AMANDA TEIXEIRA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE CÉLULAS DE 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 do título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

AMANDA TEIXEIRA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR E FUNCIONAL
DE CÉLULAS DE 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 do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi.

Versão original

São Paulo
2014

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

Rodrigues, Amanda Teixeira.

Caracterização molecular e funcional de células de tumores adrenocorticais humanos / Amanda Teixeira Rodrigues. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. 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 de sinalização e expressão gênica da proliferação de células normais e tumorais da suprarrenal.

Versão do título para o inglês: Molecular and functional characterization of human adrenocortical cell cultures.

1. Tumor adrenocortical 2. Oncogenes 3. Genes supressores de tumor 4. Culturas de células 5. Expressão genica 6. Esteroidogênese I. Lofti, Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais III. Título.

ICB/SBIB091/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Amanda Teixeira Rodrigues.

Título da Dissertação: Caracterização molecular e funcional de células de tumores adrenocorticais humanos.

Orientador(a): Profa. Dra. 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, 14 de junho de 2012.

PARECER 1054/CEP

A Comissão de Ética em Pesquisas em Seres Humanos do ICB, na sessão realizada no dia 13.06.2012, APROVOU o projeto intitulado: "*Caracterização molecular e funcional de culturas de células de tumores adrenocorticais humanos*" dos autores Profa. Dra. CLAUDIMARA FERRINI PACICCO LOFTI e a aluna AMANDA TEIXEIRA RODRIGUES.

Informa ainda, que seu projeto será regularizado junto a Plataforma Brasil, assim que a CONEP liberar o acesso ao sistema.

Cabe aos Pesquisadores executantes elaborar e apresentar a este Comitê, relatórios anuais (parciais ou final), de acordo com a resolução 196/06 do Conselho Nacional da Saúde, item IX, 2 letra c.

O primeiro relatório deverá ser encaminhado à Secretaria deste CEP em 13.06.2013.

Atenciosamente,

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

*Aos meus pais, Antonio Carlos e Suely,
Ao meu irmão Raphael e ao meu
namorado Rafael.*

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe, Suely Dias Teixeira, meu pai, Antonio Carlos Rodrigues e meu irmão, Raphael Teixeira Rodrigues, por apoiar minhas decisões, por valorizar o meu esforço, pelo carinho e cuidado.

Ao meu avô, Ary Dias Teixeira (em memória), por ser um exemplo de força, determinação e princípios. Muita Saudade.

Ao meu namorado, Rafael Nader de Almeida, por todo apoio, companheirismo, carinho, conselhos, incentivo nas horas mais difíceis e por me dar forças para continuar.

À Maria Aparecida Moreira Nader (Dona Cida), pelo carinho, compreensão e torcida.

Aos meus amigos, a família que eu escolhi, por toda alegria, amizade e lealdade.

À minha orientadora, Dra. Claudimara Lotfi, pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela orientação e paciência.

Aos amigos e colegas do laboratório, os antigos e os novos, o que estão e os que já se foram, obrigada por toda ajuda e aprendizado.

À Marlene Aparecida Ferreira Pinto, por todo o suporte, companheirismo e amizade.

Aos Profs. Vanessa Moraes Freitas, Madson Queiroz Almeida e Anselmo Sigari Moriscot, pelas sugestões valiosas na minha qualificação.

À Profa. Dra. Maria Luiza Moraes Barreto de Chaves e ao Prof. Anselmo Sigari Moriscot, por permitir o uso dos equipamentos em seu laboratório e a seus alunos de pós-graduação, por toda ajuda.

Aos funcionários do Depto. de Anatomia, do instituto de Ciências Biomédicas - ICBIII.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de amparo à pesquisa do estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pelo apoio financeiro.

RESUMO

Rodrigues AT. Caracterização molecular e funcional de células de tumores adrenocorticais humanos. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Os adenomas adrenocorticais possuem 3 a 7% de frequência em humanos adultos, no entanto, o carcinoma adrenocortical é considerado raro e altamente agressivo, com uma incidência entre meio a dois casos por milhão de habitantes por ano. Os carcinomas detectados em estágios avançados apresentam altos índices de metástase ou recidiva e, mesmo com a utilização de critérios padronizados, ainda há dificuldade em se diferenciar tumores benignos de malignos. Desta forma, é necessário o estudo de marcadores eficientes capazes de melhorar a detecção e a diferenciação entre os tipos de tumores. Por serem raros e possuírem diversas manifestações clínicas, a utilização de culturas *in vitro* para tumores adrenais pode ser uma ferramenta valiosa para o estudo dos processos fisiopatológicos responsáveis pela gênese e progressão da doença. Nosso laboratório tem se empenhado em obter e caracterizar culturas de células derivadas de tumores do córtex adrenal. Com isso, espera-se aumentar o número de ferramentas disponíveis para o estudo de diferentes aspectos das doenças proliferativas do córtex adrenal. Portanto, esse trabalho teve como objetivo a caracterização molecular e funcional de culturas de células de tumores adrenocorticais obtidas de fragmentos de tumores de pacientes. Para essa caracterização foram analisados os perfis de expressão de oncogenes e genes supressores de tumor nas culturas de células obtidas, através de PCR array e qPCR. A produção de cortisol e testosterona no meio de cultura das células foi avaliada através de kits comerciais específicos. Os resultados da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor, não mostraram um padrão de expressão que diferenciasse as culturas em função dos diagnósticos dos tumores. Dos oncogenes e supressores de tumor analisados, 7 oncogenes apresentaram maior expressão na maioria culturas com diferentes aspectos clínicos e 9 supressores de tumor apresentaram baixa expressão na maior parte das culturas analisadas. Os genes selecionados para validação por qPCR, *WWOX*, *FHIT* e *TP73* confirmaram os resultados obtidos por PCR Array e a sugestiva interação entre esses fatores nos tumores adrenocorticais merecem futuras investigações. O potencial funcional das culturas T83-ACC, T36-REC e T7-ACA(P) foram evidenciados, e mostraram que podem ser bons modelos para estudo da ação de hormônios e seus mecanismos.

Palavras-Chave: Tumor adrenocortical. Oncogenes. Genes supressores de tumor. Culturas de células. Expressão Genica. Esteroidogênese.

ABSTRACT

Rodrigues AT. Molecular and Functional Characterization of Human Adrenocortical Cell Cultures. [dissertação (Master in Sciences Morphofunctional)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, Universidade de São Paulo; 2014.

