Bárbara dos Santos Passaia

**Análise da expressão do fator de transcrição
TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em
tumores adrenocorticais humanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

São Paulo
2016

Bárbara dos Santos Passaia

**Análise da expressão do fator de transcrição
TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em
tumores adrenocorticais humanos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfofuncionais do
Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo para obtenção de
título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini
Pacicco Lotfi

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Passaia, Bárbara dos Santos.

Análise da expressão do fator de transcrição TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em tumores adrenocorticais humanos / Bárbara dos Santos Passaia. -- São Paulo, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Anatomia. Área de concentração: Ciências Morfofuncionais. Linha de pesquisa: Estudo da expressão gênica em tumores do córtex da glândula suprarrenal.

Versão do título para o inglês: Analysis of TCF21/POD-1 transcription factor and cycle cells genes expression in adult adrenocortical tumors.

1. POD-1 2. BUB1B 3. Genes do ciclo celular 4. Córtex adrenal 5. Tumor adrenocortical 6. Glândula suprarrenal I. Lofti, Prof. Dr. Claudimara Ferini Pacicco II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB058/2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Bárbara dos Santos Passaia.

Título da Dissertação: Análise da expressão do fator de transcrição TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em tumores adrenocorticais humanos.

Orientador(a): Prof. Dr. Claudimara Ferini Pacicco Lofti.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS**

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - cep. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (11) 3091.7733 telefax : (55) (11) 3091-8405
e-mail: cep@icb.usp.br

São Paulo, 11 de março de 2014.

PARECER 1167/CEPSH

A Comissão de *Ética em Pesquisas em Seres Humanos* do ICB, na sessão realizada no dia 26.02.2014, **APROVOU** o projeto intitulado: "*Análise da expressão dos fatores de transcrição POD-1, SF-1, BUB1B e PINK1 em tumores adrenocorticais humanos*" pesquisadora **CLAUDIMARA FERINI PACICCO LOTFI** e aluna **BÁRBARA DOS SANTOS PASSAIA**.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais e final), de acordo com a Resolução nº 466/12, item II, II.19 e II.20, do Conselho Nacional de Saúde, conforme modelo constante no site: icb.usp.br.

Ao pesquisador cabe também finalizar o processo junto à Plataforma Brasil quando do encerramento deste.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em **26.02.2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. PAULO M.A. ZANOTTO
Coordenador da Comissão de Ética em
Pesquisas com Seres Humanos - ICB/USP

Aos meus pais, Emília e Reinaldo

À minha avó, Rosalina

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por todo amor, apoio e paciência.

À minha avó, pelo amor e compreensão.

À minha orientadora, Dra. Claudimara Lotfi, pela oportunidade, paciência e orientação de sempre.

Ao Dr. Antonio Lerario, pelos ensinamentos durante o início do desenvolvimento do trabalho.

À Dra. Maria Candida Fragoso, do LIM-42 da Faculdade de Medicina-USP, pelo auxílio para obter os dados clínicos e moleculares dos pacientes.

Ao Dr. Madson Almeida, do LIM-42 da Faculdade de Medicina-USP, pelas amostras cedidas.

Ao Dr. Sonir Antonini, e seu aluno Marcelo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, pelas amostras de tumores adrenocorticais pediátricos e amostras de tecido normal pediátrico.

À Dra. Elen Haruka Miyabara, pelo uso do microscópio de fluorescência.

Aos funcionários e alunos do LIM-42, pelo auxílio nos momentos que precisei utilizar o laboratório.

À Rosana Prisco, responsável pela assistência estatística aos alunos do ICB-USP, por sempre estar disponível para esclarecer dúvidas.

Aos funcionários e colegas de departamento, por sempre estarem disponíveis para ajudar.

Aos antigos alunos do laboratório, pelos ensinamentos durante meu treinamento.

Aos amigos do laboratório, por estarem presentes nos momentos difíceis e por tornarem a rotina mais divertida.

Aos meus amigos, de faculdade e colégio, por todo o apoio e risadas proporcionadas.

À CAPES e ao CNPq.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP, por todo o investimento financeiro durante o desenvolvimento desse trabalho (nº processo FAPESP: 2013/23548-1).

Aos pacientes e familiares, por cederem amostras tão valiosas para o avanço dos estudos em tumores adrenocorticais.

“É muito melhor lançar-se em buscas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.” – Theodore Roosevelt

RESUMO

Passaia BP. Análise da expressão do fator de transcrição TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em tumores adrenocorticais humanos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As massas adrenocorticais são majoritariamente (70-80%) adenomas adrenocorticais (ACA). Os carcinomas adrenocorticais (ACC) são mais raros e de prognóstico restrito, com incidência de 1-2 casos por milhão, com alta taxa de reincidência (70-80%). Apesar dos tumores adrenocorticais (ACT) serem raros, no Brasil a incidência desses tumores em crianças é cerca de 10 vezes superior ao do restante do mundo, devido a uma mutação do gene TP53. Atualmente, o diagnóstico de massas adrenocorticais é realizado através dos critérios de Weiss, que possuem limitações, e por isso é intensa a busca de novos marcadores moleculares que facilite o diagnóstico de ACTs. POD-1/ TCF21 é um fator de transcrição do tipo helix-loop-helix básica (bHLH) expresso nos sítios de interação mesênquima-epitélio durante o desenvolvimento embrionário. Em ACTs, POD-1 regula a expressão endógena de SF-1 através da ligação na sequência E-box da região promotora de SF-1, e nesses tumores parece estar relacionado negativamente com genes reguladores do ciclo celular, como BUB1B. BUB1B é um gene que codifica uma quinase com funções importantes durante o checkpoint mitótico. A expressão de BUB1B é considerada fator de prognóstico em diferentes tipos de tumores, inclusive em ACTs humanos, nos quais a expressão combinada de BUB1B e PINK1 (Δ CtBUB1B - Δ CtPINK1) mostrou-se um bom marcador de sobrevida em pacientes com ACC. PINK1, quinase 1 induzida por PTEN, é regulada principalmente pela mitocôndria, e em ACTs sua expressão está reduzida em ACC mais agressivos. Temos como hipótese que a expressão de POD-1 pode ter valor diferencial no diagnóstico de massas adrenocorticais, e que a análise da expressão combinada de POD-1, BUB1B e PINK1 pode ter valor diferencial para prognóstico de pacientes com ACT. Nesse trabalho foram analisados, por reação de qPCR com sondas Taqman, o cDNA obtido de 130 amostras de tumores: 79 adultos (44 ACAs e 35 ACCs), 35 crianças com menos de 5 anos de idade (27 ACAs e 8 ACCs) e 16 crianças de 5 a 18 anos de idade (6 ACAs e 10 ACCs). Nossos resultados mostram que POD-1 e BUB1B tem valor diferencial em ACT adulto e que a expressão combinada de POD-1 e BUB1B pode ser um marcador de prognóstico em pacientes com carcinoma adulto. Enquanto que, a expressão combinada de POD-1 e SF-1 pode ter valor de diagnóstico em pacientes pediátricos com menos de 5 anos. Em resumo, concluímos que estudos experimentais devem ser realizados para comprovar a relação entre os genes estudados, para que os resultados sejam sólidos o suficiente para serem utilizados no diagnóstico e prognóstico dos tumores adrenocorticais.

Palavras-chave: POD-1. BUB1B. Genes do ciclo celular. Córtex adrenal. Tumor adrenocortical.

ABSTRACT

Passaia BP. Analysis of TCF21/POD-1 transcription factor and cell cycle genes expression in adult adrenocortical tumors. [Master Thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The adrenocortical masses are mostly (70-80%) adrenocortical adenomas (ACA). Adrenocortical carcinomas (ACC) are scarce and have limited prognosis, with an incidence of 1-2 cases per million and high recurrence rate (70-80%). Despite adrenocortical tumors (ACT) are rare in Brazil the incidence of these tumors in children is about 10 times higher than the rest of the world, due to a mutation of the TP53 gene. Currently, the diagnosis of adrenocortical mass is carried through Weiss criteria that have limitations, so it is intensive the search for new molecular markers that facilitate the diagnostic of ACTs. TCF21/POD-1 is a transcription factor helix-loop-helix type expressed in mesenchymal-epithelial sites of interaction during embryonic development. In ACTs, POD-1 regulates the expression of endogenous SF-1 through binding the E-box sequence of SF-1 promoter region, and seems to be negatively related with cell cycle regulatory genes such as BUB1B. BUB1B is a gene encoding a kinase with important function during mitotic checkpoint. The expression of BUB1B is considered a prognostic factor in different types of tumors, including ACTs. Combined expression of BUB1B and PINK1 (Δ CtBUB1B - Δ CtPINK1) has been shown to be a good marker of survival in adults with ACC, whereas the PINK1 expression is reduced in the most aggressive ACC. We hypothesized that the POD-1 expression may have differential value in the diagnosis of adrenocortical masses, and that the analysis of the combined expression of POD-1, BUB1B and PINK1 may have differential value for the prognosis of patients with ACT. In this work were analyzed by PCRq Taqman probes the cDNA obtained from 130 tumor samples: 79 adults (44 ACAs and 35 ACCs), 35 children under 5 years old (27 ACAs and 8 ACCs) and 16 children 5-18 years of age (6 ACAs and 10 ACCs). Our results show that POD-1 and BUB1B has differential value in adult ACT, and the combined expression of POD-1 and BUB1B may have a prognostic value in patients with adult carcinoma. In addition, the combined expression of POD-1 and SF-1 might have diagnostic value in pediatric patients younger than 5 years. In summary, we conclude that experimental studies should be conducted to confirm the relationship between the genes studied, so that the results are solid enough to be used in the diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors.

Keywords: POD-1. BUB1B. Cell cycle genes. Adrenal cortex. Adrenocortical tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão relativa dos genes POD-1, BUB1B e PINK1 em adenomas (ACA) e carcinomas adrenocorticais (ACC) de adultos.	45
Figura 2 - Expressão relativa dos genes POD-1 e BUB1B entre em adenomas (ACA) adultos e pediátricos.	46
Figura 3 - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B e SF-1 em adenomas adultos.	48
Figura 4 - Análise das correlações entre as expressões dos genes PINK1 e IGF1R em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) adultos.	49
Figura 5 - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas e carcinomas pediátricos.	50
Figura 6 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor em pacientes com carcinoma adulto.	53
Figura 7 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor em pacientes pediátricos < 5 anos.	55
Figura 8 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor em pacientes com ACT.	57
Figura 9 - Fotomicrografia representativa, de contraste de fase e de fluorescência para GFP, das células.	58
Figura 10 - Análise da expressão relativa de POD-1 e de BUB1B em células da linhagem de tumor adrenocortical humano NCI-H295R.	59
Figura 11 - Análise da expressão relativa de POD-1 e de BUB1B em células da cultura secundária ACC-T36.	60
Figura 1S - Expressão relativa dos genes POD-1, BUB1B e PINK1 em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) adultos e pediátricos.	81
Figura 2S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas adultos.	82
Figura 3S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em carcinomas adultos.	83

Figura 4S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas pediátricos com mais de 5 anos.	84
Figura 5S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em carcinomas pediátricos com mais de 5 anos.	85
Figura 6S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas pediátricos com menos de 5 anos.....	86
Figura 7S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em carcinomas pediátricos com menos de 5 anos.	87

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes.....	36
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA - adenoma adrenocortical

ACC - carcinoma adrenocortical

ACT - tumor adrenocortical

ACTB - beta actina

ACTH - hormônio adrenocorticotrópico

ATCC - *The ATCC Cell Biology Collection*

bHLH - proteína regulatória do tipo *helix-loop-helix* básica

BUB1B - *BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homolog beta 1*

BUB3 - *BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homolog 3*

CCNA2 - ciclina A2

CCNB2 - ciclina B2

CDC20 - *cell division cycle 20*

CDK1 - ciclina dependente de quinase 1

CHEK2 - quinase de ponto de checagem 2

CRH - *corticotrophin release hormone*

CYP11A1 - *cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1*

CYP11B1 - *cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1*

CYP19A1 - *cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1*

DAX-1 - fator codificado pela região do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita

DDT - dichlorodiphenyltrichloroethane

E2F2 - fator de transcrição E2F2

GATA4 - proteína de ligação GATA 4

GFP - *green fluorescent protein*

GLI1 - oncogene associado à glioma homolog 1

GUSB - *glucuronidase beta*

HPA - *hypothalamus-pituitary-adrenal*

HSD3B2 - *3-Beta-HSD II*

IGF1R - receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1

ITS - *Insulin-Transferrin-Selenium*

KEGG - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways*

LOH - perda de heterozigosidade

LRH-1 - *Liver Receptor Homolog 1*

MAD2 - *mitotic spindle checkpoint protein*

NOTCH1 - NOTCH homólogo 1

NR5A1 - *nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1*

ORC2 - complexo de reconhecimento de origem – subunidade 2

PINK1 - quinase 1 induzida por PTEN

POD-1 - *podocyte-expressed 1*

qPCR - reação de PCR quantitativo

SF-1 - fator esteroideogênico 1

SHP - *Small Heterodimer Partner*

SKP2 - proteína quinase associada à fase S - 2

StAR - *steroidogenic acute regulatory protein*

STR - *short tandem repeat*

TCF21 - *transcriptor factor 21*

TP53 - gene que codifica a proteína p53

USF-1 - fator estimulatório *upstream* 1

USF-2 - fator estimulatório *upstream* 2

WT1 - proteína do tumor de Wilms -1

YWHAQ - tirosina 3-mono-oxigenase

SUMÁRIO

1	Introdução.....	19
1.1	Glândula suprarrenal e doenças relacionadas	20
1.2	Tumores adrenocorticais	22
1.3	Tumores adrenocorticais pediátricos.....	23
1.4	Fator Esteroidogênico 1 (SF-1/NR5A1)	25
1.5	O fator de transcrição TCF21/POD-1	26
1.6	POD-1 em tumores adrenocorticais	27
1.7	O gene BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homolog beta 1 (<i>BUB1B</i>)	28
2	Objetivos.....	31
3	Materiais e Métodos	33
3.1	As amostras de tumores adrenocorticais humanos	34
3.2	Culturas de células adrenocorticais humanas e a transfecção com pCMVMyc-Pod-1.....	37
3.3	Plasmídeos e amplificação	38
3.4	Transfecção transiente da linhagem NCI-H295R e da cultura ACC-T36	39
3.5	Extração de RNA e síntese de cDNA	40
3.6	PCR em tempo real	40
3.7	Análise estatística.....	41
4	Resultados	43
4.1	Expressão relativa dos genes <i>POD-1</i> , <i>BUB1B</i> e <i>PINK1</i>	44
4.2	Análise da correlação entre a expressão dos genes <i>POD-1</i> , <i>BUB1B</i> , <i>PINK1</i> , <i>SF-1</i> e <i>IGFR1</i> em tumores de adultos.....	47
4.3	Análise da correlação entre a expressão dos genes <i>POD-1</i> , <i>BUB1B</i> , <i>PINK1</i> , <i>SF-1</i> e <i>IGFR1</i> das amostras pediátricas	49
4.4	Expressão combinada dos genes <i>POD-1</i> , <i>BUB1B</i> e <i>PINK1</i> como fator de prognóstico em pacientes adultos.....	51

4.5 Expressão combinada dos genes <i>POD-1</i> , <i>SF-1</i> , <i>BUB1B</i> e <i>PINK1</i> como fator de diagnóstico em pacientes pediátricos	54
4.6 Sobrevida geral em pacientes com tumores adrenocorticais	56
4.7 Teste de eficiência de transfecção em cultura de células de tumores adrenocorticais humanos	58
4.8 Validação da relação entre os genes estudados através da hiperexpressão de <i>POD-1</i> em cultura de células de tumores adrenocorticais humanos	59
5 Discussão	61
6 Conclusões	71
Referências	74
Anexos	80
A – Figuras Suplementares	81

1 Introdução

1.1 Glândula suprarrenal e doenças relacionadas

A glândula suprarrenal é constituída por dois tecidos distintos, com origens embrionárias diferentes; a região mais interna é a medula, que é derivada da crista neural, e responsável pela secreção de catecolaminas, como a adrenalina. Envolvendo a medula está o córtex adrenal, que é derivado da mesoderme e compõe a maior parte do órgão. O córtex secreta hormônios esteroides responsáveis pela manutenção da homeostase corporal, e é composto por três zonas concêntricas com características histológicas diferentes. A zona mais externa é a zona glomerulosa, composta por células piramidais, organizadas em cordões, seguida da zona fasciculada, com células organizadas radialmente e separadas por vasos sanguíneos, e a mais interna, a zona reticular, composta por células menores dispostas em cordões irregulares ^{1,2}. Cada zona é responsável pela síntese e secreção de diferentes hormônios, sendo que a zona glomerulosa produz mineralocorticóides, como aldosterona, a zona fasciculada produz glicocorticóides, como cortisol, e a zona reticular hormônios andrógenos, como a testosterona ². A produção e secreção de cortisol são reguladas pela interação entre o hipotálamo, a hipófise e a glândula suprarrenal. Esse mecanismo de controle é denominado eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ou eixo HPA (*hypothalamus-pituitary-adrenal*), que responde a estímulos internos, como estímulos neurais, e externos, como a luz do ambiente. A resposta a diferentes estímulos leva à liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH - *corticotrophin release hormone*) e da vasopressina no sistema porta hipofisário, levando à produção e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH estimula, no córtex da glândula suprarrenal, a secreção de cortisol e de outros esteróides.

A regulação negativa do eixo ocorre através da inibição da síntese do hormônio CRH, da vasopressina e do ACTH quando há aumento do nível de glicocorticóides³.

A desregulação no eixo HPA pode levar a um aumento da produção do hormônio ACTH na hipófise, e consequentemente um aumento da produção de cortisol, sendo uma das causas da Síndrome de Cushing, que também pode ocorrer por produção ectópica do ACTH⁴. Os problemas que o hipercortisolismo pode causar incluem deficiências cardiovasculares e musculares, e também problemas psicológicos como ansiedade e depressão⁵. Quanto mais tempo o corpo permanecer exposto ao excesso de cortisol, mais os sintomas tornam-se evidentes, como aumento de gordura no abdômen e rosto, membros desproporcionais à estrutura do corpo e estrias roxas, que são características da síndrome^{4,6}.

Por outro lado, a insuficiência adrenal tem como sintomas a perda de peso, anorexia, náuseas, fraqueza e fadiga, que são causados pela deficiência de produção de glicocorticóides, mineralocorticóides ou hormônios andrógenos. A insuficiência na produção dos hormônios característicos do córtex da glândula adrenal pode ocorrer por problemas funcionais no córtex adrenal, e é denominada insuficiência adrenal primária. Os defeitos no lobo anterior da hipófise determinam a insuficiência adrenal secundária, enquanto a insuficiência adrenal terciária pode ocorrer por qualquer alteração no hipotálamo, que na maioria dos casos é causada por administração crônica excessiva de glicocorticoides sintéticos que interferem na secreção de CRH pelo hipotálamo⁷.

Diferentemente da insuficiência adrenal, o aldosteronismo primário, ou seja, o aumento de produção de aldosterona pela zona glomerulosa do córtex adrenal, leva a retenção de sódio e excreção excessiva de potássio que pode causar hipocalemia, supressão da renina plasmática, hipertensão e

danos cardiovasculares. Normalmente está associado a hiperplasia adrenal ou a um tumor adrenocortical benigno ⁸.

1.2 Tumores adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (ACTs) são comumente encontrados acidentalmente através de exames de imagem, sendo majoritariamente (70-80%) tumores benignos, isto é, adenomas adrenocorticais (ACA), e que podem ser funcionantes ou não. Os adenomas funcionantes são diagnosticados por causa das alterações hormonais que eles promovem, e estão frequentemente associados à Síndrome de Cushing ou virilização ⁹. Os tumores malignos, carcinomas adrenocorticais (ACC), são mais raros e de prognóstico restrito, com incidência de 1-2 casos por milhão. Cerca de 50% dos carcinomas são funcionantes e 95% tem mais de 5 cm ¹⁰⁻¹². O tratamento para pacientes com ACC é a ressecção cirúrgica completa, que está associada a bom prognóstico, e administração do adrenolítico mitotano, no entanto, a probabilidade de reincidência do tumor é alta (70-80%) ¹³. O tratamento com o mitotano, que é derivado do inseticida DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), é a terapia química mais utilizada, porém causa reações neurológicas e gastrointestinais adversas ¹¹. Os níveis tolerados variam de 14–20 mg/dl e a dose comum tolerada é de 3-4 g por dia, sendo que a administração inicial deve ser de 2 g e o tratamento deve durar até 2 anos ¹⁰. Por isso, exames de urina devem ser realizados periodicamente para verificar a dosagem adequada para cada paciente ¹⁰.

O diagnóstico de massas adrenocorticais é realizado através da utilização de critérios anatomopatológicos estabelecidos por Weiss e conhecidos como os critérios ou score de Weiss, que utiliza nove parâmetros morfológicos: grau nuclear, elevada taxa mitótica, presença de mitoses atípicas, células claras constituindo 25% ou menos do tumor,

arquitetura difusa, necrose, invasão de estruturas venosas, invasão sinusoidal e invasão da cápsula tumoral. O tumor é considerado carcinoma se pelo menos três desses parâmetros forem identificados na biópsia adrenocortical ¹⁴. Embora os critérios tenham sido revisados para uma maior acurácia do diagnóstico, o sistema com os nove parâmetros ainda é usado habitualmente para o diagnóstico de ACTs, apesar de possuir limitações ^{15,16}. Estas restrições parecem ser mais significativas para diferenciar tumores benignos de malignos em pacientes pediátricos, pois mesmo os critérios histológicos malignos encontrados nesses pacientes não estão relacionados a um prognóstico ruim, enquanto tumores pequenos tem um prognóstico bom, independentemente das características malignas ¹⁷. Por isso, é importante que sejam identificados novos marcadores que facilitem o diagnóstico das massas adrenocorticais, principalmente em tumores pediátricos.

1.3 Tumores adrenocorticais pediátricos

Apesar dos tumores adrenocorticais serem raros e acometerem principalmente adultos acima de 30 anos, no Brasil, especialmente nos estados de São Paulo e Paraná, a incidência de tumores adrenocorticais em crianças é cerca de 10 vezes superior ao do restante do mundo ^{10,18}. A maioria destes pacientes são crianças do sexo feminino com menos de 4 anos e de uma maneira geral apresentam melhor prognóstico do que os pacientes adultos ^{10,18,19}. A alta incidência de ACT pediátricos no Brasil ocorre devido a uma mutação germinativa no gene *TP53* (R337H) ^{20,21}. O gene *TP53* é um reconhecido supressor de tumor, além de estar relacionado com o processo de reparo do DNA ²². Em 2001, foi comprovada a perda de heterozigosidade (LOH) no cromossomo 17p13, loco *TP53*, em 85% dos

carcinomas adultos, enquanto o mesmo não foi observado em ACAs²³. Foram observadas mutações somáticas no gene *TP53* em até 33% dos carcinomas, entretanto apenas 6% dos adenomas apresentaram mutações²⁴. Em ACTs pediátricos as mutações germinativas foram observadas em 68% dos 37 pacientes estudados, sendo que 12 pacientes eram brasileiros e apresentavam a mutação R337H. Em três pacientes que possuíam mutações germinativas em *TP53* também foram verificadas mutações somáticas (R175H, R273C) e deleção homozigota no cromossomo 17²⁵. A mutação R337H em *TP53* parece estar relacionada apenas com o tecido adrenocortical, visto que pacientes com essa mutação não desenvolvem outros tipos de tumores. Essa especificidade pode ocorrer devido a troca de uma arginina por uma histidina que tornaria a proteína p53 parcialmente funcional, e dependente do pH do tecido²⁶.

