MONICA MALHEIROS FRANÇA

**O PAPEL DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO POD-1 NA
REGULAÇÃO DE SF-1 E LRH-1 EM CÉLULAS TUMORAIS
DA SUPRARRENAL HUMANA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

Versão original

São Paulo
2014

RESUMO

FRANÇA, M. M. **O papel do fator de transcrição POD-1 na regulação de SF-1 e LRH-1 em células tumorais da suprarrenal humana.** 2014. 123 f. Tese (Doutorado em Ciências Morfofuncionais) – Instituto Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

O Fator Esteroidogênico 1 (SF-1/*NR5A1*) e seu homólogo, o fator Receptor Homólogo de Fígado (LRH-1/*NR5A2*) são fatores de transcrição que exercem um papel fundamental na produção de esteroides nas gônadas e na suprarrenal. Além disso, existem evidências que ambos tem papel no processo tumorigênico desses órgãos. Por outro lado, POD-1/*TCF21* é um fator de transcrição do tipo bHLH, cuja a expressão é menor em carcinomas adrenocorticais (ACC) do que em adenomas (ACA) e adrenais normais (NA), e parece regular *Sf-1*. O objetivo nesse trabalho foi analisar o papel de POD-1 na regulação de SF-1 e de LRH-1 em células de tumores adrenocorticais, a linhagem NCI-H295R e as culturas secundárias de células de adenomas e carcinomas. Analisamos a expressão gênica basal de *SF-1*, *LRH-1* e *POD-1* em culturas de células de tumores adrenocorticais, nas células transfectadas com *Pod-1* e com RNA de interferência de *POD-1* (siRNA-*POD-1*), através de RT-PCR quantitativo (qRT-PCR). A análise protéica de SF-1, nas células que hiperexpressavam POD-1, foi realizada por “Immunoblotting”. Foi também analisado se POD-1 se ligava no promotor de *SF-1* e *LRH-1* através do ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP assay). Os efeitos biológicos nas células com hiperexpressão de *POD-1* foram analisados utilizando ensaios de citotoxicidade, além da expressão de enzimas esteroidogênicas. Os resultados mostraram que houve diferenças na expressão de *SF-1* entre as células estudadas. Além disso, a cultura de células de origem pediátrica (ACA) apresentou expressão maior de POD-1 em relação às células provenientes de tumores adultos. A hiperexpressão de *POD-1* resultou em redução da expressão gênica e protéica de *SF-1*. Em contraste, houve um aumento da expressão gênica de *LRH-1*, devido à diminuição da expressão de *SHP*, um regulador negativo de *LRH-1* em células de hepatocarcinomas. A cultura de células de tumor pediátrico transfectadas com siRNA-*POD-1* apresentou uma redução dos níveis de *POD-1* e aumento da expressão de *SF-1*, reforçando o mecanismo regulatório entre esses dois fatores de transcrição. Através dos ensaios de ChIP assay, foi mostrado que POD-1 se ligou diretamente à regiões E-box do promotor de *SF-1*, sendo o mecanismo utilizado para inibir a expressão de *SF-1*. Por outro lado, em células de hepatocarcinoma, não foi caracterizado a ligação de POD-1 na região promotora de *LRH-1*, embora POD-1 tenha se ligado em duas regiões E-box distintas no promotor de *SHP*, um regulador negativo de *LRH-1*. A redução da expressão de SF-1 por POD-1 diminuiu a expressão de *StAR*, mas não foi suficiente para alterar a proliferação das culturas de células tumorais. Em resumo, esses dados sugerem que POD-1/*TCF21* pode ter um papel mais amplo como regulador da transcrição de fatores que controlam o processo tumorigênico, e é um candidato a gene supressor de tumor nas células adrenocorticais.

Palavras-chave: POD-1. SF-1. LRH-1. SHP. Células tumorais. Suprarrenal humana.

ABSTRACT

FRANÇA, M.M. **The role of POD-1 transcription factor in the SF-1 and LRH-1 regulation in human adrenocortical tumor cells.** 2014. 123 p. Thesis (Ph.D in Morphofunctional) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Steroidogenic Factor-1 (SF-1/*NR5A1*) and Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1/*NR5A2*) have played a critical role in adrenal and gonads steroid production. Moreover, there are evidences that they have acted in tumorigenesis process in these organs. On the other hand, POD-1/*TCF21* is a bHLH transcription factor that seems to regulate Steroidogenic Factor-1. Besides, POD-1/*TCF21* is downregulated in adrenocortical carcinoma (ACC) compared to adrenocortical adenoma (ACA) and normal adrenal (NA). The main goal of this work has been to analyse the role of POD-1 in SF-1 and LRH-1 regulation in adrenocortical tumor cells both NCI-H295R and secondary culture cells of ACC and ACA. The gene expression of *SF-1*, *LRH-1* and *POD-1* was measured not only in adrenocortical tumor cell culture but also in POD-1 transfected cells and *POD-1* RNA interference (siRNA-*POD-1*) through qRT-PCR. In POD-1 overexpressed cells the protein expression of SF-1 was analysed by Immunoblotting. It was also verified if POD-1 binds in *SF-1* and *LRH-1* promoter through Chromatin Immunoprecipitation assay (ChIP assay). The biological effects in POD-1 overexpressed cells were analysed using both cytotoxic assay and steroidogenic enzyme expression. The results showed that there are differences in *SF-1* expression among studied cells. Besides, it was observed that in pediatric adrenocortical tumor cell culture (ACA) there was a higher expression of *POD-1* than adult tumor cells. POD-1 overexpression also reduced SF-1/*SF-1* protein and gene expression. However, there was an increase of *LRH-1* gene expression due to *SHP* expression decrease which is a negative regulator of *LRH-1* in hepatocellular carcinoma cells. In transfected pediatric adrenocortical tumor cells with siRNA-*POD-1*, it was verified that *POD-1* gene expression decreased and *SF-1* increased emphasizing a regulatory mechanism between POD-1 and SF-1. Using ChIP assay it was shown that POD-1 binded directly in *SF-1* promoter E-box sequence. In hepatocellular carcinoma cells, it was not characterized that POD-1 binded in *LRH-1* promoter although POD-1 enriched *SHP* promoter E-box sequence, which is a *LRH-1* negative regulator. SF-1 expression reduction by POD-1 decreased the *StAR* expression. However it was not enough to change tumor cell proliferation. In summary, these results suggest that POD-1/*TCF21* may have a wider role as regulator of transcription factor which controls tumorigenesis process being a possible candidate as tumor suppressor gene in adrenocortical cells.

Keywords: POD-1. SF-1. LRH-1. SHP. Tumor cells. Human Adrenal Gland.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Suprarrenal humana

A suprarrenal humana é uma glândula endócrina par que está localizada sobre o polo superior dos rins. A glândula direita tem a forma piramidal com o ápice para cima e a base sobre o rim, enquanto a glândula esquerda tem formato semilunar e estende-se sobre a borda medial do rim (MOORE, 1992). Cada glândula é envolvida por uma cápsula resistente de tecido conjuntivo. Em corte a fresco, as glândulas apresentam duas regiões concêntricas distintas, uma periférica de cor amarelada, o córtex, e a outra central e acinzentada, a medula. Essas regiões são também distintas quanto à origem, estrutura e função, e estão unidas apenas topograficamente (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Figura 1: Desenho esquemático da Suprarrenal

Secção longitudinal de suprarrenal indicando cápsula, córtex e medula. (adaptado NETTER, 2006)

O córtex adrenal é proveniente do epitélio celomático e, portanto, do mesoderma, e é dividida em três zonas concêntricas de acordo com as células que as compõe. A zona Glomerulosa é a região imediatamente abaixo da cápsula composta por células colunares ou piramidais de núcleo esférico e citoplasma contendo gotículas lipídicas. As células desta camada produzem e secretam os mineralocorticoides, sendo o mais importante a aldosterona, que age principalmente nos túbulos renais estimulando a reabsorção de sódio. A zona Fasciculada é a região intermediária do córtex e é constituída de células com formato de cordões paralelos entre si e perpendiculares à superfície do órgão, entre os quais e paralelamente são encontrados capilares. Na região mais externa desta zona,

encontra-se grande número de gotículas lipídicas no citoplasma. As células desta camada produzem os glicocorticoides, representado pelo cortisol em humanos, que tem como função a produção de glicogênio e elevação dos níveis de glicose no sangue, assim como a mobilização de lipídeos do tecido adiposo. A zona Reticulada é a região mais interna e adjacente à medula. As células desta camada se dispõem irregularmente e com aspecto de rede anastomosada, são menores e possuem pequena quantidade de lipídeos em seu interior. As células desta zona no homem secretam os hormônios andrógenos como a dehidroepiandrosterona (DHEA) e DHEA sulfatada, e os hormônios estrogênicos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A medula da suprarrenal se origina de células da crista neural, portanto, de origem neuroectodérmica. A medula é composta por dois tipos celulares distintos, as células cromafins e as células ganglionares parassimpáticas. As células cromafins são mais abundantes e são produtoras de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, sendo que a maioria dessas células secretam adrenalina (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Essas células são poliédricas e formam uma densa rede em cujas malhas há capilares e vênulas.

