I	No	S	Yes	No	100,3	No
4	M	3,0	M	I	Yes	SC	Yes	No	113,7	No
5	M	2,8	V	IV	Yes	SC	Yes	S45P	4,9	Yes
6	F	15,0	M	IV	Yes	SC	Yes	No	9,8	Yes
7	F	0,4	M	I	No	S	Yes	No	210,2	No
8	F	1,7	M	I	No	S	Yes	No	12,5	LF
9	M	6,8	M	I	Yes	SC	Yes	No	7,7	Yes
10	F	11,6	C	II	Yes	SC	No	S45P	212,1	No
11	F	1,8	V	I	No	S	Yes	No	67,9	LF
12	M	0,9	V	I	No	S	Yes	No	157,8	No
13	M	1,7	M	I	Yes	SC	Yes	No	155,9	LF
14	F	3,0	M	I	No	S	Yes	No	92,4	LF
15	F	7,0	M	III	Yes	SC	Yes	No	16,8	LF
16	F	7,8	M	IV	Yes	S	Yes	No	19,9	Yes
17	M	0,9	M	I	No	S	No	No	182,9	No
18	F	7,1	M	I	No	S	No	No	181,9	No
19	F	2,4	V	III	No	SC	Yes	No	190,5	No
20	M	15,5	M	IV	Yes	SC	Yes	S37C	9,3	Yes
21	F	1,8	M	III	No	S	Yes	No	17,2	LF
22	F	12,3	M	I	No	S	No	No	113,5	No
23	F	3,3	V	I	No	S	No	No	87,6	No
24	F	8,3	M	IV	Yes	S	Yes	No	23,3	Yes
25	M	2,3	M	I	No	S	Yes	No	230,1	No
26	M	2,8	M	I	No	S	Yes	No	145,8	No
27	F	5,5	M	IV	Yes	SC	Yes	No	15,5	Yes
28	F	1,4	M	I	No	S	Yes	S37C	58,1	No
29	F	2,8	M	I	No	S	Yes	No	56,7	No
30	M	0,8	M	I	No	S	Yes	S37C	100,4	No
31	F	0,8	V	I	No	S	Yes	No	51,6	No
32	F	1,5	V	III	No	SC	Yes	No	50,4	No
33	F	4,8	M	I	No	S	No	No	41,8	No
34	F	1,9	M	I	No	SC	Yes	No	42,9	No
35	F	1,7	M	I	No	S	Yes	S45P	26,2	No
36	F	1,2	M	I	No	S	Yes	No	24,4	No
37	M	1,1	V	III	No	SC	Yes	NA	174,4	No
38	F	9,1	V	I	No	S	No	NA	9,1	No
39	F	13,0	M	I	No	S	No	NA	9,7	No
40	F	6,5	M	I	Yes	SC	Yes	No	26,9	No
41	M	1,8	NS	IV	NA	NA	No	No	75,8	No

F, female; M, male; V, androgen secreting tumor; C, cortisol secreting tumor; M, mixed androgen plus cortisol secreting tumor; NS, not secreting tumor; S, surgery; SC, surgery plus chemotherapy; LF, lost of follow-up; NA, not available.

Supplementary Table 1. Clinical, pathological, molecular features and outcome of pediatric patients with adrenocortical tumors (continuation).