A análise de 254 pacientes pediátricos mostrou que a maioria dos casos de tumores adrenocorticais infantis ocorre no sexo feminino, e até o 3º ano de vida, enquanto a partir do 4º ano até o 12º ano de vida a distribuição torna-se igualitária entre os sexos. Também foi observado que os pacientes infantis apresentam mais virilização e, por consequência, características clínicas mais evidentes. Já os tumores adrenocorticais de jovens crianças ou adolescentes, estão mais associados à Síndrome de Cushing ou não são funcionantes. A completa ressecção cirúrgica é o melhor tratamento para tumores nessa faixa etária e o tamanho do tumor está fortemente relacionado ao risco de reincidência. Mas, de maneira geral, crianças com menos de 4 anos tem um melhor prognóstico quando comparadas às demais¹⁹. Entretanto, ainda são poucos marcadores moleculares definidos para esta faixa etária. Entre os marcadores definidos está a expressão do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1R*) como fator de prognóstico em tumores pediátricos e outro

marcador relevante para ACTs pediátricos é o fator esteroidogênico 1 (SF-1)^{27,28}.

1.4 Fator Esteroidogênico 1 (SF-1/NR5A1)

O fator esteroidogênico 1 (SF-1) faz parte da superfamília de receptores nucleares, e está envolvido no desenvolvimento do tecido adrenocortical, pois está expresso no primórdio adrenogonadal e no córtex fetal e definitivo^{29,30}. No córtex adrenal definitivo tem como função o controle da expressão das enzimas envolvidas na produção de esteroides. Em tumores adrenocorticais adultos e pediátricos foi observado um aumento de cópias do gene *SF-1* de 10% e 47%, respectivamente. Enquanto a expressão da proteína SF-1 estava aumentada em 56% dos tumores pediátricos, nos tumores de adultos apenas 19% apresentavam essa proteína aumentada. No entanto, não houve diferença da expressão do gene *SF-1* entre carcinomas e adenomas, ou mesmo entre tumores funcionantes e não-funcionantes²⁸. Em tumores pediátricos a região do cromossomo 9q, que contém o gene NOTCH homólogo 1 (*NOTCH1*), que é um gene que codifica um receptor envolvido na via de sinalização Notch, importante durante o desenvolvimento, e que também contém o gene *SF-1*, está amplificada em 90% dos tumores adrenocorticais infantis, no entanto o mesmo não foi observado em ACTs adultos^{25,31,32}.

Em células de carcinoma adrenocortical humano, linhagem NCI-H295R, o aumento da expressão do gene *SF-1* aumentou a capacidade de proliferação dessas células. Em camundongos, a hiperexpressão de *SF-1* levou à hiperplasia adrenocortical e à formação de tumor, sugerindo que esse fator pode estar envolvido na tumorigênese do córtex adrenal³³. SF-1 regula a expressão de genes como o das enzimas esteroidogênicas CYP11A1 e CYP11B1, e é negativamente regulado por um fator

codificado pela região do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (DAX-1), que impede a ativação transcricional de *SF-1* nas gônadas^{34,35}. Na linhagem Y1 de células de tumores adrenocorticais de camundongo, foi observado que os fatores estimulatórios *upstream* 1 e 2 (USF-1 e USF-2) são capazes de se ligar à região E-box proximal de *SF-1* e estão envolvidos na estimulação da sua transcrição basal³⁶. Por outro lado, foi descrito que o fator de transcrição POD-1, também conhecido como Capsulina, Epicardina ou TCF21, foi capaz de se ligar à região promotora de *SF-1*, e regular negativamente sua expressão³⁷⁻³⁹.

1.5 O fator de transcrição TCF21/POD-1

TCF21 ou POD-1 é uma proteína regulatória do tipo helix-loop-helix básica (bHLH) expressa nos sítios de interação mesênquima-epitélio durante o desenvolvimento dos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratório e urogenital. Camundongos *knock-out* para *POD-1* morrem ao nascer por insuficiência pulmonar e cardíaca, além de apresentarem outros defeitos, o que mostra a importância desse fator no desenvolvimento embrionário⁴⁰⁻⁴⁴. Durante o desenvolvimento do primórdio adrenogonadal, as células mesenquimais que expressam a proteína do tumor de Wilms -1 (WT1) e SF-1 formarão a cápsula adrenal. Essas células apenas irão interromper sua diferenciação devido à expressão de POD-1, que por consequência irá inibir a expressão de SF-1. Por sua vez, na região subcapsular de glândulas adrenais adultas foi identificada uma população de células progenitoras similares ao primórdio adrenogonadal, que expressavam os genes *POD-1*, *WT1*, o gene codificante da proteína de ligação GATA 4 (*GATA4*) e o oncogene associado à glioma homolog 1

(*GLII*). Assim, *POD-1* seria um provável marcador de células-tronco adrenocorticais ^{45,46}.

1.6 *POD-1* em tumores adrenocorticais

Como citado anteriormente, *SF-1* pode ser reprimido por *POD-1*, que é capaz de se ligar diretamente na sequência E-box do promotor de *SF-1*, inibindo sua expressão endógena e, conseqüentemente, diminuindo a expressão das enzimas esteroidogênicas. A hiperexpressão de *POD-1* levou à diminuição da expressão de *SF-1* na linhagem NCI-H295R, células de carcinoma adrenocortical humano, e também na cultura secundária de carcinoma adrenocortical humano, células ACC-T36, obtida no nosso laboratório a partir de um fragmento de carcinoma de paciente adulto ³⁷. A relação entre *SF-1* e *POD-1* foi observada anteriormente em células de Leydig, onde *POD-1* supostamente reprime a expressão de *SF-1* por competir com USF-1, responsável pela transcrição basal deste gene. Neste trabalho, observou-se que as células de Leydig *knockout* para *POD-1* tiveram um aumento na expressão de *SF-1* e também um aumento de expansão deste grupo celular ³⁸. Em camundongos silenciados para *POD-1*, houve reversão de sexo e expressão anormal de *SF-1* no sistema urogenital ³⁹. Também foi observado que *POD-1* é capaz de se ligar em duas regiões do promotor do *Small Heterodimer Partner* (*SHP*), fator que regula negativamente o *Liver Receptor Homolog 1* (*LRH-1*) ⁴⁷. *LRH-1* é um receptor nuclear da mesma superfamília do *SF-1*, a subfamília Ftz-F1 ⁴⁸. *LRH-1* é importante para o desenvolvimento do pâncreas, do trato gastrointestinal e do fígado, e camundongos silenciados para este gene não são viáveis e morrem no estágio embrionário E7.5 ⁴⁹. *LRH-1* também regula o desenvolvimento e função dos ovários, principalmente no

metabolismo do colesterol⁵⁰. *LRH-1* também está envolvido no desenvolvimento de tumores intestinais e na capacidade de invasão em células de câncer de mama^{51,52}. Em conjunto, esses dados sugerem que *POD-1* pode ser um importante fator em células de carcinomas adrenocorticais e também em outros tipos de tumores.

Em trabalho anterior a expressão de *POD-1* foi analisada por ensaio de microarray (*Gene Expression Omnibus (GEO)* série GSE10927), em 10 amostras de tecido adrenocortical normal humano, 22 ACAs e 33 ACCs, e foi observado que *POD-1* está mais expresso em adenomas do que em carcinomas adultos. Foi também detectado através do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways (KEGG)* que 3 vias principais estão correlacionadas negativamente com *POD-1*: 1) ciclo celular; 2) mecanismos de controle do mRNA; 3) Biossíntese de glicosaminoglicanos heparan sulfato. Nove genes de controle do ciclo celular foram correlacionados negativamente com *POD-1*: tirosina 3-mono-oxigenase (*YWHAQ*), quinase de ponto de checagem 2 (*CHEK2*), fator de transcrição E2F2 (*E2F2*), complexo de reconhecimento de origem – subunidade 2 (*ORC2*), proteína quinase associada à fase S - 2 (*SKP2*), BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1 (*BUB1B*), ciclina A2 (*CCNA2*), ciclina B2 (*CCNB2*) e ciclina dependente de quinase 1 (*CDK1*). O que sugere o envolvimento de *POD-1* com o controle do ciclo celular^{37,53}.

1.7 O gene BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1 (*BUB1B*)

BUB1B, também chamado de *BUB1R*, é um gene que codifica uma quinase do checkpoint mitótico. *BUB1B* compõe o complexo de checkpoint mitótico juntamente com *BUB3*, *MAD2* e *CDC20*, e impede a progressão da mitose para a anáfase, bloqueando o complexo promotor da

anáfase enquanto não houver a correta ligação dos cinetócoros ao fuso mitótico⁵⁴⁻⁵⁶. O aumento da expressão de *BUB1B* foi correlacionado com a capacidade de invasão, ocorrência de metástase e com mau prognóstico em grupo de pacientes com câncer gástrico⁵⁷, ao mesmo tempo em que a expressão da proteína BUB1B também foi considerada como fator de prognóstico em adenocarcinomas da cabeça do pâncreas⁵⁸. Já a diminuição da expressão de *BUB1B* em camundongos reduziu a formação de novos tumores e diminuiu a ocorrência de metástase. Também foi observado em adenocarcinoma pulmonar que *BUB1B* estava hiperexpresso em pacientes em estágios avançados da doença. Quando comparado aos tecidos normais de pulmão, *BUB1B* estava mais expresso em 72% dos tumores, enquanto apenas 2,6% tinham mutações somáticas⁵⁹.

BUB1B foi considerado fator de prognóstico em tumores adrenocorticais humanos, pois a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* (quinase 1 induzida por PTEN), isto é, $\Delta\text{CtBUB1B} - \Delta\text{CtPINK1}$, mostrou-se bom marcador de sobrevida em pacientes com carcinoma adrenocortical. Pacientes com carcinoma que apresentavam a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* menor que o ponto de corte igual a 6.32, apresentavam pior prognóstico do que os pacientes com expressão acima desse ponto de corte. Com isso, através da análise combinada de *BUB1B* e *PINK1* foi sugerido um subgrupo mais agressivo dentre os carcinomas adrenocorticais^{60,61}.

PINK1 foi identificado em 2001⁶². Normalmente, *PINK1* é clivado na mitocôndria após ser importado através de uma enzima conhecida como translocase da membrana externa da mitocôndria (TOM), portanto, é esperado que os níveis de *PINK1* sejam baixos quando a célula está em condições normais, e se torne elevado quando a mitocôndria estiver disfuncional⁶³. Foi observado em linhagens de câncer de mama que a expressão de *PINK1* diminuiu a apoptose e o crescimento celular⁶⁴. Em

massas adrenocorticais, a expressão de *PINK1* está reduzida em carcinomas mais agressivos ⁶⁰.

Assim, devido à limitação existente para distinguir tumores adrenocorticais e a dificuldade em prever o prognóstico em pacientes com carcinomas, analisamos a expressão de alguns genes relacionados aos tumores adrenocorticais. Essa análise talvez possa responder nossa hipótese de que a expressão de *POD-1* pode ter valor diferencial no diagnóstico de massas adrenocorticais, e que a expressão combinada dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* possam ser determinantes no prognóstico de pacientes com carcinomas do córtex da suprarrenal.

2 Objetivos

Avaliar a expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* em fragmentos de tumores adrenocorticais humanos, adenomas e carcinomas, adultos e pediátricos, e relacionar os dados obtidos com os dados clínicos e de acompanhamento dos pacientes.

Validar a relação entre a expressão dos genes *POD-1* e *BUB1B* através da análise da expressão gênica em culturas de células de tumores adrenocorticais humanos que hiperexpressam *POD-1*.

3 Materiais e Métodos

3.1 As amostras de tumores adrenocorticais humanos

Foram analisadas 130 amostras de tumores adrenocorticais humanos: 79 adultos (44 ACAs e 35 ACCs), 35 crianças com menos de 5 anos de idade (27 ACAs e 8 ACCs) e 16 crianças de 5 a 18 anos de idade (6 ACAs e 10 ACCs). Dentre as amostras analisadas, 108 foram cedidas pelo Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM-42), Departamento de Clínica Médica da FMUSP. Todas as amostras foram obtidas de fragmentos de tumores adrenocorticais recolhidos pelo laboratório acima citado, sendo que 22 dessas amostras foram enviadas diretamente para nosso laboratório para obtenção de culturas de células desses tumores. Por este motivo, os fragmentos foram transportados em meio de cultura, em gelo, e antes do processamento da cultura um pequeno fragmento foi armazenado, em meio de congelamento e em nitrogênio líquido até o momento da extração. Também foram analisadas 30 amostras obtidas de material pediátrico, sendo 22 amostras de tumores adrenocorticais e 8 amostras de tecido adrenal normal, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Sonir Roberto Rauber Antonini, do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os pacientes foram diagnosticados com tumores adrenocorticais entre os anos de 1981 a 2014, com tempo médio de acompanhamento de 55 meses nos pacientes adultos, 90.5 meses nos pacientes pediátricos com menos de 5 anos e 52.3 meses nos pacientes pediátricos com mais de 5 anos (Tabela 1).