Figura 2: Fotomicrografia das zonas da Glândula Suprarrenal

Zonas da Glândula Suprarrenal dividida em região cortical e medular. A região cortical é subdividida em Glomerulosa, Fasciculada e Reticulada. HE, pequeno aumento (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

A função básica da suprarrenal está relacionada à homeostase do organismo, isto é, à manutenção da constância do meio interno. Estímulos fisiológicos e patológicos dos mais variados provocam um aumento da produção de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) pela hipófise, através da estimulação do hipotálamo. (ORTH; KOVACS, 1998).

1.2 Tumores da Suprarrenal

São vários os fatores responsáveis pela regulação dos processos fisiológicos relacionados ao controle da esteroidogênese e da proliferação celular na suprarrenal, como fatores tróficos locais e seus receptores, como IGF-2 (Fator de Crescimento semelhante a Insulina do tipo 2) e IGF1R (Receptor do tipo 1 do Fator de Crescimento semelhante a Insulina), e os fatores de transcrição como SF-1 (Fator esteroidogênico), DAX-1 (Dosage-sensitive sex-reverse Adrenal Hypoplasia Congenita critical region on chromosome X, gene 1), dentre outros. Disfunções em cada um destes elementos e de suas vias de sinalização intracelular têm sido demonstradas em situações patológicas caracterizadas por hipersecreção hormonal e/ou descontrole na proliferação celular. De maneira geral, estas condições podem ser classificadas em dois grupos: as hiperplasias (macronodular e micronodular) e as neoplasias (adenomas e carcinomas).

Em indivíduos adultos, tumores do córtex da suprarrenal são neoplasias comuns cuja prevalência aumenta com a idade, podendo atingir até 6% dos indivíduos acima de 60 anos. Pacientes submetidos a exames radiológicos de rotina podem apresentar nódulos adrenais como achados incidentais (ARNALDI; BOSCARO, 2012; GRUMBACH et al., 2003). A maior parte destes nódulos são adenomas adrenocorticais (ACA) e o tratamento consiste apenas em observação clínica e radiológica, no caso de adenomas não-secretores, ou cirurgia laparoscópica para os secretores (GILL et al., 2001; KLOOS et al., 1995).

Em contrapartida, o carcinoma adrenocortical (ACC) é uma neoplasia rara, e que ocorre de 1 a 2 casos por milhão por ano (para revisão ALLOLIO; FASSNACHT, 2006; ELSE et al., 2013). A melhor chance de cura é através da completa remoção cirúrgica do tumor, no entanto, boa parte dos casos apresenta metástase (para revisão ALLOLIO; FASSNACHT, 2006). As demais terapias têm um caráter apenas paliativo e afeta pouco a sobrevida dos pacientes (ALLOLIO et al., 2004). Mesmo

nos casos em que o tratamento cirúrgico é possível, as taxas de recidiva são altas (ABIVEN et al., 2006). A terapia farmacológica é feita com o mitotano, que é o único agente adrenolítico disponível para tratamento de ACC. O mitotano provoca um efeito citotóxico nas células adrenocorticais resultando em maior degeneração das zonas fasciculada e reticular (BERGENSTAL et al., 1959, 1960; HAHNER et al., 2005). Existem limitações sobre o uso desse quimioterápico devido aos efeitos neurológicos e gastrointestinais provocados pelo seu uso (para revisão ALLOLIO; FASSNACHT, 2006).

Sob vários aspectos clínicos os carcinomas e os adenomas se apresentam de maneira semelhante, no entanto, o tratamento e o seguimento das lesões diferem, de maneira que o diagnóstico precisa ser preciso. Atualmente, esta distinção é feita através da contagem de critérios anatomopatológicos, chamados de critérios de Weiss (WEISS, 1984). Em situações limítrofes e nos tumores pediátricos, tais critérios apresentam limitações importantes (LAU; WEISS, 2009).

Baseados em estudos de hibridização genômica comparativa (CGH), foram detectadas poucas regiões de ganhos e perdas cromossômicas associadas aos ACAs. No entanto, em ACCs são encontradas aberrações cromossômicas com várias regiões, embora sem padrão entre as amostras analisadas (LERARIO et al., 2013). Análises genéticas no loco 11p15 de tumores adrenocorticais esporádicos mostraram perda alélica de 92% em ACC e 90% dos casos apresentaram hiperexpressão do *IGF-2* (GICQUEL et al., 1997, 2001). Os efeitos proliferativos de *IGF2* são mediados pelo IGFR-1 que também está hiperexpresso em ACCs, principalmente nos casos pediátricos (ALMEIDA et al., 2008; LOGIE et al., 1999). Portanto, essas alterações podem servir como importantes marcadores para a patogênese dos carcinomas adrenocorticais.

A perda de heterozigosidade (LOH) ou desequilíbrio alélico no cromossomo 17p13 é uma alteração descrita em tumores adrenocorticais no loco do gene *TP53*, em 85% dos tumores malignos, mas não em ACAs (GICQUEL et al., 2001). *TP53* é um gene supressor de tumor e está envolvido no controle da proliferação celular e na indução da apoptose, em resposta ao danos ocorridos no DNA (HISADA et al., 1998; SUZUKI; MATSUBARA, 2011; VOGELSTEIN et al., 2000). Alterações no gene *TP53* é frequentemente observada em tumores. Em pacientes adultos com tumores adrenocorticais (ACT), a prevalência de mutações germinativas em *TP53* é baixa, cerca de 3% a 6%. (HERMANN et al., 2012; RAYMOND et al., 2013). Em

contrapartida, em ACT pediátricos foi observada uma prevalência de 50% a 80% dos pacientes nos EUA e Europa (VARLEY et al., 1999; WAGNER et al., 1994). No Brasil, há um particular interesse no estudo dos tumores do córtex da suprarrenal, uma vez que a incidência do carcinoma na população é cerca de 10 a 15 vezes superior à descrita no restante do mundo, sobretudo na faixa etária pediátrica, devido a uma mutação germinativa no gene supressor de tumor *TP53* (LATRONICO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001). Essa mutação germinativa específica foi identificada no exon 10 do gene *TP53* (R337H) em tumores adrenocorticais pediátricos e está presente em 90% dos pacientes, sendo que 15% em adultos (LATRONICO et al., 2001; RIBEIRO et al., 2001). Mutações germinativas no gene *TP53* foram também identificadas em 70% dos casos da Síndrome de Li-Fraumeni (LFS), uma doença autossômica caracterizada pela susceptibilidade a diferentes tipos de cânceres, dentre eles o câncer adrenocortical, embora com uma frequência menor (BACHINSKI et al., 2005; HISADA et al., 1998; LI et al., 1998). Em ACCs esporádicos de adultos, mutações somáticas em *TP53* foram encontradas em 25% dos casos, embora a perda de heterozigosidade no loco 17p13 seja de 85% (GICQUEL et al., 2001; LIBÉ et al., 2007; OHGAKI et al., 1993). Além disso, a perda de heterozigosidade (LOH) nos cromossomos 11q15 e 2q16 foram também observados em, respectivamente 92% e 90% dos casos de ACC (GICQUEL et al., 2001).

Em tumores adrenocorticais esporádicos foram descritas mutações em proteínas da via de sinalização Wnt (Wingless-type MMTV integration) (GILES et al., 2003). Tissier e colaboradores (2005) demonstraram que 54% dos tumores adrenocorticais analisados apresentaram alterações na proteína β -catenina, sugerindo que a ativação da via de sinalização Wnt é um evento prevalente na tumorigênese adrenal. Mutações no gene β -catenina foram observados em 28% dos tumores adrenocorticais, e em testes *in vitro*, a mutação de β -catenina promoveu uma eficiente e constitutiva transcrição de TCF, um cofactor de β -catenina na via Wnt. Além disso, a localização celular anormal de β -catenina foi mais frequente em ACC (75%) do que em ACA (TISSIER et al., 2005). Sendo assim, a ativação anormal da via Wnt estaria associada com um prognóstico pobre em casos de carcinomas adrenocorticais (HEATON et al., 2012; RAGAZOON et al., 2010).