The frequency of adrenocortical adenomas is 3 - 7% in adult humans. However, adrenocortical carcinoma is rare and highly aggressive, with an incidence of 0.5-2 million individual per year. Carcinomas detected in advanced stages have high rates of metastasis or relapse, and there are difficulties in distinguish between benign and malignant tumors even with the use of standardized scores. Thus, the study of efficient markers is necessary to improve the detection and differentiation between tumor types. Because they are rare and they have different clinical manifestations, the use of in vitro cultures of adrenal tumor cells can be a valuable tool, which can contribute to the study of pathophysiological processes responsible for the genesis and progression of the disease. Our laboratory has been working in obtaining and characterizing cultures of cells derived from tumors of the adrenal cortex. It is expected to increase the number of tools available for the study of different aspects of proliferative diseases of the adrenal cortex. This work aimed at molecular and functional characterization of cell cultures of adrenocortical tumors obtained from tumors fragments of patients. We analyzed the expression of oncogenes and tumor suppressor genes of cultured tumor cells, by using PCR array and qPCR. The production of cortisol and testosterone levels in the culture medium of the cells was also measured using specific commercial kits. We did not find a pattern of oncogenes and tumor suppressor genes expression in order to differentiated cell cultures of tumors presenting distinct diagnosis. Among the oncogenes and tumor suppressor genes analyzed 7 oncogenes showed higher expression and 9 supressor genes low expression in most cultures analyzed. To validation in qPCR, it was selected *WWOX*, *FHIT* and *TP73* genes confirmed the results obtained by PCR Array, and the suggestive interaction of these factors in adrenocortical tumors deserve further investigation. The functional potential of T83-ACC, T36-REC and T7-ACA(P) cell cultures were found, and shown confirm that they can be good models for studying the action of hormones and their mechanisms.

Keywords: Adrenocortical tumor. Oncogenes. Tumor suppressor genes. Cell cultures. Gene expression. Steroidogenesis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Divisões da glândula adrenal e principais produtos sintetizados. Adaptado de: Wang, Rainey, 2012.	17
Figura 2 - Esquema representativo da via cAMP. Adaptado de: Stocco e colaboradores, 2005.	18
Figura 3 - Esquema demonstrativo da via esteroidogênica no córtex adrenal humano para a produção de glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios sexuais. Adaptado de: Simpson & Waterman, 1988.	19
Figura 4 - Modelo experimental utilizado para quantificação de esteroides no meio de cultura.	34
Figura 5 - Esquemas representativos das interações entre genes selecionados dos grupos de oncogenes e supressores de tumor (A e B). A-Interações entre oncogenes e supressores de tumor selecionados; B-Interações de oncogenes e supressores de tumor com genes anteriormente descritos em tumores adrenocorticais.	40
Figura 6 - Esquema representativo com interações através das publicações relacionadas entre supressores de tumor <i>WWOX</i> , <i>TP73</i> , <i>FHIT</i> e <i>MEN1</i> com genes anteriormente descritos (<i>TP53</i> e <i>CTNNB1</i>) em tumores adrenocorticais.	41
Figura 7 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene <i>WWOX</i> nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001.	42
Figura 8 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene <i>FHIT</i> nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001.	43
Figura 9 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene <i>TP73</i> nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001, **p<0,01.	44
Figura 10 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T83-ACC. Tratamento sustentado com ACTH 10 ⁻⁹ M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001.	45
Figura 11 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T36-ACC. Tratamento sustentado com ACTH 10 ⁻⁹ M, Forskolina 10 ⁻⁹ M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Tukey. *p<0,05.	46

Figura 12 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T7-ACA(P). Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. *p<0,05.....47

Figura 13 - Quantificação de testosterona no meio de cultura de células T36-REC. Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M, Forskolina 10^{-9} M, ACTH 10^{-7} M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. **p<0,01, *p<0,05.48

Figura 14 - Quantificação de testosterona no meio de cultura de células T7-ACA(P). Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M, Forskolina 10^{-9} M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. **p<0,01.....49

Figura 15 - Gráfico de dispersão dos genes diferencialmente expressos nas placas de PCR array. Expressão gênica das culturas NCI-H295R, SW-13, T83-ACC, T53-ACC, T20-ACC, T36-REC, T24-REC, T43-MET, T19-NEO T25-ACA e T16-HN, T105-ACC, T7-ACA e T47-ACA em relação ao pool de adrenais normais humanas. Limiar de expressão de três vezes para mais e para menos. Pontos em vermelho são genes mais expressos, verdes são genes menos expressos e pretos não apresentaram diferença em relação ao controle. n=1.77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Culturas de células adrenocorticais.....	29
Tabela 2 - Sequências de primers usados para a reação de qPCR.....	32
Tabela 3 - Expressão gênica diferencial das culturas de células em relação ao pool de adrenais normais.	36
Tabela 4 - Seleção de genes quanto a sua expressão	38
Tabela A. 1 - Descrição dos genes disponíveis no PCR Array.....	70
Tabela C. 1 - Relação de oncogenes diferencialmente expressos.....	78
Tabela C. 2 - Relação de supressores de tumor diferencialmente expressos	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACA	- Adenomas adrenocorticais
ACC	- Carcinoma adrenocortical
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
ATM	- Gene com mutação na ataxia telangiectasia
BCL2L1	- Semelhante ao BCL-2 tipo 1
cAMP	- Monofosfato cíclico de adenosina
CASP8	- Caspase 8
CDK4	- Ciclina dependente de quinase 4
CTNNB1	- β -catenina
DEPC	- Dietilpirocarbonato
DHEA	- Dehidroepiandrosterona
DMEM	- Eagle modificado por dubelco
ELK1	- ELK1, membro da família de oncogenes ETS
ETS1	- Oncogene E26 1
FGFR1	- Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 1
FGFR4	- Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 4
FHIT	- Gene "Fragile histidine triad"
FOXD3	- Forkhead caixa-D3
HGF	- Fator de crescimento hepatocítico
HIC	- Hipermetilado em câncer 1
HPA	- Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
HSD3B2	- 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo II
IGF1R	- Receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1
IGF2	- Fator de crescimento semelhante à insulina 2
ITS	- Transferrina e Selênio
JAK2	- Quinase Janus 2
JUNB	- Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 B
JUND	- Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 D
KIT	- v-kit homólogo de sarcoma felino
KITLG	- Ligante de KIT
LOH	- Perda de heterozigosidade

MC2T	- Receptor 2 de melanocortina
MEN1	- Múltiplas neoplasias endócrinas 1
MET	- Receptor do fator de crescimento hepatocítico
M-MLV	- Transcriptase reversa
MOS	- v-mos do sarcoma murino de Moloney homólogo do oncogene viral Inibidor de fator nuclear do gene enhancer do polipeptídeo leve
NFKBIA	- Kappa nas células-B 1, Alfa
NRAS	- Oncogene homólogo de neuroblastoma RAS viral (v-ras)
P450SCC	- Enzima citocromo P450SCC
PBS	- Solução salina tamponada
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
PIK3CA	- Fosfatidilinositol 3 quinase-subunidade alfa
PKA	- Proteína quinase A
PML	- Leucemia promielocítica
PRKAR1A	- Subunidade R1A reguladora da proteína quinase A
PRKCA	- Proteína quinase C, Alfa
RARA	- Receptor ácido retinóico, Alfa
REL	- Oncogene homólogo viral v-rel reticuloendoteliose viral (Aviário),
ROS1	- Receptor tirosina quinase
RUNX1	- Fator de transcrição relacionado a Runt
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
SFB	- Soro fetal bovino
SRC	- Tirosina cinase
SRC	- Oncogene homólogo viral v-src
StAR	- Proteína reguladora esteroideogênica aguda
STAT3	- Transdutor de sinal e ativação de transcrição 3
STK11	- Serina/treonina quinase 11
TP73	- Proteína p73
TSC1	- Esclerose tuberosa 1
VEGF	- Fator de crescimento endotelial vascular
WWOX	- WW domínio contendo óxido redutase
XRCC1	- Gene de reparo em células de hamster chinês 1
ZF	- Zona fasciculada