Para os pacientes pediátricos com menos de 5 anos de idade os critérios de Weiss não são adequados, como citado anteriormente, pois os tumores podem apresentar características anatomopatológicas de tumores malignos, mas ao longo do período de acompanhamento do paciente

apresenta boa evolução de forma que o tumor acaba sendo classificado como clinicamente benigno, como pode ser observado na Tabela 1. Portanto, a classificação dos grupos em pediátricos em ACA ou ACC, foi baseada considerando o diagnóstico final de cada paciente e não os critérios de Weiss como o utilizado para a classificação dos tumores adultos.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes

Adultos		n=79	
	Características	Total	%
	Média de idade (Anos)	41,3	-
	Variação	18-83	-
	Sexo		
	Feminino	60	76%
	Masculino	19	24%
	Diagnóstico		
	ACA	44	56%
	ACC	35	44%
	Score de Weiss		
	≤ 3	51	62%
	> 3	28	35%
	Metástase*		
	Sim	16	20/%
	Não	46	58%
	Morte relacionada ao tumor*	12	15%
	Média de acompanhamento (meses)	55,3	-
Pediátricos com menos de 5 anos		n=35	
	Média de idade (Anos)	1,98	-
	Variação	0,43-3,83	-
	Sexo		
	Feminino	23	66%
	Masculino	12	34%
	Diagnóstico		
	ACA	27	77%
	ACC	8	23%
	Score de Weiss**		
	≤ 3	9	26%
	> 3	25	71%
	Metástase**		
	Sim	7	20%
	Não	27	77%
	Morte relacionada ao tumor	5	14%
	Média de acompanhamento (meses)	90,5	-
Pediátricos com mais de 5 anos		n=16	
	Média de idade (Anos)	11,84	-
	Variação	5,04-17,7	-
	Sexo		
	Feminino	12	75%
	Masculino	4	25%
	Diagnóstico		
	ACA	6	37,5%
	ACC	10	62,5%
	Score de Weiss		
	≤ 3	5	31%
	> 3	11	69%
	Metástase		
	Sim	7	44%
	Não	9	50%
	Morte relacionada ao tumor***	7	44%
	Média de acompanhamento (meses)	52,3	-

*17 dados não obtidos; **2 dados não obtidos; ***2 dados não obtidos.

A presença de mutação em *TP53* foi analisada em 94.3% (33 de 35) dos pacientes pediátricos com menos de 5 anos e em 68.7% (11 de 16) dos pacientes pediátricos com mais de 5 anos de idade. O diagnóstico de metástase foi realizado através de exames de imagens e tomografia computadorizada. Se necessário, foi realizado exame de ressonância magnética, cintilografia óssea e/ou tomografia computadorizada por emissão de pósitrons ⁶¹. Os dados clínicos dos pacientes foram obtidos através do departamento responsável por ceder as amostras para análise. Assim como, a cirurgia, a análise anatomopatológica e o acompanhamento de cada paciente são de responsabilidade do médico e patologista responsável pelo caso.

3.2 Culturas de células adrenocorticais humanas e a transfecção com pCMVMyc-Pod-1

Foi utilizada a linhagem de células de carcinoma adrenocortical humano NCI-H295R ⁶⁵, obtida pela ATCC (The ATCC Cell Biology Collection) e mantida em cultura com meio RPMI (Gibco), com 2% de soro fetal bovino (Gibco) e 1% ITS Insulin-Transferrin-Selenium (Gibco). Também foi utilizada a cultura secundária ACC-T36, da 25^a a 29^a passagem, que foi obtida de um fragmento de tumor de uma mulher de 38 anos com carcinoma adrenocortical no nosso laboratório, como descrito em trabalho anterior ³⁷. A ACC-T36 foi mantida em cultura com meio DMEM (Gibco) e 10% de soro fetal bovino (Gibco). Ambas as culturas foram mantidas a 37 °C com 95% ar e 5% CO₂.

As culturas utilizadas foram autenticadas, em diferentes passagens, pelo *STR-DNA profile*, para excluir a possibilidade de contaminação cruzada e garantir a fiabilidade dos experimentos. Através de uma análise

simultânea de 15 loci STR (*short tandem repeat*) e do gene amelogenina (para identificação do gênero), o método de DNA *fingerprint* verifica a identidade de cada cultura. A análise é feita por uma reação “multiplex” de PCR utilizando o kit AmpFLSTR® Identifiler® PCR Amplification (Life Technologies Corporation, Foster City, CA, USA) e os amplicons são separados por eletroforese capilar e analisados usando um Gene Mapper software da Life Technology. Esse tipo de autenticação é recomendado pela ATCC para certificação da origem da cultura de células. A análise por DNA *fingerprint* foi realizada pela Dra. Cintia Fridman, no Departamento de Medicina Legal (FMUSP).

3.3 Plasmídeos e amplificação

Para testar a eficiência de transfecção nas culturas, foi usado o vetor pmaxGFP (Amara Biosystems) com resistência à Kanamicina, para expressão da proteína fluorescente GFP. Para expressão de POD-1 foi utilizado o plasmídeo pCMVMycPOD-1, com resistência à ampicilina, gentilmente cedido pelo Dr. Masataka Nakamura (Tokyo Medical University, Japan). O vetor vazio pCMVMyc foi obtido no nosso laboratório a partir da clivagem do plasmídeo pCMVMycPOD-1. As bactérias foram transformadas por choque térmico e para amplificação dos plasmídeos foi utilizada 200 µl da bactéria competente *E. coli* (DH5α) e 2 µg de DNA plasmidial. O inóculo de bactérias foi adicionado em uma placa p100 com LB ágar e com 50 ng/µl antibiótico (kanamicina ou ampicilina) para seleção. A colônia selecionada cresceu em cultura de 12 h a 24 h sob agitação constante. Os plasmídeos foram extraídos com o Kit Spin Mini-prep (Qiagen) e quantificados por espectrometria. Para confirmar se a extração foi realizada corretamente, a integridade e tamanho do DNA

plasmidial foram analisados em gel de agarose 0,8%. As alíquotas de bactérias competentes foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Luís Carlos de Souza Ferreira do Laboratório de Desenvolvimento de Vacinas do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas-USP.

3.4 Transfecção transiente da linhagem NCI-H295R e da cultura ACC-T36

Inicialmente, as culturas NCI-H295R e ACC-T36 foram transfectadas com o vetor pmaxGFP, contendo a proteína GFP, para estabelecer a proporção adequada entre o reagente Turbofect (Thermo Fisher Scientific) e o DNA plasmidial utilizados para formar o complexo de transfecção. Primeiramente, as células foram plaqueadas em diferentes concentrações em placas 35 mm, a fim de verificar qual seria a quantidade ideal de células para atingir confluência de 70%-90% no momento da transfecção. A partir deste teste, foram selecionadas três confluências adequadas (0.9×10^6 , 1×10^6 e 1.1×10^6) para então avaliar qual a proporção do reagente Turbofect e de DNA plasmidial deveriam ser utilizados e em quanto tempo as células estariam transfectadas. Para isso, foi utilizado o vetor pmaxGFP e um microscópio invertido com fluorescência para examinar a expressão da proteína GFP. Após testar diferentes combinações, o protocolo padronizado foi de 1.1×10^6 células plaqueadas em placa de 35 mm e, 24 horas após o plaqueamento, transfectadas com o complexo formado por 4 ug de DNA plasmidial em combinação com 12 ul do reagente Turbofect durante 5 horas, quando o meio de cultura foi trocado. Após 24 horas de transfecção, para a linhagem NCI-H295R, e 48 horas para a cultura ACC-T36, o RNA total era extraído com Trizol (Invitrogen).

3.5 Extração de RNA e síntese de cDNA

O RNA total foi extraído de fragmentos de tumores que estavam armazenados em nitrogênio líquido e de culturas de células, através da utilização do protocolo de Trizol (Invitrogen), e com o auxílio de um homogeneizador automático (Biospec products, modelo 985370) ou um *scraper*. A integridade do RNA foi avaliada através de eletroforese com gel de agarose (2%). A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas por espectrometria em NanoDrop 2000c. Para as amostras serem consideradas adequadas para análise, as mesmas precisavam apresentar a razão 260/280 nm de aproximadamente 2.0, e a razão 260/230 nm de 1.8-2.2, conforme descrito no manual do equipamento. O cDNA foi sintetizado com o kit “SuperScript III First-Strand Synthesis Supermix” (Invitrogen), utilizando no máximo 4 ug de RNA para obtenção de cDNA com concentração final de 25 ng/ul.

3.6 PCR em tempo real

O PCR quantitativo em tempo real (qPCR) foi realizado em um sequenciador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems) através de um ensaio de detecção TaqMan (Applied Biosystems). Os valores de “cycle threshold (Ct)” foram selecionados em triplicata para cada amostra, e normalizados por dois genes de controle endógeno: β -glicuronidase humana, GUSB (ID Hs00939627_m1) e β -actina, ACTB (ID Hs99999903_m1). Foram utilizados ensaios Taqman para os genes alvos POD-1 (ID Hs00162646_m1), SF1 (ID Hs00610436_m1), BUB1B (ID Hs01084828_m1) e PINK1 (ID Hs00260868_m1). O calibrador utilizado para as reações com amostras de tumores de adultos foi um pool de adrenal normal comercial (BioChain) e para as reações com amostras dos dois

grupos de tumores pediátricos foi utilizada a média da expressão de oito amostras de tecido pediátrico de adrenais normais, com idade máxima de 5 anos. Para cada reação foi usado 10 ul de master mix Taqman (Applied Biosystems), 1 ul de ensaio Taqman (Applied Biosystems), 2 ul de cDNA (25 ng/ul) e 7 de DEPC, totalizando 20 ul por reação.

3.7 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas levando em consideração os resultados obtidos da expressão relativa do gene e a expressão combinada de dois genes. A expressão relativa de cada gene foi calculada através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ⁶⁶, que utiliza a média da expressão de dois genes endógenos (ACTB e GUSB) controles e um pool de adrenal normal como calibrador. A expressão combinada é dada pelo cálculo da fórmula (ΔCt gene alvo 1 - ΔCt gene alvo 2), conforme publicado por de Reynies em 2009⁶⁰. O ΔCt de cada gene representa a variação entre Ct alvo e Ct endógeno, sendo que esse dado é obtido pela planilha de resultados exportada do sequenciador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os resultados foram considerados significantes se $p < 0.05$. Para avaliar a diferença de expressão entre os genes estudados foi utilizado o teste Mann-Whitney, que é um teste não-paramétrico semelhante ao teste T-Student, e para avaliar a diferença de expressão dos genes entre os três grupos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (não-paramétrico). Para analisar as correlações entre os genes foi usado o coeficiente de correlação de Pearson. Todos os testes foram realizados pelo programa GraphPad Prism 6.

O teste Curva de ROC (Curvas de Características de Operação do Receptor- *Receiver Operating Characteristic*) foi realizado para analisar a expressão combinada de dois genes. Essa é uma forma eficiente de demonstrar a relação normalmente antagônica entre a sensibilidade e a

especificidade de resultados. Com esse teste é possível especificar problemas no desempenho de resultados, pois ele permite estudar a variação da sensibilidade e especificidade para diferentes valores de corte. Portanto, é possível classificar através da expressão combinada de dois genes, quais pacientes teriam ou não melhor prognóstico. Depois que o ponto de corte foi determinado, ele é usado para executar o teste de Log-rank e uma curva de sobrevivência, onde os grupos de pacientes com carcinomas adultos foram separados a partir do ponto de corte, a fim de verificar se há diferença significativa entre a probabilidade de sobrevida destes dois grupos. A Curva de ROC e o teste de Log-rank também foram realizados pelo programa GraphPad Prism 6.