Devido a poucas opções terapêuticas para pacientes com carcinoma adrenocortical, novos marcadores moleculares precisam ser urgentemente

encontrados e estudados (ALLOLIO; FASSANACHT, 2006). Dentre os fatores que definem o córtex adrenal e têm sido alvo de estudos como marcador molecular em tumores adrenocorticais está o Fator Esteroidogênico 1, o SF-1/NR5A1.

1.3 Fator Esteroidogênico 1 (SF-1/NR5A1)

Dentre os receptores órfãos (NRs) já descritos, existe uma subfamília de fatores de transcrição de mamíferos homóloga ao fator de transcrição Fushi Tarazu Transcription Factor 1 (FTZ-F1) de *Drosófila*, que são estruturalmente relacionados (para revisão Benoit et al., 2006). Nessa família de fatores de transcrição um dos principais membros, relacionado com as células produtoras de esteroides, é o Fator Esteroidogênico 1 (SF-1 / Ad4BP / NR5A1) (LALA et al., 1992; MOROHASHI et al., 1992).

SF-1 exerce um papel fundamental na regulação do desenvolvimento e na função de tecidos produtores de esteroides (para revisão SCHIMMER; WHITE 2010). Este fator é altamente expresso nas três zonas do córtex adrenal, nas células testiculares de Leydig e Sertoli, nas células da granulosa e da teca no ovário (HONDA et al., 1993; IKEDA et al., 1993; MOROHASHI et al., 1994, 1999). Além desses tecidos, SF-1 também foi detectado na hipófise, na região ventromedial do hipotálamo (VMH), na pele e no baço (BARNHART; MELLON 1994; INGRAHAM et al., 1994; MOROHASHI et al., 1999).

Durante o desenvolvimento embrionário, SF-1 é expresso primeiramente no trato urogenital como o primeiro marcador da diferenciação entre as gônadas e a glândula suprarrenal. Durante o desenvolvimento, SF-1 está expresso em zonas corticais secretoras de esteroides da glândula adrenal, nas células de Sertoli e Leydig e em ovários humanos. (HANLEY et al., 1999, 2001; IKEDA et al., 1994; MOROHASHI et al., 1995). Camundongos *Sf-1^{-/-}* apresentam baixa concentração de corticosterona e um aumento plasmático de ACTH. A deficiência aguda dos glicocorticoides e mineralocorticoides fazem esses animais morrerem após 8 dias do nascimento (LUO et al., 1994). Esses animais também apresentam falta completa das adrenais e gônadas (agenesia), bem como uma reversão sexual da genitália interna e externa (LUO et al., 1994). Camundongos *Sf-1^{+/-}* apresentam um fenótipo menos drástico como defeitos histológicos na suprarrenal, uma resposta atenuada ao estresse e defeitos compensatórios no crescimento (BLAND et al., 2000). As

funções de SF-1 em humanos são preservadas e existem pelo menos três mutações associadas às anormalidades das adrenais e gônadas, como insuficiência adrenal e agenesia, defeitos na síntese andrógenos, infertilidade no sexo masculino e reversão do sexo nas gônadas (para revisão FERRAZ-de-SOUZA et al., 2011a).

SF-1 foi inicialmente identificado como fator regulador de transcrição de várias enzimas esteroidogênicas, tais como *P450SCC*, *CYP11B1* e *CYP21* ativando diretamente o promotor desses genes através da sequência consenso AGGTCA (MOROHASHI et al., 1992; RICE et al., 1991). SF-1 participa na expressão de todas as enzimas esteroidogênicas do córtex adrenal e das gônadas (para revisão VAL et al., 2003). Dentre elas, SF-1 regula a enzima “Steroidogenic Acute regulatory protein” (StAR), que realiza o transporte do colesterol na mitocôndria, uma etapa fundamental na esteroidogênese. Regula também a expressão da enzima 3 β -HSD (3- β -hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ -5-4 isomerase) que converte a pregnenolona em progesterona (MILLER, 2007; STOCCO, 2000) e as enzimas *CYP11A1* e *CYP17* de humanos, camundongos e ratos (BAKKE et al., 1995; HU et al., 2001; JACOB et al., 1998; TAKAYAMA et al., 1994).

SF-1 regula também a expressão do receptor de ACTH que é o Receptor de Melanocortina 2 (MC2R) e do receptor do FSH (Hormônio Folículo Estimulante), hormônios que estimulam, respectivamente, a esteroidogênese da adrenal e das gônadas (MARCHAL et al., 1998; MARTINEZ et al., 2003; NAVILLE et al., 1999).

Ferraz-de-Souza e colaboradores (2011b) identificaram cinco novos alvos diferencialmente expressos, dentre eles *VSNL1* (Visinin-like 1), *ZIM2* (Zinc Finger Imprinted 2), *PEG3* (Paternally Expressed 3), *MTSS1* (Metastasis Supressor 1) e *SOAT1* (Sterol O-Acyltransferase 1) utilizando a linhagem de células adrenocortical NCI-H295R. *SOAT1* é um regulador da formação de ésteres de colesterol que é um importante mecanismo gerador de colesterol livre na esteroidogênese adrenal (CHANG et al., 2009). Utilizando mecanismos moleculares de hiperexpressão e repressão de SF-1 em células adrenocorticais, *SOAT1* foi identificado como um novo alvo de SF-1 na esteroidogênese da glândula suprarrenal humana (FERRAZ-de-SOUZA et al., 2011b). Além disso, esse mesmo grupo identificou o *ANGPT2/Ang2* (Angiopoetina 2) como um novo alvo de SF-1 na linhagem NCI-H295R. *Ang2* está envolvido no processo de angiogênese que é importante no desenvolvimento da adrenal e no processo tumorigênico. A identificação de SF-1 na regulação de

ANGPT2 sugere um novo papel para SF-1 na regulação da angiogênese na glândula suprarrenal (FERRAZ-de-SOUZA et al., 2011c).

Recentemente, NRSF/REST (Neuron-restrictive silencer fator/RE1-Silencing transcription fator) foi identificado como novo regulador na expressão gênica em células adrenocorticais NCI-H295R, e demonstrou ter uma interação funcional com SF-1, já que em condições basais ou de hiperexpressão de SF-1, NRSF/REST se ligou a regiões no promotor de *SF-1*, promovendo a regulação de genes da esteroidogênese (*CYP21A2* e *CYP19A1*) (DOGHMAN et al., 2013).

A região promotora de SF-1/Sf-1 possui alguns elementos regulatórios descritos, dentre eles SRY, Sp1/Sp3, GATA-4, SOX15, SOX30, TEAD-4, CBX2 e E-box (para revisão SCHIMMER; WHITE, 2010). O elemento SRY (“Sex Determining Region”) é uma região de ligação de Sox que pode contribuir para expressão de SF-1 em células de Sertoli (SHEN et al., 2002). O elemento Sp1/Sp3 está situados “downstream” do sítio de início de transcrição (“TSS”) que contribuem para atividade eficiente do promotor de SF-1 nos testículos (SCHERRER et al., 2002). CBX2 (“Cromobox Homolog” 2) se ligou no promotor de *Nr5a1* em células adrenocorticais de camundongo. Além disso, camundongos *Cbx2*^{-/-} apresentaram expressão reduzida de *Sf-1* e apresentaram reversão sexual em machos e pequenas adrenais, fenótipo semelhante ao descrito em camundongos KO *Sf-1* (KATOH-FUKUI et al., 1995). Finalmente, a região regulatória de NR5A1/*Nr5a1* apresentou o sítio E-box, uma região caracterizada pela sequência CCAAT (DAGGETT et al., 2000), onde se ligam preferencialmente proteínas tipo do bHLH, tais como USF (Upstream Stimulatory Factor) e POD-1 (Epicardi/Capsulin/*TCF21*) (HARRIS; MELLON, 1998, WOODSON et al., 1997).