- ZG** - Zona glomerulosa
- ZHX2** - Zinc fingers e homeoboxes 2
- ZR** - Zona reticulada

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 OBJETIVOS	25
2.1 Objetivo Geral	26
2.2 Objetivos Específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Linhagens e culturas de células utilizadas	28
3.1.1 Linhagens celulares	28
3.1.2 Culturas de células de tumores adrenocorticais	28
3.2 Análise da expressão gênica através de PCR array e qPCR	29
3.2.1 Extração de RNA total	29
3.2.2 Preparação do cDNA para a reação em cadeia de polimerase em placas (PCR Array)	30
3.2.3 Preparação da reação em cadeia de polimerase em placas (PCR Array)	30
3.2.4 Preparação do cDNA para a reação em cadeia de polimerase pelo método quantitativo (qPCR)	31
3.2.5 A reação em cadeia de polimerase pelo método quantitativo (qPCR)	32
3.3 Análise funcional através da quantificação da secreção de esteroides no meio de cultura	32
4 RESULTADOS	35
4.1 Análise da expressão gênica através do PCR array	36
4.2 Análise da expressão gênica por qPCR para validação da expressão dos genes <i>WWOX</i> , <i>FHIT</i> e <i>TP73</i>	41
4.3 Análise das concentrações de esteroides no meio de cultivo celular	44
4.3.1 Análise da concentração de cortisol nos meios de cultura	44
4.3.2 Análise da concentração de testosterona nos meios de cultura	47
5 DISCUSSÃO	50
6 CONCLUSÕES	56
REFERÊNCIAS	58
APÊNDICES	69
APÊNDICE A - Descrição dos genes disponíveis no PCR Array	70
APÊNDICE B - Gráfico de dispersão de genes no PCR Array	76
APÊNDICE C - Relação de genes diferencialmente expressos	78

1 INTRODUÇÃO

As glândulas suprarrenais estão localizadas na cavidade abdominal em posição retroperitoneal nos polos superiores dos rins. A glândula é composta por um córtex e medula envoltos por uma cápsula. Abaixo da cápsula (Figura 1) encontramos o córtex adrenal, que é composto por três zonas distintas que sintetizam diferentes hormônios esteroides. A zona glomerulosa (ZG) responde à Angiotensina II e Potássio (K^+) em conjunto com o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), produzindo mineralocorticoides, como a aldosterona. Os mineralocorticoides estão relacionados com a homeostase de eletrólitos no plasma sanguíneo, promovendo a reabsorção de sódio e excreção de potássio nos rins. A zona fasciculada (ZF) é regulada pelo ACTH que induz a produção de glicocorticoides, como o cortisol, o qual está envolvido com o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas que estimulam a gliconeogênese. A zona reticulada (ZR) é também regulada pelo ACTH e outros fatores não totalmente conhecidos e produz hormônios sexuais em humanos, como a dehidroepiandrosterona (DHEA) (Orth, Kovacs, 1998). A medula, situada na parte mais interna da glândula, tem como função produzir catecolaminas que são liberadas em situações de estresse, calor, frio ou dor.

Figura 1 - Divisões da glândula adrenal e principais produtos sintetizados. Adaptado de: Wang, Rainey, 2012.

O ACTH, responsável pelo estímulo de células adrenocorticais produtoras de glicocorticoides e outros esteroides, é regulado pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA). O eixo HPA aumenta ou reduz os níveis de ACTH no sangue de acordo com estímulos externos, fisiológicos ou patológicos.

A biossíntese de hormônios esteroides é mediada basicamente pela via cAMP (monofosfato cíclico de adenosina), conforme mostrado no esquema da Figura 2. Após a ligação do ACTH ao receptor 2 de melanocortina (MC2R), há a estimulação da adenilato-ciclase que, por sua vez, eleva o cAMP. A elevação do cAMP ativa a proteína quinase A (PKA) (Xing et al., 2010), que estimula a fosforilação de fatores de transcrição para a produção de enzimas esteroidogênicas e da proteína reguladora esteroidogênica aguda (StAR). A proteína StAR participa do processo de transporte do colesterol, substrato da produção de esteroides, da membrana externa para a interna da mitocôndria (Stocco et al., 2005).

Figura 2 - Esquema representativo da via cAMP. Adaptado de: Stocco e colaboradores, 2005

Na parte interna da mitocôndria, se inicia a cascata esteroidogênica (Figura 3). Primeiramente, ocorre a clivagem da cadeia lateral do colesterol pela enzima citocromo P450SCC (CYP11A1), formando a pregnenolona que, depois de

sintetizada, dirige-se para o retículo endoplasmático podendo seguir diferentes caminhos. Na zona glomerulosa, a pregnenolona pode ser convertida diretamente em progesterona pela ação da enzima 3β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo II (HSD3B2). A progesterona ao sofrer a ação da enzima P-450C21 (CYP21) resulta no 11-desoxicorticosterona que, por meio da P45011B1 (CYP11B1), forma a corticosterona. Esta, através da proteína P45011B2 (CYP11B2), disponível somente nessa zona, possibilita a formação da aldosterona. Na zona fasciculada, a pregnenolona é convertida pela enzima P45017 α (CYP17) em 17 α -hidroxipregnenolona. Em seguida, essa forma é convertida em 17 α -hidroxiprogesterona através da enzima 3β -HSD que sofre a ação da P450C21 (CYP21) formando o 11-desoxicortisol. Este retorna à mitocôndria para a etapa final da produção de glicocorticoides por ação da P-45011B1, que catalisa o 11-desoxicortisol em cortisol. Na zona reticulada, a 17,20-liase promove a produção de dehidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona, precursores de hormônios sexuais nas adrenais de humanos (Miller, 1988; Simpson, Waterman, 1988).

Figura 3 - Esquema demonstrativo da via esteroidogênica no córtex adrenal humano para a produção de glicocorticoides, mineralocorticoides e hormônios sexuais. Adaptado de: Simpson & Waterman, 1988.

Alterações patológicas na glândula adrenal podem favorecer a formação de neoplasias. Os tumores adrenocorticais estão divididos em benignos e malignos, podendo ser encontrados de forma incidental durante a realização de exames de imagem (Bornstein et al., 1999) e estar associados à algumas síndromes, como:

hipercortisolismo na síndrome de Cushing, hiperandrogenismo na virilização ou excesso mineralocorticoides na síndrome de Conn (Arnaldi, Boscaro, 2012; Grumbach et al., 2003; Lerario et al., 2014).