Os testes não-paramétricos foram escolhidos porque, apesar do corte amostral ser grande, os grupos analisados possuem distribuições assimétricas, que tornam os testes paramétricos menos adequados. Esta decisão foi tomada com o auxílio da Sra. Rosana Duarte Prisco, responsável pela assistência estatística do ICB-USP.

4 Resultados

4.1 Expressão relativa dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1*

A análise das amostras de tumores adultos mostrou que a expressão relativa do gene *POD-1* foi significativamente ($p=0.0003$) maior em adenomas (ACA) do que nos carcinomas (ACC). Por outro lado, a expressão relativa do gene *BUB1B* foi menor ($p<0.0001$) nos adenomas do que nos carcinomas (Fig. 1A e 1B). A expressão relativa dos genes *PINK1* e *SF1* (Fig. 1C e 1D) foi similar nos dois grupos de tumores estudados ($p=0.1797$ e $p=0.9313$, respectivamente). A análise das amostras de tumores pediátricos não mostrou diferenças de expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* entre os adenomas e carcinomas assim classificados por sua evolução clínica.

Figura 1 - Expressão relativa dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1* e *SF1* em adenomas (ACA) e carcinomas adrenocorticais (ACC) de adultos. A) expressão relativa de *POD-1* ($p= 0.0003$); B) expressão relativa de *BUB1B* ($p<0.0001$); C) expressão relativa de *PINK1* ($p=0.1797$); D) expressão relativa de *SF1* ($p=0.9313$). Teste de Mann-Whitney em escala logarítmica com base 2. ACA adulto $n=42-44$ e ACC adulto $n=34-35$.

Quando comparamos a expressão relativa de *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* entre os adenomas e carcinomas de adultos e os grupos pediátricos observamos que a expressão relativa de *POD-1* e *BUB1B* são estatisticamente diferentes ($p= 0.0025$ e $p<0.0001$, respectivamente) entre

adenomas adultos e pediátricos menores que 5 anos (Fig. 2A e 2B). Isto é, a expressão de *POD-1* é menor nos pacientes pediátricos menores de 5 anos do que nos adultos, enquanto que a expressão de *BUB1B* é maior nos pacientes pediátricos menores de 5 anos do que nos adultos com ACA. Para ambos os genes a expressão de *POD-1* e *BUB1B* foi similar entre os tumores de adultos e pediátricos maiores que 5 anos. Com relação a expressão relativa de *PINK1* em pacientes com adenomas, não houve diferenças significativas entre pacientes adultos e pediátricos. Assim como, em relação aos carcinomas, não houve diferenças significativas entre a expressão dos genes entre adultos e pediátricos (resultados apresentados no Anexo A).

Figura 2 - Expressão relativa dos genes *POD-1* e *BUB1B* entre em adenomas (ACA) adultos e pediátricos. A) expressão relativa de *POD-1* ($p= 0.0025$); B) expressão relativa de *BUB1B* ($p<0.0001$). Teste de Kruskal-Wallis em escala logarítmica com base 2. ACA adulto, $n=42-44$, ACA pediátricos > 5 anos $n= 6$ e pediátricas < 5 anos com ACA, $n= 26-27$.

4.2 Análise da correlação entre a expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1*, *SF-1* e *IGFR1* em tumores de adultos

Em adenomas adultos, a expressão relativa de *POD-1* e *BUB1B* (Fig. 3A) apresentou uma correlação positiva significativa, mas fraca ($p=0.0154$; $r=0.37$), o que contrasta com os resultados obtidos da expressão relativa desses genes, onde observamos expressão inversamente proporcional entre *POD-1* e *BUB1B*, quando comparamos adenomas e carcinomas adultos. Quando a expressão de *POD-1* e *BUB1B* foram correlacionadas com a expressão de *SF-1* (Fig. 3B e 3C), a relação foi estatisticamente significativa em ambos os casos (respectivamente, $p=0.012$; $p=0.0041$), mas também fraca (respectivamente, $r=0.38$; $r=0.43$).

Diferentemente, a correlação entre a expressão de *PINK1* e *IGF1R* (Fig. 4) foi positiva e forte em adenomas de adultos ($r=0.78$; $p=0.0018$), enquanto que para os carcinomas a relação entre *PINK1* e *IGF1R* foi igualmente significativa, mas negativa ($r=-0.61$; $p=0.0479$).

Figura 3 - Análise das correlações entre as expressões dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *SF-1* em adenomas adultos. A) entre *POD-1* e *BUB1B*; B) entre *SF1* e *POD-1*; C) *SF1* e *BUB1B*. Foi realizado o teste de correlação de Pearson e escala logarítmica em base 2. ACA, n=44.

Figura 4 - Análise das correlações entre as expressões dos genes *PINK1* e *IGF1R* em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) adultos. A) *PINK1* e *IGF1R* de ACA e B) *PINK1* e *IGF1R* de ACC. Foi realizado o teste de correlação de Pearson e escala logarítmica em base 2. ACA n= 13 ; ACC n=11.

As demais correlações entre os genes estudados em ACA e ACC adulto não apresentaram significância estatística e esses resultados podem ser observados no Anexo A.

4.3 Análise da correlação entre a expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1*, *SF-1* e *IGFR1* das amostras pediátricas

Nas amostras de adenomas de pacientes pediátricos com mais de 5 anos a expressão dos genes *POD-1* e *IGF1R* (Fig. 5A) se correlaciona positivamente ($p = 0.0272$) e com alto coeficiente de correlação ($r = 0.99$), apesar do pequeno número de amostras ($n = 3$). Ainda nessa faixa etária a análise das amostras de carcinoma apresentou uma correlação significativa e positiva ($r = 0.86$; $p = 0.0031$) entre os genes *BUB1B* e *SF-1* (Fig. 5B). Na faixa etária pediátrica com menos de 5 anos as amostras de adenomas (Fig. 5C) mostraram uma correlação negativa entre a expressão de *PINK1* e *IGF1R* ($r = -0.71$; $p = 0.0213$). As demais correlações analisadas em

amostras pediátricas não foram estatisticamente significantes e estão apresentadas no anexo A.

Figura 5 - Análise das correlações entre as expressões dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1*, *SF-1* e *IGF1R* em adenomas e carcinomas pediátricos. A) *POD-1* e *IGF1R* de adenomas (ACA) pediátricos > 5 anos e B) *BUB1B* e *SF-1* de carcinomas (ACC) pediátricos > 5 anos. C) *PINK1* e *IGF1R* de ACA pediátrico < 5 anos. Foi realizado o teste de correlação de Pearson e escala logarítmica em base 2. Pediátricos > 5 anos ACA, n=3; ACC, n= 9; pediátricos < 5 anos, ACA, n=10.

4.4 Expressão combinada dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* como fator de prognóstico em pacientes adultos

A análise da expressão combinada da expressão dos genes *BUB1B* e *PINK1* ($\Delta\text{Ct } BUB1B - \Delta\text{Ct } PINK1$) nas amostras de pacientes adultos mostrou uma diferença significativa ($p < 0.0001$) entre adenomas e carcinomas. A mediana do valor de *BUB1B-PINK1* foi de 2.45 para ACAs adultos, e de -0.43 para ACCs adultos. Com a finalidade de obter um ponto de corte para ser utilizado como prognóstico em pacientes com carcinoma adrenocortical, a expressão combinada dos genes foi analisada pelo teste Curva de ROC. O ponto de corte determinado para a expressão combinada de *BUB1B-PINK1* em pacientes com ACC foi menor que 0.243 (< 0.243), e a área da curva (AUC), que é um resumo estatístico para a determinação da acurácia do teste, foi 0.81 ($p < 0.0001$). Portanto, se utilizarmos o ponto de corte estabelecido de < 0.243 , significa que 81% dos pacientes com ACC teriam um pior prognóstico, que quer dizer morte relacionada ao tumor, e seriam, portanto, identificados corretamente como tal. Dessa forma, com a utilização desse ponto de corte foi possível separar os pacientes com carcinoma adulto em dois subgrupos (Fig. 6A). O primeiro, denominado ACC-1, no qual 67% (12 de 18 pacientes) faleceram durante o período de acompanhamento, e o segundo, denominado ACC-2, no qual nenhum dos 12 pacientes faleceu durante o período de acompanhamento ($p = 0.0002$). A média de sobrevida do subgrupo ACC-1 foi de 22 meses. Portanto, o grupo ACC-1 corresponde aos pacientes com pior prognóstico, com uma expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* menor que 0.243, enquanto o grupo ACC-2 corresponde aos pacientes com prognóstico melhor, e a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* maior que 0.243.

A análise da expressão combinada de *POD-1* e *BUB1B* ($\Delta\text{Ct } POD-1 - \Delta\text{Ct } BUB1B$) é também estatisticamente diferente entre adenomas e

carcinomas adultos ($p < 0.0001$), com uma mediana do valor de *POD-1-BUB1B* foi de -3.28 em ACAs e de 1.7 em ACCs (Fig. 6B). O ponto de corte da expressão combinada de *POD-1-BUB1B* foi > 0.191 , e com $AUC=0.83$ ($p < 0.0001$). Através da utilização do ponto de corte estabelecido foi possível separar dois grupos, o ACC-1, no qual 57% (12 de 21 pacientes) faleceram durante o período de acompanhamento, e o segundo, ACC-2, no qual nove pacientes sobreviveram durante o período ($p=0.0084$). A média de sobrevida do subgrupo ACC-1 foi de 34 meses. O subgrupo ACC-1 corresponde aos pacientes com ACC com pior prognóstico e expressão combinada de *POD-1* e *BUB1B* maior que 0.191, e o grupo ACC-2 que corresponde aos pacientes com ACC com prognóstico melhor, e que tiveram expressão combinada de *POD-1* e *BUB1B* menor que 0.191.

A expressão combinada de *POD-1* e *PINK1* também foi diferente entre adenomas e carcinomas adultos ($p= 0.0229$), com mediana de -0.65 em ACAs e de 1.36 em ACCs. Apesar de ter sido possível determinar um ponto de corte através do teste Curva de ROC, que foi > 1.17 (Área sob a curva: 0.67 $p= 0,023$), ao aplicarmos este ponto de corte em uma curva de sobrevida, o valor de *POD-1-PINK1* não foi eficiente para identificar os ACCs com pior prognóstico ($p= 0.2173$).

De uma forma geral, foi observado que a expressão relativa de *BUB1B* é maior nos pacientes com carcinomas mais agressivos. Enquanto a expressão relativa de *POD-1* e *PINK1* é similar entre os pacientes com ACC adulto.

Figura 6 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor em pacientes com carcinoma adulto. A) Curva de sobrevida usando o valor de prognóstico BUB1B-PINK1; n= 30 B) Curva de sobrevida usando o valor de prognóstico POD1-BUB1B; n=30.

4.5 Expressão combinada dos genes *POD-1*, *SF-1*, *BUB1B* e *PINK1* como fator de diagnóstico em pacientes pediátricos

A análise da expressão combinada dos genes *POD-1*, *SF-1*, *BUB1B* e *PINK1* nos ACAs e ACCs pediátricos maiores de 5 anos mostrou valores semelhantes entre esses dois tipos de tumores. No entanto, para os tumores pediátricos de pacientes com menos de 5 anos a expressão combinada de *POD-1* e *SF-1* ($\Delta\text{Ct POD-1} - \Delta\text{Ct SF1}$) apresentou mediana de 3.78 nos adenomas e de 0.94 nos carcinomas ($p=0.0078$). Com o objetivo de obter um ponto de corte para ser utilizado como fator de diagnóstico em pacientes pediátricos desse grupo, a expressão combinada dos genes foi analisada pelo teste Curva de ROC. O ponto de corte da expressão combinada de *POD-1*-*SF1* foi menor que 1.516 ($\text{AUC}=0.81$, $p=0.0096$). Com esse ponto de corte foi possível separar os pacientes em dois subgrupos (Fig. 7A), o grupo Ped-1, no qual 4% (1 de 26) pacientes tiveram morte relacionada ao tumor, e o grupo Ped-2, no qual 44% (4 de 9) pacientes faleceram durante o período de acompanhamento ($p=0.0014$). No grupo Ped-2, 67% (6 de 9) pacientes tiveram metástase, enquanto no grupo Ped-1, 4% (1 de 25) pacientes tiveram metástase ($p=0.0004$). Portanto, o grupo Ped-2, com valor de $\Delta\text{Ct POD-1} - \Delta\text{Ct SF-1}$ menor que o ponto de corte, teve pior prognóstico quando comparado ao grupo Ped-1. Nesse mesmo grupo de pacientes com menos de 5 anos, a análise da expressão combinada de *POD-1* e *PINK1* ($\Delta\text{Ct POD-1} - \Delta\text{Ct PINK1}$) apresentou diferença de expressão entre adenomas e carcinomas ($p=0.0292$). Através do teste Curva de ROC o ponto de corte determinado para esse valor foi de <0.648 ($\text{AUC}=0.76$; $p=0.031$). Assim, as amostras foram separadas no grupo Ped-1 (Fig. 7B), no qual 5% (1 de 22) pacientes tiveram morte relacionada ao tumor durante o período de acompanhamento, e o grupo

Ped-2, no qual 31% (4 de 13) faleceram durante o período de acompanhamento ($p= 0.0224$). No grupo Ped-1 5% (1 de 21) pacientes tiveram metástase enquanto no grupo Ped-2 foram 46% (6 de 13) dos pacientes ($p= 0.007$). Portanto, o grupo Ped-2 teve pior prognóstico quando comparado ao grupo Ped-1, que expressa valores maiores que o ponto de corte determinado.