Além do seu papel na esteroidogênese SF-1 parece estar relacionado com a proliferação de células adrenocorticais. SF-1 é amplificado e hiperexpresso em muitos casos de tumores adrenocorticais pediátricos, e essa hiperexpressão é maior em tumores pediátricos do que tumores de adultos (ALMEIDA et al., 2010; FIGUEIREDO et al., 2005). Em estudos in vitro e in vivo, a expressão aumentada do receptor nuclear SF-1 promoveu a proliferação celular e a formação de tumores adrenocorticais em camundongos. (DOGHMAN et al., 2007).

Outro fator de transcrição, homólogo ao SF-1, e também importante em órgãos que produzem esteroides, é o Receptor Homólogo de Fígado (LRH-1/*NR5A2*).

1.4 Receptor Homólogo de Fígado (LRH-1/NR5A2)

O LRH-1 é o membro *NR5A2* da subfamília de fatores de transcrição de mamíferos também homóloga ao FTZ-F1 de *Drosófila* (para revisão FAYARD et al., 2004). LRH-1 foi identificado em várias espécies, incluindo rato, galinha, cavalo, rã dentre outros (BOERBOOM et al., 2000; ELLINGER-ZIEGELBAUER et al., 1994; KUDO et al., 1997; LIU et al., 1997; NAKAJIMA et al., 2000). Em humanos, LRH-1 foi descrito por vários grupos e recebeu diferentes nomes como Receptor Homólogo de Pâncreas 1, Fator de Transcrição α -Fetoproteína, Fator de ligação B1 humano, e Fator de ligação ao promotor *CYP7A1* (BECKER-ANDRÉ et al., 1993; GALARNEAU et al., 1998; LI et al., 1998; NITTA et al., 1999).

LRH-1 está expresso em tecidos de mamíferos de origem endodermal, tais como fígado, pâncreas e intestino, o que justifica sua classificação funcional como um receptor nuclear entero-hepático (GALARNEAU et al., 1998; LI et al., 1998). Porém, a expressão de LRH-1 é tecido- específica, e é observado em ovários de ratos, camundongos e equinos, em pré-adipócitos, no ovário e na suprarrenal humana (BOERBOOM et al., 2000; CLYNE et al., 2002; FALENDER et al., 2003; HINSHELWOOD et al., 2003; LIU et al., 2003; SIRIANE et al., 2002; WANG et al., 2001).

LRH-1 tem papel chave na regulação da expressão de genes envolvidos no metabolismo do colesterol e síntese de ácidos biliares (para revisão FAYARD et al., 2004). Além disso, LRH-1 está envolvido no controle da lipogênese (para revisão MOUZAT et al., 2013). Embriões *Lrh-1*^{-/-} morrem devido à disfunção na endoderme visceral, enquanto camundongos “knockout” para *Lrh-1* são hipocolesterolêmicos e expressam níveis reduzidos de LRH-1 no tecido hepático (PARÉ et al., 2004; SCHOONJANS et al., 2005).

LRH-1 é regulador do metabolismo do colesterol nos ovários, do seu desenvolvimento e sua função (para revisão MOUZAT et al., 2013). Algumas evidências dão suporte à hipótese que LRH-1 controla a entrada de colesterol possibilitando a esteroidogênese nesse órgão. O Fator LRH-1 está altamente expresso em células da granulosa no ovário e controla a expressão gênica de enzimas esteroidogênicas, tais como, a *CYP11A1* (membro da família P450scc), a *StAR*, assim como cytochrome P450 17 α -hydroxylase/17,20-lyase (*CYP17*) e 3 β -

hydroxysteroid dehydrogenase/ Δ^5 - Δ^4 isomerase type 2 (*3 β HSD*), alvos comuns do fator SF-1 (KIM et al., 2004, 2005; PENG et al., 2003; YAZAWA et al., 2009).

Além disso, SF-1 e LRH-1 estão envolvidos na esteroidogênese das células de Leydig, pois alguns dos genes alvos de SF-1, como *CYP11A*, *CYP17* e *StAR*, são regulados por LRH-1 nos testículos. (SIRIANNE et al., 2002). A análise dos diferentes tipos celulares dos testículos mostrou que as células de Sertoli expressam exclusivamente SF-1, as células germinativas expressam exclusivamente LRH-1, e ambos os fatores são expressos nas células de Leydig, o que sugere funções específicas para os diferentes tipos celulares (PEZZI et al., 2004).

Nos ovários, a expressão de LRH-1 ocorre nas células da granulosa e nas células do corpo lúteo, enquanto, SF-1 é expresso primariamente nas células da teca e nas células intersticiais, e apresenta baixa expressão nas células da granulosa e nenhuma expressão nas células do corpo lúteo (FALENDER et al., 2003; HINSHELWOOD et al., 2003; LIU et al., 2003). Além disso, foi detectada a expressão de *Lrh-1* em estágios embrionários do ovário (HINSHELWOOD et al., 2003). Em galinhas, LRH-1 está expresso no fígado, mais expresso do que SF-1 em testículos, e ambos os fatores apresentam o mesmo perfil de expressão na adrenal (KUDO et al., 2006).

Tanto o hormônio folículo estimulante (FSH) quanto a testosterona estimulam a expressão do gene *Lrh-1* (WU et al., 2011; YU et al., 2005). A utilização de animais *Nr5a2*^{+/-} mostrou que, apesar desses animais apresentarem função normal dos ovários e da produção de estradiol, eles apresentaram diminuição da produção de progesterona após administração de gonadotrofina, e defeitos de fertilidade (LABELLE-DUMAIS et al., 2007).

LRH-1 está envolvido na formação de tumores intestinais devido a seus efeitos no controle do ciclo celular e no processo inflamatório (SCHOONJANS et al., 2005). Além disso, LRH-1 está envolvido na proliferação celular, na invasão e na migração de células de câncer de mama (CHAND et al., 2012). O mecanismo de ação do LRH-1 pode ser atribuído à mudanças pós-transcricionais causadas na clivagem de E-caderina junto com a expressão de *Mmp9* (matrix metalloproteinase 9), ambos indutores da mobilidade e invasão das células de tumores de mama. Somado a isso, foi demonstrado por Dubé e colaboradores (2009) que LRH-1 está altamente expresso em linhagens celulares de câncer endometrial e pode ativar nessas células a proteína *StAR* e as enzimas *HSD3B2*, e *CYP19A1*. Em células de

carcinoma embrionário humano, LRH-1 atua como um ativador transcricional da regulação do gene *OCT4*, um marcador de células não-diferenciadas (SUNG et al., 2012).

Os receptores nucleares SF-1 e LRH-1 podem ser regulados por outras proteínas (para revisão VAL et al., 2003, para revisão FAYARD et al., 2004). Um fator envolvido na regulação desses dois fatores, é a proteína DAX-1 (*NR0B1*) (BARDONI et al., 1994).

Em estágios iniciais do desenvolvimento de camundongos, a expressão de SF-1 é coincidente com a expressão de DAX-1. Esses dois fatores de transcrição exibem modelos de expressão semelhantes no córtex adrenal, testículo, ovário, hipotálamo e na hipófise anterior (para revisão SCHIMMER; WHITE, 2010). Além disso, existem trabalhos que apontam DAX-1 como um regulador negativo da ação de SF-1, e portanto da esteroidogênese (para revisão SCHIMMER; WHITE, 2010).

DAX-1 também atua como repressor de LRH-1 (SUZUKI et al., 2003). Sablin e colaboradores (2008) caracterizaram, por análise funcional e estrutural, que DAX-1 se ligava a LRH-1 em um motivo conservado (PCFXXLP). A mutação nessa região consenso estava associada a desordens endócrinas humanas, mas que não estavam previamente associadas com DAX-1. No entanto, a relação entre DAX-1 e LRH-1 é mais relevante em ovários, onde ambos genes são expressos e suas proteínas são co-expressas (para revisão FAYARD et al., 2004).

O fator SHP/*NR0B2* ("Small Heterodimer Partner") é o segundo membro da mesma subfamília de *NR0B* (SEOL et al., 1996) e junto com DAX-1, apresentam características pouco comuns dentre os receptores nucleares. Ambos não possuem o domínio de ligação ao DNA e são capazes de formar heterodímeros com vários outros receptores nucleares (para revisão EHRLUND; TREUTER, 2012). SHP e LRH-1 estão envolvidos na via de biossíntese de ácidos biliares no fígado (para revisão FAYARD et al., 2004). SHP interage com o domínio AF2 de LRH-1 e compete com a ligação de seus co-ativadores (LEE; MOORE, 2002). Além disso, o aumento de ácidos biliares em camundongos promove o aumento da proteína SHP, que por sua vez, reprime LRH-1, diminuindo a transcrição de *CYP7A1* e *CYP8B1* (para revisão FAYARD et al., 2004).