Os adenomas adrenocorticais (ACA), ocorrem com certa frequência em humanos e aumenta com a idade, com uma incidência entre 3 a 7% em adultos acima de 50 anos (Kloos et al., 1995; Ross, Aron, 1990). No entanto, o carcinoma adrenocortical (ACC) é raro, agressivo e de prognóstico pouco favorável (Allolio, Fassnacht, 2006; Fassnacht *et al.*, 2011). Possui uma incidência mundial de 0,5-2 casos por milhão de habitantes, representando 0,02% de todos os cânceres (Zini et al., 2011). Apresenta maior prevalência nos primeiros 5 anos e na vida adulta, entre 40-50 anos, sendo mais frequentes em mulheres (Fassnacht et al., 2011; Flack, Chrousos, 1996; Sandrini et al., 1997). Sua incidência nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, é de 12 a 15 vezes mais alta em relação às outras regiões do mundo, principalmente em crianças, com 3,4 casos por milhão (Sandrini et al., 1997). A causa da maior incidência está associada a uma mutação germinativa no gene *TP53* (Pianovski et al., 2006). Para diferenciar adenomas e carcinomas, são utilizados nove critérios de classificação, conhecidos como escore de Weiss, considerando-se malignos aqueles que obedecem à três ou mais critérios (Weiss, 1984; Weiss et al., 1989). Porém, tais preceitos foram recentemente reavaliados (Aubert et al., 2002), resultando na redução de seu número através da eliminação de critérios subjetivos e de difícil interpretação (Lau, Weiss, 2009). A classificação do grau de estadiamento é baseada no tamanho e peso do tumor, no comprometimento de linfonodos e na doença metastática, através da escala proposta por MacFarlane (MacFarlane, 1958), que foi modificada por Sullivan (Sullivan et al., 1978). Tumores pediátricos, embora algumas vezes apresentem características morfológicas de malignidade, geralmente apresentam um comportamento clínico menos agressivo (Cagle et al., 1986). Portanto, os sistemas de classificação utilizados para diferenciar tumores benignos de malignos em adultos não são totalmente aplicáveis a tumores pediátricos (Lau, Weiss, 2009). Para a classificação do estadiamento desses tumores existe um sistema proposto por Sandrini (Sandrini et al., 1997).

Mesmo com a utilização destes critérios, existem relatos indicando que tumores classificados como adenomas, de acordo com as características histológicas, apresentaram posteriormente recidiva local ou metástase, enquanto outros confirmados como malignos não apresentaram reincidência, mesmo depois

de muitos anos (Flack, Chrousos, 1996; Weiss, 1984). Portanto, novos marcadores histológicos e moleculares são necessários para que auxiliem na detecção da doença, bem como na sua classificação.

Fatores envolvidos em processos fisiopatológicos foram descritos por serem potenciais marcadores moleculares. Dentre eles, está o receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R), que possui um papel importante na proliferação celular. O IGF1R é expresso de forma semelhante nos adenomas e carcinomas adultos (Almeida et al., 2008; Ragazzon et al., 2011; Slater et al., 2006). Por outro lado, o IGF1R está mais expresso em tumores pediátricos clinicamente considerados carcinomas, e pode ser um marcador para esse tipo de tumor (Almeida et al., 2008). Outros marcadores incluem o receptor do fator de crescimento do fibroblasto 1 (FGFR1) e o receptor do fator de crescimento do fibroblasto 4 (FGFR4), que se apresentaram hiperexpressos em carcinomas adrenocorticais em um estudo de “microarray” (de Fraipont et al., 2005). Resultados mais recentes da análise da expressão de FGFR4 mostraram que 65% dos tumores adrenocorticais de adultos e pediátricos apresentaram hiperexpressão desse receptor, enquanto que um subgrupo apresentou amplificação gênica. Além disso, mostrou-se uma diferença significativa de expressão entre adenomas e carcinomas adultos, de forma que a alta expressão de FGFR4 pode caracterizar um diagnóstico pior desse tipo de tumor (Brito et al., 2012).

O estudo clonal de tumores é importante para estabelecer a origem da neoplasia e os mecanismos para a progressão do tumor. O estado monoclonal indica que o tumor é resultado de uma mutação genética intrínseca. Por outro lado, o estado policlonal indica que as células foram afetadas por estímulos locais ou sistêmicos (Libè et al., 2007). As análises do estado clonal, que envolve a inativação do cromossomo X nos tumores adrenocorticais, mostraram que os carcinomas adrenocorticais são monoclonais. No entanto os adenomas adrenocorticais podem ser tanto monoclonais, como policlonais (Beuschlein et al., 1994, Gicquel et al., 1994). Estes eventos genéticos podem ser estudados através da análise de todo o genoma e pela verificação das perdas ou ganhos de parte ou da totalidade de um cromossomo. Através destes estudos foi possível observar que alterações genéticas se acumulam durante a progressão do tumor (Sidhu et al., 2002). Estudos cromossômicos mostraram também locais específicos no DNA que são frequentemente modificados causando maior instabilidade cromossômica. Estes

locais são denominados sítios frágeis (Durkin, Glover, 2007). Os genes envolvidos nessas alterações moleculares podem ser classificados como oncogenes ou supressores de tumor. Os oncogenes codificam fatores de crescimento, receptores de fator de crescimento entre outros que participam da modulação do crescimento e diferenciação celular. Através da modificação genética, por mutação, amplificação e translocação cromossômica, ocorre uma ativação destes oncogenes e uma desregulação na transcrição e crescimento celular. Por outro lado, os supressores de tumor possuem um efeito inibitório no crescimento e sobrevivência celular, e sua inativação pode predispor à tumorigênese (Sidhu et al., 2003).

Dentre os oncogenes descritos está o fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF2), que parece ser importante na proliferação celular e no desenvolvimento do córtex adrenal. Esse gene está altamente expresso em carcinomas adrenocorticais, sendo considerado um marcador eficiente para diferenciar adenomas de carcinomas e um oncogene nesse tipo de tumor (Almeida et al., 2008; Gicquel et al., 1997; Ragazzon et al., 2011; Slater et al., 2006).

Um membro chave da via de sinalização Wnt é o gene da β -catenina (*CTNNB1*), que é essencial para o desenvolvimento embrionário, para a adesão célula-célula e a renovação celular (Berthon et al., 2010). Alterações na via Wnt podem causar acúmulo da proteína β -catenina no núcleo celular e interação com fatores de transcrição e ativação da transcrição gênica. Mutação no gene *CTNNB1* é frequente em tumores adrenocorticais benignos e malignos e pode estar associada a um fenótipo mais agressivo em carcinomas (Tissier et al., 2005). Em um trabalho recente, foi avaliada a presença da mutação de *CTNNB1* e TP53 p.R337H em 66 tumores pediátricos e 25 tumores adultos. A associação das mutações em tumores adultos e pediátricos foi relacionada a um pior prognóstico, com aumento de eventos de morte (Mermejo et al., 2014).