Figura 7 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor a partir da em pacientes pediátricos < 5 anos. A) Curva de sobrevida usando o valor de diagnóstico; n= 35 B) Curva de sobrevida usando o valor de diagnóstico POD1-PINK1; n=35.

4.6 Sobrevida geral em pacientes com tumores adrenocorticais

Foi analisada a sobrevida dos pacientes adultos e pediátricos, independentemente da expressão relativa ou combinada dos genes estudados. A análise das amostras de tumores pediátricos utilizando os critérios de Weiss mostra que a média dos critérios atribuídos a esses pacientes é similar nos dois grupos, isto é, para os pacientes pediátricos com mais de 5 anos a média obtida foi de 4.794 ± 0.39 critérios, e para os pacientes pediátricos menos de 5 anos a média é de 5 ± 0.68 critérios. No entanto, os pacientes com mais de 5 anos têm pior sobrevida do que os pacientes pediátricos mais jovens (Fig 8A), com média de sobrevida de 23 meses ($p= 0.0052$).

Quando comparamos a sobrevida dos pacientes pediátricos com os pacientes adultos diagnosticados com carcinoma, a sobrevida dos pacientes pediátricos com mais de 5 anos é similar à sobrevida dos pacientes adultos com carcinoma, enquanto que a sobrevida dos pacientes com menos de 5 anos (Fig. 8B) é a maior entre os três grupos ($p= 0.0099$).

Figura 8 - Probabilidade de sobrevivência de morte relacionada ao tumor em pacientes com ACT. A) Curva de sobrevivência com pacientes pediátricos B) Curva de sobrevivência com pacientes adultos com ACC e pediátricos. Foi realizado o teste de Log-rank. Pediatrícos < 5 anos, n=35; Pediatrícos > 5 anos, n= 13 e Adultos, n= 30.

4.7 Teste de eficiência de transfecção em cultura de células de tumores adrenocorticais humanos

Após 24 h, as células da linhagem NCI-H295R passaram a expressar a proteína GFP com uma eficiência de $71.4 \pm 2.8\%$ (Fig. 9A) e para as células da cultura ACC-T36 a eficiência foi de $58.2 \pm 2.0\%$ (Fig 9B).

Figura 9 - Fotomicrografia representativa, de contraste de fase e de fluorescência para GFP, das células A) da linhagem NCI-H295R; B) da cultura secundária ACC-T36. Aumento de 100X.

4.8 Validação da relação entre os genes estudados através da hiperexpressão de *POD-1* em cultura de células de tumores adrenocorticais humanos

Após a transfecção com o plasmídeo contendo o gene *POD-1*, as células NCI-H295R (Fig. 10A) apresentaram um aumento da expressão de *POD-1* de 49192.8 ± 17157.0 ($p=0.003$), enquanto as células ACC-T36 (Fig. 11A) de 37119.6 ± 40883.1 ($p=0.076$), em relação ao controle, isto é, o vetor vazio. Independente do tipo celular utilizado e do aumento da expressão de *POD-1* obtida, não houve alteração da expressão de gene *BUB1B* (Fig. 10B e 11B), o que sugere que provavelmente não há relação funcional entre a baixa expressão de *POD-1* e a elevada expressão de *BUB1B* nos carcinomas adrenocorticais de adultos, como anteriormente detectado.

Figura 10 - Análise da expressão relativa de A) *POD-1* e de B) *BUB1B* em células da linhagem de tumor adrenocortical humano NCI-H295R transfectadas com o vetor pCMVMycPOD-1 (Vetor POD-1) ou o vetor pCMVMyc (Vetor vazio) por RT-PCR. Teste t pareado, n=5.

Figura 11 - Análise da expressão relativa de A) *POD-1* e de B) *BUB1B* em células da cultura secundária ACC-T36 transfectadas com o vetor pCMVMyc*POD-1* (Vetor *POD-1*) ou o vetor pCMVMyc (Vetor vazio) por RT-PCR. Teste t pareado, n=6.

5 Discussão

Por ensaio de microarray foi detectado que *POD-1* está mais expresso em adenomas do que em carcinomas adultos ^{37,53}. Através da análise por PCR quantitativo corroboramos esses resultados, isto é, *POD-1* está diferencialmente expresso em ACAs e ACCs adultos, mas em tumores pediátricos essa diferença de expressão entre adenomas e carcinomas pediátricos não foi observada. Ainda não sabemos a importância da expressão diferencial de *POD-1* nos tumores adrenocorticais, no entanto, estudos anteriores do nosso grupo mostraram que, em cultura de células de tumores adrenocorticais, *POD-1* é capaz de se ligar diretamente na região promotora de *SF-1*, inibindo assim a expressão endógena de *SF-1* e, por consequência, a expressão da proteína transportadora de colesterol *StAR*, mas não foi capaz de alterar a capacidade proliferativa das células³⁷. Em outro trabalho, observamos que *POD-1* se liga a duas regiões do promotor do gene que codifica para a proteína *Small Heterodimer Partner* (*SHP*), que regula negativamente o fator de transcrição *Liver Receptor Homolog 1* (*LRH-1*), que é um fator homólogo a *SF-1* ⁴⁷, e é capaz de ativar as enzimas *HSD3B2*, *CYP19A1* e a proteína *StAR* ⁶⁷. Além disso, em amostras de tumores adrenocorticais, *POD-1* foi correlacionado negativamente com genes relacionados ao controle do ciclo celular ³⁷. Assim, esses dados sugerem que *POD-1* pode ser um importante fator de transcrição em tumores adrenocorticais e em outros tipos de tumores.

Em carcinomas gástrico e renal a maior expressão de *POD-1* foi considerada um fator positivo de sobrevida ^{68,69}, enquanto em tumores de mama a baixa expressão de *POD-1* foi relacionada com a progressão desse tipo de tumor. Além disso, a hiperexpressão de *POD-1* em cultura de células de tumor de mama diminuiu a proliferação celular⁷⁰. Em câncer colorretal, a expressão de *POD-1* foi relacionada com diminuição da proliferação celular, invasão e migração, e aumento de apoptose ⁷¹.

Portanto, a expressão de *POD-1* pode estar relacionada com um melhor prognóstico em vários tipos de tumores.

Os resultados da expressão de *POD-1* nas amostras de carcinomas de pacientes adultos e nas amostras de carcinomas de pacientes pediátricos com menos ou com mais de 5 anos, mostrou que não há diferença de expressão entre esses grupos. No entanto, *POD-1* está menos expresso nos adenomas de pacientes pediátricos com menos de 5 do que nos adenomas de pacientes adultos, mas não em pacientes pediátricos com mais de 5 anos com esse mesmo diagnóstico. Esses resultados sugerem que os adenomas pediátricos de pacientes com menos de 5 anos são, em relação à expressão de *POD-1*, semelhantes aos pacientes adultos com carcinoma, isto é, com uma expressão menor de *POD-1* quando comparado aos adenomas adultos. Dados anteriores¹⁷, e nossos, relativos aos tumores pediátricos com menos de 5 anos, mostram que esses pacientes podem apresentar características anatomopatológicas de pior prognóstico, isto é, mais de três critérios de Weiss, mas que clinicamente revelam-se como tumores benignos.

Em contraste com o observado para a expressão de *POD-1*, a expressão relativa de *BUB1B* foi menor nos adenomas do que nos carcinomas adultos. Em estudo anterior que utilizou a plataforma KEGG, que reúne conjuntos de dados moleculares para relacioná-los às funções biológicas das células e de sistemas biológicos, foi indicada uma possível correlação negativa entre *POD-1* e *BUB1B*, com uma significância de $p < 0.01$ ³⁷. Foram testadas 232 vias KEGG, e 380 genes analisados no ensaio de microarray se correlacionaram negativamente com o gene *POD-1*. Dentre esses genes, 123 genes eram de ciclo celular, 80 eram de mecanismos de controle de mRNA e 26 eram relacionados à biossíntese de componentes de matriz extracelular. Dos 123 genes relacionados ao controle ciclo celular, 9 se correlacionaram negativamente com *POD-1*, dentre eles *BUB1B*³⁷.

Dados da literatura mostram que em pacientes com câncer gástrico o aumento da expressão de *BUB1B* está relacionado com a capacidade de invasão e ocorrência de metástase ⁵⁷, enquanto que em carcinomas ductais da mama ⁷², o aumento da expressão de *BUB1B* foi correlacionado com a instabilidade genômica desses tumores. A elevada expressão de *BUB1B* também foi relacionada com pior prognóstico de pacientes com câncer gástrico, pulmonar e de pâncreas ^{58,59,73}. Nos carcinomas adrenocorticais o aumento da expressão de *BUB1B* parece estar relacionado com o aumento do índice mitótico, que é um dos parâmetros, juntamente com as mitoses atípicas, considerados no escore de Weiss para o diagnóstico dos tumores do córtex adrenal ¹⁴.

Quando comparamos a expressão relativa de *BUB1B* entre os três grupos, novamente não houve diferença entre os carcinomas, mas a expressão de *BUB1B* apresentou diferença entre as amostras de adenomas adultos e pediátricos. *BUB1B* está mais expresso em pacientes pediátricos com menos de 5 anos do que em ACA adultos. Portanto, o perfil de expressão de *BUB1B* em adenomas pediátricos com menos de 5 anos se assemelha ao de carcinomas adultos, tal como ocorreu com a expressão de *POD-1*.

Como apresentado, *BUB1B* foi correlacionado negativamente com a expressão de *POD-1* em tumores adultos ³⁷. De fato, nossos resultados mostraram que a expressão de *BUB1B* é menor nas amostras de adenomas adultos do que nos carcinomas, enquanto a expressão de *POD-1* é maior nos ACAs do que nos ACCs adultos, o que sugere uma relação negativa entre *BUB1B* e *POD-1*. Porém, verificamos que, em adenomas adultos, *POD-1* está correlacionado positivamente com *BUB1B*, apesar do coeficiente de correlação ser fraco. No sentido de verificarmos experimentalmente a existência de uma relação causa-efeito entre a hiperexpressão de *POD-1* e a expressão de *BUB1B*, foram realizadas

transfecções transientes de *POD-1* em células de tumores adrenocorticais. Nossos resultados não confirmam o que foi observado nas amostras de tumores, portanto, não há evidências até o momento que indiquem uma relação entre esses dois fatores.

Dados da literatura demonstram que a expressão de *PINK1* é menor nos ACCs adultos mais agressivos⁶⁰. Entretanto, a expressão gênica e proteica de *PINK1* ainda não foi extensivamente analisada em massas adrenocorticais, sendo mais comumente estudada em doenças neurológicas como Doença de Parkinson e em tumores do cérebro⁷⁴⁻⁷⁶. Um trabalho recente mostrou que a perda do gene *PINK1* reduz a proliferação celular, a formação de colônias e capacidade de invasão em células embrionárias imortalizadas⁷⁷. No entanto, nossos resultados de expressão de *PINK1* não mostram valor diferencial entre adenomas e carcinomas, e nem diferencia os carcinomas mais agressivos dos menos agressivos, o que sugere que a expressão de *PINK1* não apresenta valor diferencial nos tumores adrenocorticais.