Patient ID	Gender	Age (years)	Clinical presentation	Tumor Stage	Recurrence/ Metastasis	Treatment	p.R337H P53	β -catenin mutation	Overall Survival (months)	Death
42	F	1,4	V	II	NA	NA	Yes	No	69,8	No
43	F	0,8	V	I	NA	NA	Yes	No	51,7	No
44	F	15,6	V	II	NA	NA	No	No	75,8	No
45	F	1,4	V	I	NA	NA	Yes	No	116,2	No
46	F	3,7	V	I	NA	NA	Yes	No	110,4	No
47	F	1,3	V	I	NA	NA	Yes	No	30,6	No
48	F	3,2	M	I	NA	NA	Yes	No	9,8	No
49	F	1,6	V	III	NA	NA	Yes	No	49,6	No
50	F	1,0	V	I	NA	NA	Yes	No	29,3	No
51	F	0,8	V	I	NA	NA	Yes	No	57,3	No
52	F	1,3	V	III	No	S	Yes	No	17	No
53	F	9,0	M	II	NA	NA	Yes	No	9,9	Yes
54	F	2,4	V	I	Yes	NA	Yes	S33F	15,7	Yes
55	M	1,0	V	II	NA	NA	Yes	No	16	No
56	M	4,3	V	III	No	NA	Yes	No	57,6	No
57	F	1,1	V	I	NA	NA	Yes	No	54,2	No
58	F	1,1	V	III	NA	NA	Yes	No	13	No
59	F	2,4	V	I	NA	NA	Yes	No	51,4	No
60	M	0,4	V	I	NA	NA	Yes	No	76,9	No
61	F	1,2	V	II	NA	NA	No	No	86,5	No
62	F	1,4	V	I	NA	NA	Yes	S45F	37,5	No
63	F	1,3	NS	I	NA	NA	Yes	No	19,4	No
64	F	1,8	M	I	NA	NA	Yes	No	7,7	No
65	M	1,1	V	IV	NA	NA	Yes	No	168,4	No
66	F	1,0	V	I	NA	NA	Yes	No	66,9	No
67	F	2,1	V	I	NA	NA	Yes	No	42,6	No
68	F	1,6	V	III	NA	NA	Yes	S37P	7,6	Yes
69	F	1,5	V	I	Yes	NA	Yes	No	97	No
70	F	7,7	V	II	NA	NA	Yes	No	35,7	No

F, female; M, male; V, androgen secreting tumor; C, cortisol secreting tumor; M, mixed androgen plus cortisol secreting tumor; NS, not secreting tumor; S, surgery; SC, surgery plus chemotherapy; LF, lost of follow-up; NA, not available.

Supplementary Table 2. Clinical, pathological, molecular features and outcome of adult patients with adrenocortical tumors.

Patient ID	Gender	Age (years)	Clinical presentation	Tumor Stage	Recurrence/ Metastasis	Treatment	p.R337H P53	β -catenin mutation	Overall Survival (months)	Death
1	F	28	C	II	No	S	No	No	96,7	No
2	F	55	C	II	No	S	No	S45P	97,7	No
3	F	53	C	II	No	S	No	P.S45_G50del	66,1	No
4	F	35	NS	II	No	S	No	No	58,1	No
5	M	43	M	IV	Yes	S	No	No	0,3	Yes
6	F	46	M	IV	Yes	SC	No	T41A	142,3	No
7	F	39	V	I	No	S	Yes	S37C/S45P	72,4	No
8	F	29	M	I	No	S	No	No	83,1	No
9	F	27	M	II	Yes	SC	Yes	S45F	17,3	Yes
10	F	21	C	I	No	S	No	No	64,2	No
11	F	42	M	IV	Yes	SC	No	S45P	45,1	No
12	M	56	M	IV	Yes	SC	No	NA	27,4	Yes
13	F	22	V	III	No	SC	Yes	No	21,6	No
14	F	59	C	I	No	S	No	S45P	31,1	No
15	F	55	M	II	No	SC	No	No	23,1	No
16	F	66	C	I	No	S	Yes	NA	40,6	No
17	F	37	NS	I	No	S	No	NA	22,7	LF
18	F	55	C	I	No	S	No	NA	26,6	No

F, female; M, male; V, androgen secreting tumor; C, cortisol secreting tumor; M, mixed androgen plus cortisol secreting tumor; NS, not secreting tumor; S, surgery; SC, surgery plus chemotherapy; LF, lost of follow-up; NA, not available.

Supplementary Figure 1: SF1, DAX1 and STAT3 mRNA expression normal adrenal cortices (controls): absence of difference in the expression levels between pediatric and adult samples.

Supplementary Figure 2: Multiple Ligand Probe Assay (MLPA): graphic depicting increased *SF1* copy number in pediatric ACT (A) and adult ACT (B).

Supplementary Figure 3: Multiple Ligand Probe Assay (MLPA): graphic depicting increased exons copy number of *SF1* in pediatric ACT (A) and adult ACT (B).

Supplementary Figure 4: Multiple Ligand Probe Assay (MLPA): graphics showing changes in *DAX1* copy number and its promoter region. (A) Reduction of *DAX1* copy number in one pediatric ACT. (B) Reduction of exon copy number of the *DAX1* promoter region in one pediatric ACT. (C) Increased *DAX1* copy number in one adult ACT.

Supplementary Figure 5: Immunohistochemistry - Representative image of nuclear SF1 staining in testis, used as positive control (scale 100 μ m). (B) Representative image of nuclear DAX1 staining in lung used as positive control (scale 100 μ m).