O Fator esteroideogênico 1 (SF-1), que é um fator de transcrição com papel fundamental no desenvolvimento e função do córtex adrenal (Parker, Schimmer, 1997). Trabalhos sobre a análise da expressão gênica e proteica de SF-1 relatam hiperexpressão desse fator em tumores adrenocorticais (Figueiredo et al., 2005). Entretanto, análises por imunohistoquímica de carcinomas e adenomas adrenocorticais mostraram que SF-1 não é eficaz para diferenciar carcinomas e adenomas, porém possibilita a distinção entre um carcinoma primário e metástase (Soon et al., 2008). As amplificações de SF-1 estão presentes em 47% dos casos de

tumores pediátricos, e em apenas 10% dos pacientes adultos (Almeida et al., 2010), indicando assim, que SF-1 tem um papel importante na tumorigênese adrenocortical pediátrica.

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que está relacionado com a angiogênese e com crescimento de carcinomas e metástases, também tem sido investigado por apresentar alta expressão em carcinomas adrenocorticais quando comparado com adenomas (Antonini et al., 2011; Libè et al., 2007).

O gene supressor de tumor *TP53* é um dos mais estudados no processo tumorigênico adrenocortical. A alteração desse gene está associada a uma mutação na região R337H (Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001). Alguns estudos mostraram que a perda de heterozigosidade do gene que codifica a proteína p53 no locus do cromossomo 17 ocorre em aproximadamente 85% dos carcinomas e menos de 30% de adenomas (Gicquel et al., 2001; Ragazzon et al., 2011).

Outro supressor de tumor relatado é o componente chave da via de sinalização de cAMP, *PRKAR1A* (Subunidade R1A reguladora da proteína quinase A) tem sido descrito por estar ligado a tumorigênese endócrina (Bertherat, 2001; Bossis, Stratakis, 2004). Este gene, localizado no locus 17q22-24, está relacionado com o desenvolvimento de neoplasias que são provenientes da patologia denominada complexo de Carney (Carney et al., 1995). Em adenomas secretores foram observadas mutações somáticas (Bertherat et al., 2003) e perda de heterozigosidade (LOH) no locus 17q22-24, em uma região restrita ao gene *PRKAR1A* (Libé et al., 2007).

O receptor de melanocortina 2 (MC2R) pertence à superfamília de receptores acoplados G-proteína. Foi observada perda de heterozigosidade (LOH) em 2 de 4 carcinomas adrenocorticais, mas não em 15 adenomas funcionais, sugerindo que este gene esteja envolvido com a diferenciação celular (Reincke et al., 1997). Este gene apresenta expressão regulada em adenomas adrenocorticais (que são funcionais) e baixa expressão em carcinomas adrenocorticais não funcionantes (Beuschlein et al., 2001).

O estudo dos mecanismos celulares e moleculares relacionados com as alterações do córtex adrenal é limitado pela disponibilidade de modelos biológicos apropriados (Wang, Rainey, 2012). Existem poucos sistemas *in vitro* disponíveis para o estudo dos tumores adrenocorticais. Dentre eles estão a linhagem de tumor de camundongo, células Y1 (Yasumura et al., 1966) e as linhagens tumorais

humanas SW-13, NCI-H295 e sua variação NCI-H295R (Bird et al., 1993; Gazdar et al., 1990; Leibovitz et al., 1973; Rainey et al., 1994). Muitas das contribuições importantes no estudo dos mecanismos moleculares e bioquímicos que controlam a esteroidogênese adrenocortical e suas alterações foram obtidas a partir desses modelos. No entanto, por diferentes razões, esses sistemas apresentam limitações, principalmente para estudos da expressão gênica e proteica de tumores adrenais humanos (Rainey et al., 2004). Foram descritas algumas culturas de células como RL-251 (Schteingart et al., 2001), em cujo meio de cultura foram observadas altas concentrações de citocinas, e cujas células, quando inoculadas em camundongos, formaram tumores que apresentaram as mesmas características do tumor do paciente de onde as células foram obtidas. As células HAC15, foram obtidas de um carcinoma pediátrico (Parmar et al., 2008), uma cultura de células de carcinoma R1 α haploinsuficiente devido a uma mutação PRKAR1A (Nesterova et al., 2008). Porém, na sua caracterização observou-se que, provavelmente devido a uma contaminação com a linhagem H295R, essa cultura foi substituída por uma cultura clonal dessa linhagem (comunicação pessoal).

Nos últimos anos, nosso grupo tem se empenhado na obtenção de culturas de células de diferentes tipos de tumores adrenocorticais, pediátricos e adultos. Dentre as culturas de células obtidas, algumas foram utilizadas em alguns estudos, como as células T7-ACA, originadas de um fragmento de tumor pediátrico com características clínicas de um adenoma (Almeida et al., 2008) e a cultura de células obtida de um fragmento de uma recidiva de carcinoma adulto, T36-REC (França et al., 2013).

Durante o processo de estabelecimento das culturas celulares, além da seleção do tipo celular com maior capacidade proliferativa, modificações celulares, moleculares e funcionais podem ocorrer. Por isso, é de fundamental importância que essas culturas de células sejam analisadas do ponto de vista molecular e funcional. Com isso, espera-se aumentar o número de ferramentas disponíveis para o estudo de diferentes aspectos das doenças proliferativas do córtex adrenal.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Analisar o potencial das culturas de células adrenocorticais, obtidas de fragmentos de tumores de pacientes com diferentes características anatomopatológicas e clínicas, como modelos *in vitro*, através da sua caracterização molecular e funcional.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Analisar a expressão gênica de oncogenes e supressores de tumor em placas de “PCR array” de diferentes culturas de células de tumores adrenocorticais.
- 2) Validar os resultados obtidos da expressão diferencial dos genes por PCR quantitativo (qPCR)
- 3) Analisar a capacidade de produção e secreção de cortisol e testosterona em meio de cultura das células de tumores adrenocorticais, através de kits comerciais para análise de hormônios esteroides.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Linhagens e culturas de células utilizadas

3.1.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas linhagens de carcinomas adrenocorticais humanos, células NCI-H295R (Bird et al., 1993; Rainey et al., 1994), SW-13 (Leibovitz et al., 1973) e um pool de RNA de tecido de adrenais normais (Clontech., Mountain View, CA, EUA). A linhagem NCI-H295R, é derivada da NCI-H295 (Gazdar et al., 1990).