Nossos dados mostraram que, em tumores adrenocorticais adultos, a expressão relativa de *PINK1* e de *IGF1R*, que foram obtidos de estudos anteriores utilizando as mesmas amostras, está correlacionada positivamente em adenomas e negativamente com carcinomas adultos. Enquanto que em adenomas pediátricos com menos de 5 anos a expressão de *PINK1* e *IGF1R* também se correlacionam negativamente. Assim, novamente os adenomas pediátricos com menos de 5 anos apresentaram um perfil de expressão similar aos carcinomas adultos com relação a esses genes.

Como citado anteriormente, *PINK1* está envolvido na regulação do ciclo celular e, possivelmente, no desenvolvimento de tumores⁷⁷. Além disso, *PINK1* é fundamental para a manutenção da célula, pois é um regulador essencial de fissão, fusão e autofagia mitocondrial⁷⁸. *IGF1R* por

sua vez, já foi estudado em ACTs e é um dos poucos marcadores para tumores pediátricos, sendo considerado um marcador para prognóstico em pacientes dessa faixa etária por estar correlacionado com a ocorrência de metástases ²⁷. IGF1R é um dos receptores de IGF2, que é considerado marcador molecular em carcinomas adrenocorticais de adultos por estar hiperexpresso ⁷⁹.

A expressão relativa de *IGF1R* também foi correlacionada positivamente com a expressão de *POD-1* em adenomas pediátricos com mais de 5 anos de idade, embora não tenhamos evidências para compreender essa relação.

O fator esteroidogenico 1 (*SF-1*) é importante para o desenvolvimento do córtex adrenal, e parece estar relacionado com o desenvolvimento de tumores adrenocorticais ^{29,33}. Portanto, a expressão relativa de *SF-1* foi analisada em tumores pediátricos para verificar se haveria diferença entre adenomas e carcinomas de pacientes pediátricos com menos e mais de 5 anos. A expressão de *SF-1* foi similar entre tumores pediátricos, corroborando dados publicados que a expressão do gene *SF-1* não tem valor diferencial em tumores adrenocorticais ²⁸. Em um trabalho ²⁸ que analisou um aumento do número de cópias de *SF-1* em tumores adrenocorticais adultos e pediátricos foi detectado um aumento de, respectivamente, 10% (2 de 21) e 47% (8 de 17) das amostras analisadas. A análise da proteína *SF-1* mostrou um aumento de 19% (13 de 76) dos tumores adrenocorticais adultos e de 56% (20 de 36) dos pediátricos. Entretanto, como mostrado em nossos resultados, não houve diferença de expressão do gene *SF-1* entre adenomas e carcinomas adultos ou pediátricos. Além disso, a expressão de *SF-1* foi similar em tumores adrenocorticais funcionantes e não-funcionantes ²⁸. Em suporte a esses dados, o ensaio de microarray ²⁸ não mostrou diferenças da expressão de *SF-1* entre adenomas, carcinomas e adrenal normal. Portanto, esses

resultados sugerem que *SF-1*, pode sofrer modificações pós-transcricionais que levam à uma diferença entre a expressão do gene e da proteína SF-1, e assim a expressão do gene *SF-1* pode não ser um bom marcador molecular em tumores adrenocorticais adultos e pediátricos. Entretanto, ao analisar a correlação entre *SF-1* e os demais genes estudados nas nossas amostras, verificamos que *SF-1* está correlacionado positivamente com a expressão de *POD-1* e *BUB1B* em adenomas de adultos, porém ambas apresentaram coeficientes fracos, apesar de significativos. Em outros trabalhos, foi estudada a relação entre *SF-1* e *POD-1* em culturas de carcinoma adrenocortical e em ensaio de microarray, e foi demonstrado que *POD-1* está correlacionado negativamente com SF-1, apesar de a correlação em adenomas não ter sido comprovada ^{37,53}. Por sua vez, foi observada a correlação positiva entre a expressão de *BUB1B* e de *SF-1* em carcinomas de pacientes pediátricos com mais de 5 anos, além dos adenomas adultos. Ainda não há dados na literatura que relacionem a expressão ou função desses dois genes em tumores adrenocorticais, apesar do aumento da expressão de *SF-1* já ter sido relacionada com aumento da capacidade de proliferação ³³. Portanto, seria esperado que a expressão de *BUB1B* estivesse aumentada quando houvesse uma maior taxa de proliferação celular, uma vez que esse fator está presente no complexo do checkpoint mitótico e, em células normais, é fundamental para a progressão da mitose ⁵⁴⁻⁵⁶. Portanto, é necessário que outros estudos sejam realizados para confirmar se realmente há correlação positiva entre *SF-1* e *BUB1B*, e se um fator é dependente do outro.

A análise da expressão combinada de *POD-1* e *BUB1B* mostrou que sua utilização possui valor de prognóstico em pacientes com carcinomas adultos, com 83% de acurácia, sendo que a expressão de *BUB1B* foi maior nos carcinomas mais agressivos. O mesmo não ocorreu após a análise da expressão combinada de *POD-1* e *PINK1* em pacientes com ACCs adulto.

Como citado anteriormente, a expressão de *POD-1* foi considerada marcador de sobrevida em vários tipos de tumores ⁶⁸⁻⁷⁰, assim como a expressão de *BUB1B* ^{58,59,73}.

Em 2009, a expressão de *BUB1B* foi relacionada pela primeira vez com a expressão de *PINK1* como fator de prognóstico para carcinomas adrenocorticais de adulto ⁶⁰. Através da utilização de um ensaio de microarray, os tumores foram separados em dois grupos, levando em consideração a análise da expressão gênica e do prognóstico. O grupo com pior prognóstico foi dividido em dois subgrupos. A probabilidade de sobrevivência desses dois subgrupos foi analisada através da expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1*, cujo ponto de corte determinado foi < 6.32 em 35 pacientes com tumores adrenocorticais adultos. Portanto, este estudo definiu a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* como marcador de sobrevida em pacientes com carcinoma adrenocortical em adultos ⁶⁰. Em 2012, o marcador de sobrevida *BUB1B-PINK1* foi checado em tumores adrenocorticais de pacientes brasileiros, adultos e pediátricos, através da análise por qPCR ⁶¹. A análise da relação da expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* em 28 amostras de tumores adrenocorticais adultos foi confirmada como marcador de sobrevida em pacientes com carcinoma, mas com um ponto de corte diferente ≤ 3.14 e $AUC = 0.907$. No entanto, nas amostras de tumores pediátricos a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* não apresentou valor diferencial ⁶¹. Nossos resultados da análise da expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* nas amostras de carcinomas adultos corroboram os resultados da literatura, apesar da diferença do ponto de corte obtido para discernir entre carcinomas com pior ou melhor prognóstico. Uma explicação provável pode estar no número de amostras e nas diferenças de métodos de análise utilizados.

Devido ao fato dos pacientes pediátricos serem diagnosticados também pela evolução da doença, os tumores clinicamente malignos sempre possuem prognóstico pobre, com metástases e morte. Portanto, usamos o ponto de corte para tentar definir um grupo de pacientes que teriam morte relacionada ao tumor durante o período de acompanhamento e outro grupo que teria melhor sobrevida. Encontramos dois possíveis fatores de diagnóstico em pediátricos com menos de 5 anos. A expressão combinada de *POD-1* e *SF-1* está diferencialmente expressa entre pediátricos dessa faixa etária. Com o ponto de corte definido (< 1.516), conseguimos determinar, com 81% de acurácia, o subgrupo de pediátricos com menos de 5 anos com tumores mais agressivos. Neste grupo, 44% (4 de 9) pacientes faleceram e 67% tiveram metástase.

Com a análise da expressão combinada de *POD-1* e *PINK1*, foi definido o ponto de corte < 0.648 , com 76% de acurácia. Portanto, a expressão combinada de *POD-1* e *SF-1* demonstrou ser um melhor fator de diagnóstico, para pacientes pediátricos com menos de 5 anos, do que a expressão combinada de *POD-1* e *PINK1*, pois a acurácia do segundo teste foi menor.

Para os pacientes pediátricos com mais de 5 anos não foi possível determinar um fator de prognóstico a partir da análise das expressões combinadas.

Ao analisarmos a ocorrência de morte relacionada ao tumor em pacientes pediátricos, foi possível observar que os pacientes com mais de 5 anos tem pior sobrevida do que os pacientes com menos de 5 anos. Inclusive, a sobrevida dos pacientes pediátricos com mais de 5 anos é semelhante aos pacientes adultos com carcinoma. Esses dados demonstram a importância de separar os pacientes pediátricos por idade para futuros estudos moleculares e clínicos. Essas observações podem estar relacionadas ao fato do córtex adrenal manter seu desenvolvimento após o nascimento

até os primeiros anos de vida ^{80,81}. Há evidências que a zona fetal do córtex adrenal regride totalmente até o 1º ano de vida da criança, ou seja, crianças de até um ano possuem um tecido adrenocortical com células menos diferenciadas remanescentes. Nesta mesma fase, as três zonas concêntricas do córtex adrenal, zonas glomerulosa, fasciculada e reticular, começam a se diferenciar de maneira terminal, e só passam a ter características do tecido adulto por volta do 3º ano de idade, e continuam a se desenvolver até o 12º ano de vida ⁸⁰. Outro estudo observou que a zona reticular só se torna reconhecida como tal, em média, no 4º ano de vida ⁸¹. Assim, o córtex adrenal normal de crianças nos primeiros 4 anos de vida é histologicamente diferente de crianças acima desta idade. Tais dados coincidem com a incidência maior de tumores pediátricos em pacientes até 4 anos ^{10,18}, faixa etária pela qual o córtex adrenal ainda está em desenvolvimento e ainda pode conter células fetais menos diferenciadas ⁸⁰. Assim, considerando que as características de um córtex adrenal adulto possa surgir por volta do 3º ao 4º ano de vida, decidimos definir que os pacientes pediátricos mais jovens teriam até 5 anos, incluindo um ano a mais do que foi estabelecido na literatura. No entanto, os valores que foram aqui determinados como fatores de diagnóstico em pacientes pediátricos com menos de 5 anos, assim como os valores de prognóstico em adultos, precisam ser confirmados em um número maior de pacientes para comprovação da sua eficiência e aplicação futura na clínica.

6 Conclusões

Tumores adrenocorticais adultos:

- a avaliação da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* em amostras de adenomas e carcinomas, mostrou que *POD-1* e *BUB1B* estão diferencialmente expressos em ACA e ACC de adultos, apesar de a correlação entre esses dois genes não ter sido comprovada experimentalmente.

- a expressão de *PINK1* não mostrou diferença significativa entre ACAs e ACCs adultos. Por sua vez, a análise da expressão combinada dos genes *POD-1* e *BUB1B* sugere que essa combinação pode ter valor prognóstico em pacientes com carcinoma adulto.

- a expressão relativa de *PINK1* e a expressão relativa de *IGF1R* foram correlacionadas positivamente em adenomas adultos e negativamente em carcinomas adultos, porém a relação entre esses dois genes ainda é desconhecida.

Tumores adrenocorticais pediátricos: com mais de 5 anos:

- a análise da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1* e *SF-1* mostrou que estes genes têm expressões similares em adenomas e carcinomas.

- os pacientes pediátricos com mais de 5 anos apresentaram sobrevida pior do que os pediátricos com menos de 5 anos e semelhante aos pacientes com carcinomas adultos. Porém, não foi possível definir um fator de diagnóstico para essa faixa etária.

- a expressão de *POD-1* e *IGF1R* está correlacionada positivamente em adenomas, enquanto que a expressão relativa de *SF-1* e *BUB1B* está correlacionada positivamente em carcinomas. São necessários mais estudos

com pacientes pediátricos dessa faixa etária para confirmar a correlação desses fatores.

Tumores adrenocorticais pediátricos: com menos de 5 anos:

- a análise da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1* e *SF-1* mostrou que estes genes têm expressões similares em adenomas e carcinomas pediátricos.