Apesar de SF-1 e LRH-1 possuírem semelhanças funcionais, o papel de LRH-1 na tumorigênese adrenal ainda não é conhecido. Portanto é necessário investigar novos alvos regulatórios para ambos os fatores.

1.5 Capsulin/Epicardin/POD-1 (*TCF21*)

Proteínas basic-helix-loop-helix (bHLH) são proteínas regulatórias de transcrição envolvidas na diferenciação celular de vários tecidos tais como a diferenciação dos tecidos neuronais, cardíacos, hematopoiético e pancreático (para revisão MASSARI; MURRE, 2000). As proteínas bHLH formam homodímeros e heterodímeros através do domínio helix-loop-helix e reconhecem a sequência E-box CANNTG nos promotores de genes por elas regulados (para revisão MASSARI; MURRE, 2000).

Epicardin/Capsulin/Pod-1 é uma proteína membro da família de proteínas do tipo bHLH que é expressa em células mesenquimais do rim, pulmão, intestino, pâncreas, adrenal e durante o desenvolvimento dos sistemas respiratório, gastrointestinal e cardiovascular (HIDAI et al., 1998; LU et al., 1998; QUAGGIN et al., 1998; ROBB et al., 1998). POD-1 se liga à região consenso E-box CANNTG na forma de heterodímero com outras proteínas do tipo bHLH, como a proteína E12 (HIDAI et al., 1998; LU et al., 1998). Camundongos *Pod-1*^{-/-} apresentam ausência de alvéolos e pneumócitos do tipo II e graves defeitos na diferenciação do epitélio das vias aéreas. Nos rins, foi observada a ausência de podócitos maduros e de glomérulos (QUAGGIN et al., 1999). Durante a gonadogênese masculina e feminina, a expressão de *Pod-1* foi dependente do sexo do embrião e de seu estágio de desenvolvimento (TAMURA et al., 2001). Em camundongos *Pod1*^{-/-} machos, a genitália externa apresenta características de fêmeas e no trato urogenital ocasiona a expressão aberrante de SF-1, interrompendo o processo normal do desenvolvimento das gônadas (TAMURA et al., 2001). POD-1 é expresso em regiões das gônadas onde SF-1 não é expresso e parece reprimir a expressão de *Sf-1* em precursores de células multipotentes, o que parece ser necessário para que ocorra a diferenciação de várias linhagens intersticiais, como células Leydig, células mióides peritubulares e pericitos (TAMURA et al., 2001).

O papel de POD-1 no desenvolvimento adrenocortical foi demonstrado em experimentos utilizando repórter LacZ sob o controle da região regulatória de *Pod-1*. Nesses embriões, POD-1 mostrou expressão exclusivamente na região capsular adrenal (KIM et al., 2009). Além disso, em camundongos “knockout” para *Pod-1*, a expressão ectópica de SF-1 foi detectada na cápsula e mais intensamente no córtex (KIM et al., 2009).

POD-1/TCF21 está pouco expresso em carcinomas adrenocorticais assim como em câncer de pulmão, cabeça e pescoço e em melanoma (ARAB et al., 2011; FRANÇA et al., 2013; SMITH et al., 2006). Em câncer de pescoço, cabeça e pulmão, *POD-1/TCF21* está silenciado por mecanismos epigenéticos e é apontado como candidato a gene supressor nesses tumores (SMITH et al., 2006). A regulação epigenética negativa de *TCF21* está envolvida na progressão de melanomas, o que lhe confere características de biomarcador na indicação de tumores de comportamento mais agressivos (ARAB et al., 2011).

Devido às diferenças clínicas e de progressão dos adenomas e carcinomas, e da dificuldade de tratamento, é de grande interesse o estudo de novos marcadores envolvidos na regulação dos fatores de expressão SF-1 e LRH-1, uma vez que ambos parecem estar envolvidos na proliferação de tumores adrenocorticais. Considerando POD-1 como um provável regulador de *SF-1*, tivemos como hipótese que esse fator de transcrição poderia regular a expressão de *SF-1* e do seu homólogo *LRH-1*, e ter um papel importante no processo tumorigênico.

6 CONCLUSÃO

O fator de transcrição POD-1 foi capaz de modular diretamente a expressão de SF-1 e indiretamente a expressão de LRH-1 em células tumorais humanas. Em células tumorais adrenocorticais, POD-1 promoveu a regulação de SF-1 através da ligação na região E-box do promotor de *SF-1*, promovendo assim sua inibição. O efeito inibitório de SF-1 não foi capaz de modular a capacidade proliferativa das células tumorais adrenocorticais, embora tenha sido suficiente para inibir a expressão de *StAR*. Por outro lado, o mecanismo, pelo qual essa regulação ocorreu em células de hepatocarcinoma humano, foi através da ligação de POD-1 na região promotora de *SHP* que provavelmente acarretou o aumento da expressão de *LRH-1*.

Em resumo, esses dados sugerem que POD-1/*TCF21* pode ter um papel mais amplo como regulador da transcrição de fatores que controlam o processo tumorigênico, e é um candidato a gene supressor de tumor nas células adrenocorticais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABIVEN, G. et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 7, p. 2650-2655. 2006.
- ALLOLIO, B. et al. Management of adrenocortical carcinoma. **Clin. Endocrinol.**, v. 60, n. 3, p. 273-287, 2004.
- ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Clinical review: adrenocortical carcinoma clinical update. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 91, n. 6, p. 2027-2037, 2006.
- ALMEIDA, M. Q. et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 93, n. 9, p. 3524-3531, 2008
- ALMEIDA, M. Q. et al. Steroidogenic Factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in Adrenocortical Tumors from children than from adults. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 95, n. 3, p. 1458-1462, 2010.
- ARAB, K. et al. Epigenetic deregulation of TCF21 inhibits metastasis suppressor KISS1 in metastatic melanoma. **Carcinogenesis**. v. 32, p. 1467-1473, 2011.
- ARNALDI, G.; BOSCARO, M. Adrenal incidentaloma. **Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 26, n.4, p. 405-419, 2012.
- BANDIERA, R. et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. **Dev. Cell**, v. 27, n. 1, p. 5-18, 2013
- BACHINSKI, L. L. et al. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23. **Cancer Res.**, v. 65, n. 2, p. 427-431, 2005.
- BAKKE, M.; LUND, J. Transcriptional regulation of the bovine CYP17 gene: two nuclear orphan receptors determine activity of cAMP-responsive sequence 2. **Endocr. Res.**, v. 21, p. 509–516, 1995.

*De acordo:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informações e documentações: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARNHART, K. M.; MELLON, P. L. The orphan nuclear receptor, steroidogenic factor-1, regulates the glycoprotein hormone alpha-subunit gene in pituitary gonadotropes. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 878-885, 1994.

BARDONI, B. et al. A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nat. Genet.**, v. 7, p. 497-501, 1994.

BENOD, C. et al. Nuclear receptor liver homologue 1 (LRH-1) regulates pancreatic cancer cell growth and proliferation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 108, n. 41, p. 16927-16931, 2011.

BERCKER-ANDRE, M.; ANDRE, E.; DeLAMATER, J. F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. **Biochem. Biophys. Res. Commun**, v. 194, n. 3, p. 1371-1379, 1993.

BERGENSTAL, D. et al. Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in men by o,p-DDD. **Trans. Am. Physicians**, v. 72, p. 341, 1959.

BERGENSTAL, D. et al. Chemotherapy of adrenocortical cancer with o,p-DDD. **Ann. Intern. Med.**, v. 53, p. 672-682, 1960.

BERNOIT, G. et al. International Union of Pharmacology. LXVI. Orphan Nuclear Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 4, p. 798-836, 2006.

BLAND, M. L. et al. Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 26, p. 14488-14493, 2000.

BOERBOOM, D. et al. Expression and regulation of transcripts encoding two members of the NR5A nuclear receptor subfamily of orphan nuclear receptors, steroidogenic factor-1 and NR5A2, in equine ovarian cells during the ovulatory process. **Endocrinology**, v. 141, p. 4647-4656, 2000.

BOTRUGNO, O. A. et al. Synergy between LRH1 and β -catenin induces G₁ cyclin-mediated cell proliferation. **Mol. Cell**, v. 15, p. 499-509, 2004.