3.1.2 Culturas de células de tumores adrenocorticais

Para este estudo, foram utilizadas culturas de células obtidas de fragmentos de tumores do córtex adrenal de pacientes cujos diagnósticos estão apresentados na Tabela 1. As culturas de células foram obtidas através do processamento do fragmento, que foi primeiramente lavado em solução salina tamponada (PBS) em ambiente estéril. Após a retirada de partes com necrose ou gordura e redução do tamanho dos fragmentos, foi iniciado o processo de digestão enzimática. Foi adicionado aos fragmentos meio de cultura contendo 4 mg/ml de colagenase e 1 ug/ml de DNase (Gibco, Grand Island, NY, EUA). O material foi mantido a 37 °C com 95% ar e 5% de CO₂ até que as células pudessem ser desagregadas com movimentos mecânicos de uma pipeta volumétrica. O material digerido foi filtrado em filtro de nylon com poros de 100 µm, para reter o material não digerido e, em seguida, centrifugado a 700 rpm durante 10 minutos. As células foram colocadas em meio DMEM contendo 10% de SFB (soro fetal bovino, Gibco), 25 mg/L de ampicilina (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, EUA) e 100 mg/L de estreptomicina (Sigma) e, em seguida, colocadas em garrafas de cultura de 12,5 cm² (Falcon, Franklin Lakes, NJ, EUA). Se as culturas de células apresentassem potencial proliferativo, eram expandidas através de subcultivos, ou mantidas por período variável, depois eram congeladas (seguindo um protocolo padrão de congelamento em nitrogênio líquido) e armazenadas no Biobanco do laboratório. Após o descongelamento, as culturas de células utilizadas foram mantidas em meio DMEM ou RPMI com soro fetal bovino (SFB) 2% ou 10% ou, quando necessário, suplementado com Insulina,

Transferrina e Selênio (ITS). O protocolo básico do processamento para obtenção das culturas de células a partir de fragmentos foi aprovado pelo Comitê de Ética da FMUSP e do ICB sob o número de protocolo 072/06, e foi descrito em Almeida e colaboradores (2008).

Tabela 1 - Culturas de células adrenocorticais

Culturas	Idade	Diagnósticos
T83	31a	Carcinoma
T53	22a	Carcinoma
T20	23a	Carcinoma
T36	38a	Recidiva
T24	22a	Recidiva
T43	30a	Metástase
T19	18a	Neoplasia
T25	17a	Adenoma
T16	50a	Hiperplasia Nodular
T105	4a	Pediátrico-Clinicamente maligno
T7	1a 7m	Pediátrico-Clinicamente benigno
T47	11m	Pediátrico-Clinicamente benigno

3.2 Análise da expressão gênica através de PCR array e qPCR

3.2.1 Extração de RNA total

Após 24h do plaqueamento de 9×10^5 células por placa, o RNA total foi extraído utilizando 1 ml de TRIZOL (Invitrogen - Life Technologies Carlsbad, CA, EUA), que foi homogeneizado, e depois recolhido. A ele foi adicionado 200 µl de clorofórmio por ml de TRIZOL. Após centrifugação a 12.000 rpm à -4° C por 15 minutos para a separação do material em fases, a parte superior incolor, que contém o RNA total, foi recolhida. À solução obtida foi adicionado álcool isopropílico, para promover a precipitação do RNA. Este processo foi seguido de nova centrifugação a 12.000 rpm à -4 °C por 15 minutos. O sobrenadante foi descartado e junto ao precipitado (pellet) formado foi adicionado etanol 75%, que

foram novamente centrifugados nas mesmas condições anteriores. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionado à amostra 20-40 µl de água DPEC (Dietil pirocarbonato) com a finalidade de impedir a degradação da amostra. A amostra foi mantida à 4 °C “overnight” sob constante agitação e, após este período, foi estocada à -80 °C. A integridade do material foi verificada por análise em gel de agarose 1% e a quantificação do RNA total obtido foi analisada em espectrofotômetro em comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm.

3.2.2 Preparação do cDNA para a reação em cadeia de polimerase em placas (PCR Array)

O cDNA foi obtido através da utilização de 1 µg do RNA total extraído e de um *kit* fornecido pelo fabricante das placas de “PCR array” (SABiosciences - Qiagen, Germantown, MD, EUA). Primeiramente, foi preparado um Mix de eliminação de DNA Genômico com a utilização de 2 µl de buffer GE (5X gDNA Elimination Buffer), 1 µg do RNA total extraído e água livre de RNase (RNase Free Water), cujo volume foi ajustado para um volume final de 10 µl. Este mix foi incubado por 5 minutos à 42 °C e colocado diretamente no gelo por 1 minuto. A este conteúdo foi adicionado o Mix de Transcrição Reversa, composto por 4 µl de 5X Buffer BC3, 1 µl Control P2, 2 µl RE3 reverse Transcriptase Mix e 3 µl de RNase Free Water, para um volume final de 20 µl. Após agitação, este material foi incubado à 42 °C por 15 minutos e, em seguida, à 95 °C por 5 minutos. Ao final deste processo, foi adicionado 91 µl de RNase Free Water para obtenção de um volume final de 111 µl de cDNA, que foi estocado à -20 °C até o momento da preparação da reação na placa de PCR Array.

3.2.3 Preparação da reação em cadeia de polimerase em placas (PCR Array)

As placas para a reação em cadeia de polimerase utilizadas foram as RT2 Profiler™ PCR Array Human Oncogenes & Tumor Suppressor Genes (PAHS-502A) (Qiagen). Estas placas possuem 96 poços contendo DNA de genes que são classificados e separados em grupos, conforme descrito na Tabela A.1 - Apêndice A. Primeiramente, foi adicionado ao cDNA anteriormente obtido o reagente SYBR Green MIX e a RNase Free Water. Após agitação, o conteúdo foi

adicionado à placa de PCR no volume final de 25 µl por poço. As placas foram analisadas no aparelho 7500 PCR Real-Time System (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA) e os dados obtidos foram inseridos e analisados através do método da determinação da variação do $2^{-\Delta\Delta C_t}$, e quanto à variação da expressão de cada gene, em termos de vezes em relação ao controle. Foram consideradas relevantes somente as variações de transcrições gênicas alteradas em três vezes ou mais em relação ao controle, denominado “Fold Regulation”. Os dados foram analisados através do programa RT² Profiler PCR Array Data Analysis version 3.5, disponibilizado no seguinte site: <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>.

Durante o processo de seleção dos genes para validação, uma análise de interação dos genes foi realizada utilizando o programa online GNCPro, disponível no seguinte site: <http://gncpro.sabiosciences.com/>.

3.2.4 Preparação do cDNA para a reação em cadeia de polimerase pelo método quantitativo (qPCR)

Para a análise por qPCR, o cDNA foi obtido através do método que utiliza a transcriptase reversa M-MLV RT (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase). Primeiramente, foram adicionados 1 µl do oligo (dT), 1 µg do RNA total; 1 µl de 10 mM dNTP Mix (10mM cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP em pH neutro), que foram completados com água DEPC (Invitrogen) para um volume final de 12 µl. A solução foi aquecida a 65 °C por 5 minutos e resfriada em gelo. Após centrifugação rápida, os componentes da solução foram recuperados e a eles foram adicionados 4 µl de 5x First Strand Buffer; 2 µl 0.1 M DTT; 1 µl RNaseOUT TM Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 unidades/µl). Todos os componentes do tubo foram homogeneizados e incubados a 37 °C por 2 minutos e a eles adicionado 1 µl (200 unidades) de M-MLV transcriptase reversa. Após ressuspensão branda, o conteúdo do tubo foi incubado por 50 minutos a 37 °C, seguido pela inativação da reação por aquecimento a 70 °C por 15 minutos. A amostra foi armazenada em freezer -80 °C para posterior utilização.