- a análise da expressão combinada de *POD-1* e *SF-1* e de *POD-1* e *PINK1*, mostrou que esses fatores podem ter valor de diagnóstico em tumores pediátricos com menos de 5 anos, bem como a relação negativa em adenomas da expressão de *PINK1* e *IGF1R*. Essas correlações precisam ser experimentalmente investigadas para serem confirmadas.

Referências*

1. Junqueira LC, Carneiro J. Histologia Básica. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 398p
2. Gray HFRS. Gray Anatomia. 29ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1998. 1103p
3. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. Williams textbook of endocrinology. 9ª ed. Philadelphia : Saunders; 1998. 517p
4. Ctvrtlik F, Koranda P, Tichy T. Adrenal disease: a clinical update and overview of imaging. A review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2014;158(1):23-34.
5. Lindsay JR, Nansel T, Baid S, Gumowski J, Nieman LK. Long-term impaired quality of life in Cushing's syndrome despite initial improvement after surgical remission. J Clin Endocrinol Metab. 2006;91(2):447-53.
6. Nieman LK. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. Eur J Endocrinol. 2015;173(4):M33-8.
7. De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. Adrenal Insufficiency. [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [Updated 2013 Nov 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279083/>
8. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. J Clin Endocrinol Metab. 2008;93(9):3266-81.
9. Kerkhofs TM, Roumen RM, Demeyere TB, van der Linden AN, Haak HR. Adrenal tumors with unexpected outcome: a review of the literature. Int J Endocrinol. 2015;2015:710514.
10. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. Endocr Relat Cancer. 2005;12(3):667-80.
11. Aufforth RD, Nilubol N. Emerging therapy for adrenocortical carcinoma. Int J Endocr Oncol. 2014;1(2):173-82.
12. Ayala-Ramirez M, Jasim S, Feng L, Ejaz S, Deniz F, Busaidy N, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. Eur J Endocrinol. 2013;169(6):891-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, Bentrem DJ, Winchester DJ, Kebebew E, et al. Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. *Cancer*. 2008;113(11):3130-6.
14. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 1984;8(3):163-9.
15. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1612-9.
16. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer*. 2011;2(6):333-40.
17. Michalkiewicz EL, Sandrini R, Bugg MF, Cristofani L, Caran E, Cardoso AM, et al. Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. *Med Pediatr Oncol*. 1997;28(3):175-8.
18. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1116-21.
19. 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. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):838-45.
20. 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.
21. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4970-3.
22. Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D. Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):101-10.
23. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, 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.
24. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(1):13-28.
25. 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.
26. 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.

27. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, 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.
28. 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. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1458-62.
29. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 2003;1(1):8.
30. Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol*. 2001;15(1):57-68.
31. 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.
32. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):427-37.
33. 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.
34. Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol*. 1993;7(9):1196-204.
35. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol*. 1997;17(3):1476-83.
36. Harris AN, Mellon PL. 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*. 1998;12(5):714-26.
37. Franca MM, Ferraz-de-Souza B, Santos MG, Lerario AM, Fragoso MC, Latronico AC, et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;371(1-2):140-7.
38. Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development*. 2004;131(16):4095-105.
39. Tamura M, Kanno Y, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N. Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. *Mech Dev*. 2001;102(1-2):135-44.
40. Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, 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*. 1998;71(1-2):37-48.

41. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, et al. The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development*. 1999;126(24):5771-83.
42. Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microsc Res Tech*. 2002;57(4):208-11.
43. Lu J, Richardson JA, Olson EN. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mech Dev*. 1998;73(1):23-32.
44. Lu J, Chang P, Richardson JA, Gan L, Weiler H, Olson EN. The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9525-30.
45. Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell*. 2013;27(1):5-18.
46. Bandiera R, Sacco S, Vidal VP, Chaboissier MC, Schedl A. Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;408:145-55.
47. Franca MM, Ferraz-de-Souza B, Lerario AM, Fragoso MC, Lotfi CF. POD-1/TCF21 Reduces SHP Expression, Affecting LRH-1 Regulation and Cell Cycle Balance in Adrenocortical and Hepatocarcinoma Tumor Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:841784.
48. Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194(3):1371-9.
49. Pare JF, Malenfant D, Courtemanche C, Jacob-Wagner M, Roy S, Allard D, 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*. 2004;279(20):21206-16.
50. Mouzat K, Baron S, Marceau G, Caira F, Sapin V, Volle DH, et al. Emerging roles for LXRs and LRH-1 in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368(1-2):47-58.
51. Chand AL, Wijayakumara DD, Knowler KC, Herridge KA, Howard TL, Lazarus KA, et al. The orphan nuclear receptor LRH-1 and ERalpha activate GREB1 expression to induce breast cancer cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(2):e31593.
52. Schoonjans K, Dubuquoy L, Mebis J, Fayard E, Wendling O, Haby C, et al. Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):2058-62.
53. 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.

54. Kim S, Yu H. Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(6):551-8.
55. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol.* 2001;154(5):925-36.
56. Lampson MA, Kapoor TM. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol.* 2005;7(1):93-8.
57. Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(3):639-45.
58. Gladhaug IP, Westgaard A, Schjolberg AR, Burum-Auensen E, Pomianowska E, Clausen OP. Spindle proteins in resected pancreatic head adenocarcinomas: BubR1 is an independent prognostic factor in pancreatobiliary-type tumours. *Histopathology.* 2010;56(3):345-55.
59. Chen H, Lee J, Kljavin NM, Haley B, Daemen A, Johnson L, et al. Requirement for BUB1B/BUBR1 in tumor progression of lung adenocarcinoma. *Genes Cancer.* 2015;6(3-4):106-18.
60. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, 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.
61. Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzuco TL, Mariani BM, Brito LP, Goncalves TC, 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.
62. Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene.* 2001;20(33):4457-65.
63. Greene AW, Grenier K, Aguileta MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* 2012;13(4):378-85.
64. Berthier A, Navarro S, Jimenez-Sainz J, Rogla I, Ripoll F, Cervera J, et al. PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Hum Pathol.* 2011;42(1):75-87.
65. 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.
66. 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.
67. Dube C, Bergeron F, Vaillant MJ, Robert NM, Brousseau C, Tremblay JJ. The nuclear receptors SF1 and LHR1 are expressed in endometrial cancer cells and regulate

steroidogenic gene transcription by cooperating with AP-1 factors. *Cancer Lett.* 2009;275(1):127-38.

68. Yang Z, Li DM, Xie Q, Dai DQ. Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(2):211-20.

69. Ye YW, Jiang ZM, Li WH, Li ZS, Han YH, Sun L, et al. Down-regulation of TCF21 is associated with poor survival in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma.* 2012;59(6):599-605.

70. Wang J, Gao X, Wang M, Zhang J. Clinicopathological significance and biological role of TCF21 mRNA in breast cancer. *Tumour Biol.* 2015.

71. Dai Y, Duan H, Duan C, Zhou R, He Y, Tu Q, et al. Down-regulation of TCF21 by hypermethylation induces cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469(3):430-6.

72. Scintu M, Vitale R, Prencipe M, Gallo AP, Bonghi L, Valori VM, et al. Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. *Cancer Lett.* 2007;254(2):298-307.

73. Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(3):639-45.

74. Lee KS, Wu Z, Song Y, Mitra SS, Feroze AH, Cheshier SH, et al. Roles of PINK1, mTORC2, and mitochondria in preserving brain tumor-forming stem cells in a noncanonical Notch signaling pathway. *Genes Dev.* 2013;27(24):2642-7.

75. van der Merwe C, Jalali Sefid Dashti Z, Christoffels A, Loos B, Bardien S. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur J Neurosci.* 2015;41(9):1113-25.

76. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 2015;85(2):257-73.

77. O'Flanagan CH, Morais VA, Wurst W, De Strooper B, O'Neill C. The Parkinson's gene PINK1 regulates cell cycle progression and promotes cancer-associated phenotypes. *Oncogene.* 2015;34(11):1363-74.

78. O'Flanagan CH, Morais VA, O'Neill C. PINK1, cancer and neurodegeneration. *Oncoscience.* 2016;3(1):1-2.

79. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003;162(2):521-31.

80. Seron-Ferre M, Jaffe RB. The fetal adrenal gland. *Annu Rev Physiol.* 1981;43:141-62.

81. Hui XG, Akahira J, Suzuki T, Nio M, Nakamura Y, Suzuki H, et al. Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. *J Endocrinol.* 2009;203(2):241-52.

Anexos

A – Figuras Suplementares

Figura 1S - Expressão relativa dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* em adenomas (ACA) e carcinomas (ACC) adultos e pediátricos. A) expressão relativa de *PINK1* em ACAs; B) expressão relativa de *POD-1* em ACCs. C) expressão relativa de *BUB1B* em ACCs. D) expressão relativa de *PINK1* em ACCs. Teste de Kruskal-Wallis em escala logarítmica com base 2. ACA adulto, n=42-44, ACC n=34-35; ACA pediátricos > 5 anos n= 6, ACC n= 9-10; e pediátricos < 5 anos com ACA, n= 26-27, ACC n= n= 6-8.

Figura 2S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas adultos. A) SF1 e PINK1 B) SF1 e IGF1R; C) SF1 e IGF2; D) POD-1 e PINK1; E) POD-1 e IGF1R; F) POD-1 e IGF2; G) BUB1B e PINK1; H) BUB1B e IGF1R; I) BUB1B e IGF2; J) PINK1 e IGF2; L) IGF2 e IGF1R. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. n= 13-44.

Figura 3S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em carcinomas adultos. A) SF1 e POD-1; B) SF1 e BUB1B; C) SF1 e PINK1; D) SF1 e IGF1R; E) SF1 e IGF2; F) POD-1 e BUB1B; G) POD-1 e PINK1; H) POD-1 e IGF1R; I) POD-1 e IGF2; J) BUB1B e PINK1; L) BUB1B e IGF1R; M) BUB1B e IGF2; N) PINK1 e IGF2; O) IGF2 e IGF1R. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. n= 11-35.

Figura 4S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas pediátricos com mais de 5 anos. A) SF1 e POD-1; B) SF1 e BUB1B; C) SF1 e PINK1; D) SF1 e IGF1R; E) SF1 e IGF2; F) POD-1 e BUB1B; G) POD-1 e PINK1; H) POD-1 e IGF2; I) BUB1B e PINK1; J) BUB1B e IGF1R; L) BUB1B e IGF2; M) PINK1 e IGF1R; N) PINK1 e IGF2; O) IGF2 e IGF1R. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. n = 6-3.

Figura 5S - Análise das correlações entre as expressões dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1*, *SF-1* e *IGF1R* em carcinomas pediátricos com mais de 5 anos. A) *SF1* e *POD-1*; B) *SF1* e *PINK1*; C) *SF1* e *IGF1R*; D) *SF1* e *IGF2*; E) *POD-1* e *BUB1B*; F) *POD-1* e *PINK1*; G) *POD-1* e *IGF1R*; H) *POD-1* e *IGF2*; I) *BUB1B* e *PINK1*; J) *IGF2* e *IGF1R*. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. n= 9-3.

Figura 6S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em adenomas pediátricos com menos de 5 anos. A) SF1 e POD-1; B) SF1 e BUB1B; C) SF1 e PINK1; D) SF1 e IGF1R; E) SF1 e IGF2; F) POD-1 e BUB1B; G) POD-1 e PINK1; H) POD-1 e IGF1R; I) POD-1 e IGF2; J) BUB1B e PINK1; L) BUB1B e IGF1R; M) BUB1B e IGF2; N) PINK1 e IGF2; O) IGF2 e IGF1R. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. $n = 10-27$.

Figura 7S - Análise das correlações entre as expressões dos genes POD-1, BUB1B, PINK1, SF-1 e IGF1R em carcinomas pediátricos com menos de 5 anos. A) SF1 e POD-1; B) SF1 e BUB1B; C) SF1 e PINK1; D) SF1 e IGF1R; E) SF1 e IGF2; F) POD-1 e BUB1B; G) POD-1 e PINK1; H) POD-1 e IGF1R; I) POD-1 e IGF2; J) BUB1B e PINK1; L) BUB1B e IGF1R; M) BUB1B e IGF2; N) PINK1 e IGF1R; O) PINK1 e IGF2; P) IGF2 e IGF1R. Teste de correlação de Pearson e escala logarítmica na base 2. n= 6-3.