CARTHARIUS, K. et al. MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. **Bioinformatics**, v. 21, p. 2933-2942, 2005.

BUAAS, F. W. et al. In vivo evidence for the crucial role of SF-1 in steroid producing cells of the testis, ovary, and adrenal gland. **Development**, v. 139, p. 4561-4570, 2012.

CHAND, A. L. et al. The orphan receptor LRH-1 and ER α activate GREB1 expression to induce breast cancer cell proliferation. **Plos One**, v. 7, n. 2, p. e. 31593, 2012.

CHANG, T. Y. et al. Acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 297, p. E1-E9, 2009.

CLARK, B. J. et al. The purification, cloning, and expression of a novel luteinizing hormone-induced mitochondrial protein in MA-10 mouse Leydig tumor cells: characterization of the steroidogenic acute regulatory protein (*StAR*). **J. Biol. Chem.**, v. 269, n. 45, p. 28314-28322, 1994.

CLYNE, C. D. et al. Liver receptor homologue-1 (LRH-1) regulates expression of aromatase in preadipocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 20591–20597, 2002.

CORRE, S.; GALIBERT, M. D. Upstream stimulating factors: highly versatile stress-responsive transcription factors. **Pigment. Cell Res.**, v. 18, n. 5, p. 337-348, 2005.

CRIVELLO, J. F.; JEFCOATE, C.R. Intracellular movement of cholesterol in rat adrenal cells: Kinetics and effects of inhibitors. **J. Biol. Chem.**, v. 255, n. 17, p. 8144-51, 1980.

CUI, S. et al. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reverse in Pod-1 knockout mice. **Development**, v. 131, p. 4095-4105, 2004.

DAGGETT, M. A.; RICE, D. A.; HECKERT, L. L. Expression of steroidogenic factor 1 in the testis requires an E-box and CCAAT box in its promoter proximal region. **Biol. Reprod.**, v. 62, n. 670-679, 2000.

DOGHMAN, M. et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, p. 2968-2987, 2007.

DOGHMAN, M. et al. Inhibition of adrenocortical carcinoma cell proliferation by steroidogenic factor 1 inverse agonist. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 94, p. 2178-2183, 2009.

DOGHMAN, M. et al. Integrative analysis of SF-1 transcription factor dosage impact on genome-wide binding and gene expression regulation. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 41, n. 19, p. 8896-8907, 2013.

DUBÉ, C. et al. The nuclear receptors SF1 and LRH1 are expressed in endometrial cancer cells and regulate steroidogenic gene transcription by cooperating with AP1 factor. **Cancer Lett.**, v. 275, n. 1, p. 127-138, 2009.

EHRLUND, A.; TREUTER, T. et al. Ligand-independent actions of the orphan receptors/corepressor DAX-1 and SHP in metabolism, reproduction and disease. **J. Ster. Biochem. Mol. Biology.**, v. 130, p. 169-179, 2012.

ELLINGER-ZIEGELBAUER, H. et al. FTZ-F1-related orphan receptors in *Xenopus laevis*: transcriptional regulators differentially expressed during early embryogenesis. **Mol. Cell Biol.**, v. 14, p. 2786–2797, 1994.

ELSE, T. et al. Adrenocortical carcinoma. **Endocr. Rev.**, 2013. In press.

FALENDER, A. E. et al. Differential expression of steroidogenic factor-1 and FTF/LRH-1 in the rodent ovary. **Endocrinology**, v. 144, p. 3598-3610, 2003.

FAYARD, E.; AUWERK, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: na orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends in Cell Biology**, v. 14, n. 5, p. 250-260, 2004.

FERRAZ-de-SOUZA, B.; LIN, L.; ACHERMANN, J. C. Steroidogenic factor-1 (SF-1, *NR5A1*) and human disease. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 336, p. 198-205, 2011a.

FERRAZ-de-SOUZA, B. et al. Sterol O-Acyltransferase 1 (SOAT1, ACAT) is a novel target of Steroidogenic Factor-1 (SF-1, *NR5A1*, Ad4BP) in Human Adrenal. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 96, n. 4, p. E663-E668, 2011b.

FERRAZ-de-SOUZA, B. et al. ChIP-on-chip analysis reveals angiopoietin 2 (Ang2, ANGPT2) as a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, *NR5A1*) in human adrenal gland. **The FASEB Journal**, v. 25, p. 1166-1175, 2011c.

FRANÇA, M. M et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression. In human adrenocortical tumor cells. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 371, p. 140-147, 2013.

FIGUEIREDO, B. C. et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 615-619, 2005.

FRANCIS, G. A. et al. Nuclear receptores and the control metabolism. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 65, p. 261-311, 2003

FUNATO, N. et al. Basic helix-loop-helix transcription factor epicardin/capsulin/Pod-1 suppresses differentiation by negative regulation of transcription. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 7486-7493, 2003.

GALARNEAU, L. et al. The 1-fetoprotein locus is activated by a nuclear receptor of the Drosophila FTZ-F1 family. **Mol. Cell Biol.**, v. 16, p. 3853–3865, 1996.

GALARNEAU, L.; DROUIN, R.; BELANGER, L. Assignment of the fetoprotein transcription factor gene (FTF) to human chromosome band 1q32.11 by in situ hybridization. **Cytogenet. Cell. Genet.**, v. 82, p. 269–270, 1998.

GAZDAR, A. F.; OIE, H. K. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer. Res.**, v. 50, n. 17, p. 5488-5496, 1990.

GICQUEL, C. et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 78, n. 6, p. 1444-1453, 1994.

GICQUEL, C. 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.**, v. 82, n. 8, 2559-2565, 1997.

GICQUEL, C. et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. **Cancer Res.**, v. 61, n. 18, p. 6762-6767, 2001.

GILES, R. H.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1653, n. 1, p. 1-24, 2003.

GILL, I. S. The case for laparoscopic adrenalectomy. **J. Urol.**, v. 166, p. 429-436, 2001.

GIORDANO, T. J. et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. **Clin. Cancer Res.**, v. 15, p. 668-676, 2009.

GOODWIN, B. et al. A regulatory cascade of the nuclear receptors FXR, SHP-1, and LRH-1 represses bile acid biosynthesis. **Mol. Cell**, v. 6, p. 517–526, 2000.

GRUMBACH, M. M. et al. Management of the clinically inapparent adrenal mass ("incidentaloma"). **Ann. Intern. Med.**, v. 138, p. 424–429, 2003.

GUMMOW, B. M.; WINNAY, J. N.; HAMMER, G. D. Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF1) on transcription of the rat inhibin alpha gene. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 26572-26579, 2003.

HAHNER S.; FASSNACHT, M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. **Curr. Opin. Investig. Drugs**, v. 6, p. 386–394, 2005.

HANLEY, N. A. et al. Expression of steroidogenic factor 1 and Wilms' tumour 1 during early human gonadal development and sex determination. **Mech. Dev.**, v. 87, p. 175–180, 1999.

HANLEY, N. A. et al. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 57–68, 2001.

HARRIS, A. N.; MELLON, P. L. The basic-helix-loop-helix, leucine zipper transcription factor, USF (upstream stimulatory factor), is a key regulator of SF-1 (steroidogenic factor-1) gene expression in pituitary gonadotrope and steroidogenic cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 12, p. 714-726, 1998.

HE, N. et al. Epigenetic inhibition of nuclear receptor small heterodimer partner is associated with and regulates hepatocellular carcinoma growth. **Gastroenterology**, v. 134, p. 793-802, 2008.

HEATON, J. H. et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and human through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. **Am. J. Pathol.**, v. 181, n. 3, 1017-1033, 2012.

HERMANN, L. J. et al. TP53 germline mutations in adult patients with adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 97, n. 3, p. E476-E485, 2012.

HIDAI, H. et al. Cloning of capsulin, a basic helix-loop-helix factor expressed in progenitor cells of the pericardium and the coronary arteries. **Mechanisms of Development**, v. 73, p. 33–43, 1998.

HINSHELWOOD, M. M. et al. Expression of LRH-1 and SF-1 in the mouse ovary: localization in different cell types correlates with differing function. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 207, p. 39-45, 2003.

HISADA, M. et al. Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, p. 606-611, 1998.

HONDA, S. et al. Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 7494-502, 1993.

HONG C. Y. et al. Modulation of the expression and transactivation of androgen receptor by the basic helix-loop-helix transcription factor Pod-1 through recruitment of histone deacetylase1. **Mol. Endocrinol.**, v. 19, p. 2245-2257, 2005.