3.2.5 A reação em cadeia de polimerase pelo método quantitativo (qPCR)

Foi utilizado o Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG (Life Technologies), uma mistura de todos os componentes necessários para a detecção e amplificação do DNA através do método do PCR quantitativo em tempo real. A reação foi preparada para um volume final de 25 µl adicionando-se 12,5 µl do Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG; 0,5 µl dos primers (Forward e Reverse) a 10 µM de *WWOX*, *FHIT*, *TP73* e *β-actina* (Tabela 2); 0,5 µl ROX Reference Dye; 1 µl de cDNA previamente sintetizado; 0,5 µl de MgCl₂, e por último água DEPC (Invitrogen) para completar o volume final de 25 µl. Após breve centrifugação, a solução foi submetida à seguinte sequência de temperaturas: 50 °C por 2 minutos, 95 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 95 °C de 15 segundos, 60 °C por 30 segundos. Os resultados foram analisados de acordo com os valores obtidos durante a reação de amplificação. Os dados foram analisados através do método da determinação da variação do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e quanto à variação da expressão de cada gene, em termos de vezes em relação ao calibrador.

A análise estatística foi realizada com Graphpad Instat - versão 3.0. Os resultados foram analisados através de ANOVA One-way, seguido do teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. Os resultados com valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

Tabela 2 - Sequências de primers usados para a reação de qPCR

Primer	Nome da Sequência	Sequência 5'- 3'
Forward	<i>WWOX</i>	TCGCAGCTGGTGGGTGTAC
Reverse	<i>WWOX</i>	AGCTCCCTGTTGCATGGACTT
Forward	<i>FHIT</i>	AAGCCGGACAGACTGTGAAG
Reverse	<i>FHIT</i>	GCAGGAAAGTCCTCCTTGTC
Forward	<i>TP73</i>	CCAGCCAGATGTCCAAGGAA
Reverse	<i>TP73</i>	CGGCGAAGTCTCAACTCTGT
Forward	<i>β-Actina</i>	GATGAGATTGGCATGGCTTT
Reverse	<i>β-Actina</i>	CACCTTCACCGTTCCAGTTT

3.3 Análise funcional através da quantificação da secreção de esteroides no meio de cultura

Após 24 horas do plaqueamento de $0,5 \times 10^5$ células por poço em uma placa de 24 poços, o meio de cultura foi trocado e as células foram tratadas ou não com ACTH (10^{-9} M), Forskolina (10^{-9} M) e ACTH (10^{-7} M), segundo o esquema apresentado na Figura 4. Os meios de cultura foram coletados após 24, 48 ou 72 horas de tratamento sustentado e congelados a -80 °C até o momento da extração dos esteroides. Os hormônios secretados no meio de cultura foram extraídos como previamente descritos em Hecker e colaboradores (2006). Para a extração do cortisol foram utilizados 500 µl da amostra, cujo pH foi alterado para 1,5-2,0 com 3 M HCl. Foi adicionada à amostra 2 ml de diclorometano e, após obtenção da fase de separação através da centrifugação por 10 minutos a 2.000 rpm, a parte inferior foi retirada e transferida para outro tubo para evaporação do solvente. Esse processo foi repetido três vezes. Para a extração da testosterona foi adicionado aos 500 µl da amostra 2,5 ml de éter etílico, sem alteração prévia do pH. Após obtenção da fase de separação com centrifugação por 10 minutos a 2.000 rpm, a parte superior foi retirada e transferida para outro tubo para evaporação do solvente. O processo foi repetido duas vezes. Em seguida as amostras foram liofilizadas em um Seed Vac com aquecimento a 30 °C em 3 etapas de 15-30 minutos. Posteriormente, elas foram dissolvidas em 500 µl de um tampão fornecido pelo kit da Cayman Chemical Company. Os hormônios das amostras foram quantificados pelo método de Elisa competitivo em placas de 96 poços (testosterone #Cat 582701; cortisol #Cat 500360), seguindo as recomendações do fabricante (Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI). As placas foram analisadas em espectrofotômetro com comprimento de onda de 420 nm, e os dados foram analisados através de uma planilha oferecida pelo fabricante no endereço:

<http://www.caymanchem.com/app/template/analysis,EIA.vm/promo/analysis.eia>

Figura 4 - Modelo experimental utilizado para quantificação de esteroides no meio de cultura.

3.4 Análise estatística dos resultados obtidos

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando Graphpad InStat - versão 3.0 e Graphpad Prism - versão 6.0. Os resultados dispostos por média $\pm$ SEM foram analisados através de ANOVA Two-way, seguido do teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls ou Tukey. Os resultados com valores $p < 0,05$ foram considerados significantes.

4 RESULTADOS

4.1 Análise da expressão gênica através do PCR array.

A análise da expressão dos genes diferencialmente expressos foi realizada em 14 culturas de células adrenocorticais, sendo duas linhagens de carcinomas adrenocorticais (H295R e SW-13), três de células de carcinoma primário (T20, T53 e T83), duas recidivas (T24 e T36), uma metástase subpleural de carcinoma adrenocortical (T43), uma neoplasia (T19), um adenoma (ACC), uma hiperplasia nodular (T16) e três culturas de células de tumores pediátricos, sendo um deles clinicamente considerado carcinoma (T105) e dois adenomas (T7 e T47). Essa análise considerou diferencialmente expresso aqueles genes três vezes mais ou menos expressos em relação a um pool de adrenais normais. Os resultados estão apresentados em gráficos de dispersão na Figura 15 do Apêndice B, e em número de genes mais ou menos expressos na Tabela 3. Segundo essa tabela, tanto as linhagens de carcinomas, quanto as culturas de células obtidas apresentaram em média $43,1 \pm 7,0$ genes diferencialmente expressos. Em média, $10,8 \pm 2,3$ genes foram mais expressos e $32,3 \pm 7,1$ foram menos expressos que a adrenal normal, portanto, de uma maneira geral foi maior o número de genes reprimidos do que mais expressos.

Tabela 3 - Expressão gênica diferencial das culturas de células em relação ao pool de adrenais normais.