HOIVIK, E. A. et al. Molecular aspects of steroidogenic factor 1 (SF-1). **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 315, p. 27-39, 2010.

HU, M. C. et al. Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. **Mol. Endocrinol.**, v. 15, p. 812–818, 2001.

INGRAHAM H.A. et al. The nuclear receptor steroidogenic factor 1 acts at multiple levels of the reproductive axis. **Genes Dev.**, v. 8, p. 2302-2312, 1994.

IKEDA, Y. et al. Developmental expression of mouse steroidogenic factor 1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 654–662, 1994.

ITO M.; YU, R.; JAMESON, J. L. DAX-1 inhibits SF1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. **Mol. Cell Biol.** v. 17, n. 3, p. 1476-1483, 1997.

JACOB, A. L.; LUND, J. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 13391–13394, 1998.

JEFCOATE, C. R.; McNAMARA, B. C.; DiBARTOLOMEIS, M.J. Control of steroid synthesis in adrenal fasciculata cells. **Endocr. Res.**, v. 12, n. 4, p. 315-350, 1986.

JUNQUEIRA, L.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: texto e atlas**. 12th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.

KARUPPU, D. et al. Aromatase and prostaglandin inter-relationships in breast adipose tissue: significance for breast cancer development. **Breast Cancer Res. Treat.**, v. 76, n. 2, p. 103-109, 2002.

KATOH-FUKUI, Y. et al. Mouse Polycomb M33 is required for splenic vascular and adrenal gland formation through regulating Ad4BP/SF1 expression. **Blood**, v. 106, p. 1612-1620, 2005.

KIM, J. W. et al. Liver receptor homolog-1 regulates the expression of steroidogenic acute regulatory protein in human granulosa cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, p. 3042–3047, 2004.

KIM, J. W. et al. The orphan nuclear receptor, liver receptor homolog-1, regulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome p450 enzyme in human granulosa cells. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 90, p. 1678–1685, 2005.

KIM, A. et al. In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **Endocr. Rev.**, v. 30, p. 241-263, 2009.

KLOOS, R. T. et al. Incidentally discovered adrenal masses. **Endocr. Rev.**, v. 16, n. 4, p. 460-484, 1995.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, v. 209, n. 4455, p. 497-499, 1980.

KOVACIC, A.; et al. Inhibition of aromatase transcription promoter II by short heterodimer partner in human pre-adipocytes. **Mol. Endocrinol.**, v. 18, p. 252-259, 2004.

KUDO, T.; SUTOU, S. Molecular cloning of chicken FTZ-F1- related orphan receptors. **Gene**, v. 197, p. 261–268, 1997.

KUDO, T.; SUTOU, S. Chicken LRH-1 gene is transcribed from multiple promoters in steroidogenic organs. **Gene**, v. 367, p. 38-45, 2006

LABELLE-DUMAIS, C. et al. Impaired progesterone production in Nr5a2 mice leads to a reduction in female reproductive function. **Biol. Reprod.**, v. 77, p. 217–225, 2007.

LALA, D. S.; RICE, D. A.; PARKER, K. L. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of fushi tarazu-factor I. **Mol. Endocrinol.**, v. 6, p. 1249–1258, 1992.

LATRONICO, A. C. 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.**, v. 86, n. 10, p. 4970-4973, 2001.

LAU, S. K.; WEISS, L. M. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. **Hum. Pathol.**, v. 40, p. 757-768, 2009.

LEE, H. K. et al. Structure and expression of the orphan nuclear receptor SHP gene. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 14398-14402, 1998.

LEE, Y.K. et al. Activation of the promoter of the orphan receptor SHP by orphan receptors that bind DNA as monomers. **J. Biol. Chem.**, v. 274, p. 20869-20873, 1999.

LEE, Y. K.; MOORE, D. D. Dual mechanisms for repression of the monomeric orphan receptor liver receptor homologous protein-1 by the orphan small heterodimer partner. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 2463-2467, 2002.

LERARIO, A. M.; MORAITIS, A.; HAMMER, G. D. Genetics and epigenetics of adrenocortical tumors. **Mol. Cell Endocrinol.**, 2013. In press.

LI, M. et al. Cloning and characterization of a novel human hepatocyte transcription factor, hB1F, which binds and activates enhancer II of hepatitis B virus. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 29022-29031, 1998.

LIBE, R.; FRATTICI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocr. Relat. Cancer**, v. 14, p. 13-28, 2007.

LIBE, R.; et al. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. **Clin. Cancer Res.**, v. 13, p. 844-850, 2007.

LIN D. et al. Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis. **Science**, v. 267, p. 1828-1831, 1995.

LIN, Q. et al. LRH-1 as a driving factor in pancreatic cancer growth. **Cancer Let.**, 2013. In press.

LIU, D. L. et al. Expression and functional analysis of liver receptor homologue 1 as a potential steroidogenic factor in rat ovary. **Biol. Reprod.**, v. 69, p. 508-517, 2003.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. **Methods**, v. 25, p. 402-408, 2001.

LOGIE, A. et al. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI-H295R cell line. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 23, n. 1, p. 23-32, 1999.

LOTFI, C. F. P. et al. Regulation of Sf1 transcription factor by Pod1/Capsulin/TCF21 in steroidogenic cell lines. In: THE ENDOCRINE SOCIETY'S ANNUAL MEETING, 91., 2009, Washington. **Anais...** Washington: The Endocrine Society's Annual Meeting, 2009. p. 72-73.

LU, J.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. **Mech. Dev.**, v. 73, p. 23-32, 1998.

LU, T. T. et al. Molecular basis for feedback regulation of bile acid synthesis by nuclear receptors. **Mol. Cell**, v. 6, p. 507–515, 2000.

LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, v. 77, p. 481–490, 1994.

MARCHAL, R. et al. A steroidogenic factor-1 binding element is essential for basal human ACTH receptor gene transcription. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 247, p. 28–32, 1998.

MARTINEZ, A. et al. SF-1 controls the aldose reductase *akr1b7* gene promoter in transgenic mice through an atypical binding site. **Endocrinology**, v. 144, p. 2111-2120, p. 2003.

MASSARI, M. E.; MURRE, C. Helix-Loop-Helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. **Mol. Cell Biol.**, v. 20, p. 429-440, 2000.

MILLER, W. L. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1771, n. 6, p.663-76, 2007.

MOORE, K. L. **Anatomia orientada para a clínica**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 1992.

MOUZAT, K. et al., Emerging roles for LXRs and LRH-1 in female reproduction. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 368, p. 47-58, 2013.

MOROHASHI, K. et al. A common trans-acting factor, Ad4-binding protein to the promoters of steroidogenic P450s. **J. Biol. Chem.**, v. 267, p. 17913-17919, 1992.

MOROHASHI, K. et al. Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 643–653, 1994.

MOROHASHI, K. et al. Function and distribution of a steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, v. 53, p. 81–88, 1995.

MOROHASHI, K. et al. Structural and functional abnormalities in the spleen of an mFtz-F1 genedisrupted mouse. **Blood**, v. 93, p. 1586-1594, 1999.

MROSEK, N. et al. Transcriptional regulation of adipocyte formation by the liver receptor homologue 1 (Lrh-1)-Small heterodimerization partner (Shp) network. **Mol. Metab.**, v. 2, n. 3, p. 314-323, 2013.

NAKAJIMA, T. et al. Two isoforms of FTZ-F1 messenger RNA: molecular cloning and their expression in the frog testis. **Gene**, v. 248, p. 203–212, 2000.

NAVILLE, D. et al. SF-1 and the transcriptional regulation of the human ACTH receptor gene. **Endocr. Res.**, v. 24, p. 391-395, 1998.

NAVILLE, D. et al. Three steroidogenic factor-1 binding elements are required for constitutive and cAMP-regulated expression of the human adrenocorticotropin receptor gene. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 255, p. 28-33, 1999.

NETTER, F. H. **Atlas of human Anatomy**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier, 2006.

NITTA, M. et al. CPF: an orphan nuclear receptor that regulates liver-specific expression of the human cholesterol 7_α-hydroxylase gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 96, p. 6660–6665, 1999.

NOMURA, M. In the E box element is required for the expression of the ad4bp gene, a mammalian homologue of ftz-f1 gene, which is essential for adrenal and gonadal development. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 7453–7461, 1995.

OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HEITZ, P. U. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. **Int. J. Cancer**, v. 54, p. 408-410, 1993.

OKI, K. et al. Potassium channel mutant KCNJ5 T158A expression in HAC-15 cells increases aldosterone synthesis. **Endocrinology**, v. 153, n. 4, p. 1774-1782, 2012.

ORTH, D. N.; KOVACS, W. J. The adrenal cortex. In: WILSON, J. D.; FOSTER, D. W.; KRONENBERG, H. M.; LARSEN, P. R. **Willians textbook of endocrinology**. 9th ed. Philadelphia: Saunders Book Company, 1998. p. 517-664.

PARE, J. F. et al. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 21206–21216, 2004.

PENG, N. et al. The role of the orphan nuclear receptor, liver receptor homologue-1, in the regulation of human corpus luteum 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type II. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 88, p. 6020–6028, 2003.

PEZZI, V. et al. Differential expression of steroidogenic factor-1/adrenal 4 binding protein and liver receptor homolog-1 (LRH-1)/fetoprotein transcription factor in the rat testis: LRH-1 as a potential regulator of testicular aromatase expression. **Endocrinology**, v. 145, n. 5, p. 2186-2196, 2004.

PIANOVSK, M. A. et al. SF1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. **Eur. J. Cancer**, v. 42, p. 1040-1043, 2006.

QUAGGIN, S. E.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. **Mech. Dev.**, v. 71, p. 37-48, 1998.

QUAGGIN, S. E. et al. The basic-helix-loop-helix protein Pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. **Development**, v. 126, p. 5771-5783, 1999.

RAGAZOON, B. et al. Transcriptome analysis reveals that p53 and (beta)-catenina alterations occur in a group of aggressive adrenocortical cancer. **Cancer Res.**, v. 70, n. 21, p. 8276-8281, 2010.

RAINEY, W. E. et al. Regulation of human adrenal carcinoma cell (NCIH295) production of C19 steroids. **J. Clin. Endocrinol. Metabol.**, v. 77, p. 731–737, 1993.

RAYMOND, V. M. et al. Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 98, n. 1, p. E119-E125, 2013.

RIBEIRO, R. C. et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 98, n. 16, p. 9330-9335, 2001.

RICE, D. A. et al. A shared promoter element regulates the expression of three steroidogenic enzymes. **Mol. Endocrinol.**, v. 5, p. 1552-1561, 1991.

ROBB, L. et al. Epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. **Dev. Dyn.**, v. 213, n. 1, p. 105-113, 1998.

SABLIN, E. P. et al. The structure of coexpressor Dax-1 bound to its target nuclear receptor LHR-1. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 105, p. 18390-18395, 2008.

SBIERA, S. et al. High diagnostic and prognostic value of Steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. **J. Clin. Endocrin. Metab.**, v. 95, p. 161-171, 2010.

SCHERRER, S. P.; RICE, D. A.; HECKERT, L. L. Expression of steroidogenic factor 1 in the testis requires an interactive array of elements within its proximal promoter. **Biol. Reprod.**, v. 67, p. 1509-1521, 2002.

SCHIMMER, B. P.; WHITE, P. C. Minireview: steroidogenic factor 1 its roles in differentiation, development and disease. **Mol. Endocrinol.**, v. 24, p. 1322-1337, 2010.

SCHOONJANS, K. et al. Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, p. 2058–2062, 2005.

SEOL, W.; CHOI, H. S.; MOORE, D. D. An orphan nuclear hormone receptor that lacks a DNA binding domain and heterodimerizes with other receptors. **Science**, v. 272, p. 1336–1339, 1996.

SHEN, J. H.; INGRAHAM, H. A. Regulation of the orphan nuclear receptor steroidogenic factor 1 by Sox proteins. **Mol. Endocrinol.**, v. 16, p. 529-540, 2002.

SIRIANNI, R. et al. Liver receptor homologue-1 is expressed in human steroidogenic tissues and activates transcription of genes encoding steroidogenic enzymes. **J. Endocrinol.**, v. 174, p. 13–17, 2002.

SMITH, L. T. et al. Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene *TCF21* on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 103, p. 982-987, 2006.

STOCCO, D. M. Intramitochondrial cholesterol transfer. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1486, p. 184-197, 2000.

SUGAWARA, T. et al. Human steroidogenic acute regulatory protein: Functional activity in COS-1 cells, tissue-specific expression, and mapping of the structural gene to 8p11.2 and a pseudogene to chromosome 13. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 92, p. 4778-4782, 1995.

SUNG, B. et al. Regulation of OCT4 gene expression by liver receptor homolog 1 in human embryonic carcinoma cells. **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, v. 427, p. 315-320, 2012.

SUZUKI, T. et al. LXXLL-related motifs in Dax-1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 and LRH-1. **Mol. Cell. Biol.**, v. 23, p. 238-249, 2003.

SUZUKI, K.; MATSUBARA, H. Recent advances in p53 research and cancer treatment. **J. Biomed. Biotechnol.**, p. 978312, 2011.

TAMURA, M. et al. Pod-1/capsulin shows a sex-and-stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF1. **Mech. Dev.**, v. 102, p. 135-144, 2001.

TAKAYAMA, K. et al. Contribution of Ad4BP, a steroidogenic cell-specific transcription factor, to regulation of the human CYP11A and bovine CYP11B genes through their distal promoters. **J. Biochem.**, v. 116, p. 193-203, 1994.

TISSIER, F. et al. Mutations of β -catenina in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signalling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer Res.**, v. 65, p. 7622-7627, 2005.

UNTERGASSER, A. et al. Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. **Nucleic. Acids. Res.**, v. 35, p. 71-74, 2007.

UTSUMOMIYA, H. et al. Upstream stimulatory factor-2 regulates steroidogenic factor-1 expression in endometriosis. **Mol. Endocrinol.**, v. 22, p. 904-914, 2008.

VAL, P. et al. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl. Receptor**, v.1, p. 1-23, 2003.

VARLEY, J. M. et al. Are there low-penetrance TP53 gene? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am. J. Hum. Genet.**, v. 65, n. 4, p. 995-1006, 1999.

VOGELSTEIN, B.; LANE, D.; LEVINE, A.J. Surfing the p53 network. **Nature**, v. 408, n. 6810, p. 307-310, 2000.

VOLLE, D. H. et al. Multiple roles of the nuclear receptors for oxysterols liver X receptor to maintain male fertility. **Mol. Endocrinol.**, v. 21, p. 1014-1027, 2007.

ZHANG, Y. et al. Orphan receptor small heterodimer partner suppresses tumorigenesis by modulating cyclin D1 expression and cellular proliferation. **Hepatology**, v. 48, p. 289-298, 2008.

ZUBAIR, M.; PARKER, K. L.; MOROHASHI, K. Development links between the fetal and adult zones of the adrenal cortex revealed by lineage tracing. **Mol. Cell Biol.**, v. 28, p. 7030-7040, 2008.

WAGNER, J. et al. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. **J. Natl. Can. Inst.**, v. 86, n. 22, p. 1701-1710, 1994.

WANG, Z. N.; BASSET, M.; RAINEY, W. E. Liver receptor homologue-1 is expressed in the adrenal and can regulate transcription of 11 β -hydroxylase. **J. Mol. Endocrinol.**, v. 27, p. 255-258, 2001.

WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 8, n. 3, p. 163-169, 1984.

WOOD, M. A. et al. Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineage in *M. musculus*. **Development**, v. 140, n. 22, p. 4522-4532, 2013.

WOODSON, K. G. et al., Characterization of the promoter of SF-1, an orphan nuclear receptor required for adrenal and gonadal development. **Mol. Endocrinol.**, v. 11, p. 117-126, 1997.

WU, Y. G. et al. Testosterone, not 5 α -dihydrotestosterone, stimulates LRH-1 leading to FSH-independent expression of Cyp19 and P450scc in granulosa cells.

Mol. Endocrinol., v. 25, p. 656–668, 2011.

YASUMURA, Y. V.; BUONASSISI, V.; SATO, G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. **Cancer Res.**, v. 26, n. 3, p. 529-535, 1966.

YAZAWA, T. et al. Liver receptor homolog-1 regulates the transcription of steroidogenic enzymes and induces the differentiation of mesenchymal stem cells into steroidogenic cells. **Endocrinology**, v. 150, p. 3885–3893, 2009

YU, F. Q. et al. Activation of the p38 MAPK pathway by follicle-stimulating hormone regulates steroidogenesis in granulosa cells differentially. **J. Endocrinol.**, v. 186, p. 85-96, 2005.