CULTURAS	DIAGNÓSTICOS	TOTAL DE GENES EXPRESSOS	MAIS EXPRESSOS (≥ 3)	MENOS EXPRESSOS (≤ 3)
NCI-H295R	Linhagem	37	8	29
SW-13	Linhagem	40	12	28
T83	Carcinoma	35	14	21
T53	Carcinoma	44	12	32
T20	Carcinoma	33	11	22
T36	Recidiva	45	8	37
T24	Recidiva	40	14	26
T43	Metástase	54	14	40
T19	Neoplasia	55	11	44
T25	Adenoma	52	12	40
T16	Hiperplasia Nodular	47	8	39
T105	Pediátrico-Clinicamente maligno	38	8	30
T7	Pediátrico-Clinicamente benigno	45	10	35

A análise dos oncogenes e genes supressores de tumor, apresentados respectivamente nas Tabelas C.1 e C.2 do Apêndice C, não mostrou um padrão de expressão que diferenciasse as culturas em função dos diagnósticos dos tumores. Foram selecionados dentre os oncogenes aqueles genes que estavam com alta expressão e dentre os supressores de tumor aqueles que estavam menos expressos, apresentados na Tabela 4. Dentre os oncogenes, os que apresentaram expressão aumentada em aproximadamente 71% das culturas estudadas foram os genes *KITLG* (ligante de KIT), *MET* (receptor do fator de crescimento hepatocítico), *PIK3CA* (fosfatidilinositol 3 quinase-subunidade alfa) e *RUNX1* (fator de transcrição relacionado a Runt), enquanto que os genes *KIT* (v-kit homólogo de sarcoma felino) e *ROS1* (C-ros oncogene 1, receptor tyrosina quinase) apresentaram um aumento de expressão em 37,7% das culturas testadas. Já os genes *BCL2L1* (Semelhante ao BCL-2 tipo 1), *CASP8* (Caspase 8), *CDK4* (Ciclina dependente de quinase 4), *ELK1* (ELK1, membro da família de oncogenes ETS), *ETS1* (Oncogene E26 1), *HGF* (Fator de crescimento hepatocítico), *JAK2* (Janus Quinase 2), *JUNB* (Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 B), *JUND* (Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 D), *MOS* (v-mos do sarcoma murino de Moloney homólogo do oncogene viral), *NFKBIA* (Inibidor de fator nuclear do gene enhancer do polipeptídeo leve Kappa nas células-B 1, Alfa), *NRAS* (Oncogene homólogo de neuroblastoma RAS viral (v-ras)), *PML* (Leucemia promielocítica), *PRKCA* (Proteína quinase C, Alfa), *RARA* (Receptor ácido retinóico, Alfa), *REL* (Oncogene homólogo viral v-rel reticuloendoteliose viral (Aviário), *SRC* (Oncogene homólogo viral v-src), *STAT3* (Transdutor de sinal e ativação de transcrição 3), *ZHX2* (Zinc fingers e homeoboxes 2) apresentaram expressão negativa ou nula na totalidade das culturas estudadas, mostrando que esses oncogenes podem estar inibidos nessas culturas. Os oncogenes *KIT*, *KITLG*, *MET*, *MYB*, *PIK3CA*, *ROS1* e *RUNX1* foram os que apresentaram a maior expressão nas culturas de células de tumores adrenocorticais estudadas, o que sugere uma possível participação e, portanto, importância desses genes no processo tumorigênico adrenocortical.

Dentre os genes supressores de tumor que apresentaram a expressão reprimida em aproximadamente 83% das culturas de células analisadas estão os genes *FHIT* (Gene "Fragile histidine triad"), *FOXD3* (Forkhead caixa-D3), *HIC*

(Hipermetilado em câncer 1), *MEN1* (Múltiplas neoplasias endócrinas 1), *RUNX3* (Fator de transcrição 3 relacionado com Runt 3) e *WWOX* (WW domínio contendo óxido redutase). Em aproximadamente 51% das culturas os genes supressores de tumor inibidos foram os genes *ATM* (gene com mutação na ataxia telangiectasia), *STK11* (Serina/treonina quinase 11), *TP73* (Proteína p73), *TSC1* (Esclerose tuberosa 1) e *XRCC1* (gene de reparo em células de hamster chinês 1).

Tabela 4 - Seleção de genes quanto a sua expressão

GENES	GRUPOS	NCI-H295R	SW-13	T83-ACC	T53-ACC	T20-ACC	T36-REC	T24-REC	T43-MET	T19-NEO	T25-ACA	T16-HN	T105-ACC(P)	T7-ACA(P)	T47-ACA(P)
<i>KIT</i>	ONCOGENE	-9,3	-31,6	-	3,4	-	-	10,2	-	3,0	-	-	-	3,7	9,3
<i>KITLG</i>	ONCOGENE	4,3	19,2	5,7	-	3,7	8,3	5,4	8,5	-	5,4	3,3	10,8	-	5,1
<i>MET</i>	ONCOGENE	-	-	15,9	5,1	10,7	11,3	6,7	11,6	6,1	7,4	-	-	7,1	20,3
<i>MYB</i>	ONCOGENE	93,6	33,5	6,5	9,3	-	19,8	-	28,3	26,6	27,3	24,3	-	3,8	-
<i>PIK3CA</i>	ONCOGENE	-	5,5	7,3	3,9	6,3	3,3	7,1	10,4	3,7	4,7	-	3,9	-	4,1
<i>ROS1</i>	ONCOGENE	-	-	4,5	6,0	-	-	-	11,8	-	3,2	3,8	-	-	-
<i>RUNX1</i>	ONCOGENE	-	-111,0	7,1	3,4	13,6	4,2	5,8	3,6	-	-	-	5,4	3,1	5,0
<i>FHIT</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-9,4	-2126,1	-144,6	-12,5	-254,9	-6,8	-33,5	-45,5	-18,2	-23,4	-59,1	-4,7	-160,5	-188,2
<i>FOXD3</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-3,9	-	-5,3	-	-11,2	-9,9	-4,5	-	-9,7	-3,7	-3,2	-	-16,5	-8,9
<i>HIC1</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-71,1	-39,5	-	-9,2	-	-41,0	-	-6,1	-12,5	-6,3	-6,0	-4,7	-	-
<i>MEN1</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-	-	-	-12,0	-	-3,1	-4,2	-31,3	-13,7	-12,8	-13,2	-4,5	-4,8	-4,1
<i>RUNX3</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-29,1	8,0	-6,4	-3,4	-76,3	-50,8	-23,2	-5,1	-50,0	-5,9	-16,2	-	-31,7	-94,7
<i>STK11</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-	-	-	-3,6	-	-	-4,6	-6,1	-10,6	-8,6	-15,0	-4,2	-9,9	-3,5
<i>TP73</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-3,9	-	-	-	-8,4	-	-	-	-7,6	-3,0	-	-	-13,6	-6,9
<i>TSC1</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-	-3,6	-	-3,5	-	-	-	-3,0	-3,6	-5,2	-6,1	-	-5,0	-3,9
<i>WWOX</i>	SUPRESSOR DE TUMOR	-	-3,0	-7,4	-5,5	-11,9	-9,6	-7,2	-11,4	-10,4	-14,3	-19,4	-9,9	-19,6	-12,3

Após a seleção dos oncogenes e dos genes supressores de tumor, foi realizada uma simulação, utilizando o programa apresentado em materiais e métodos, que levou em consideração a interação entre os genes, conforme apresentado nos esquemas da Figura 5-A e 5-B. A análise da Figura 5-A mostra que há interação física entre os genes *WWOX* e *TP73*, *RUNX3* e *RUNX1* e entre *KITLG* e *KIT*. Além disso, o gene *PIK3CA* pode sofrer modificações químicas pela interação com os genes *KIT* e *MET*. O gene *RUNX3* regula negativamente *RUNX 1* e *RUNX 1* está relacionado com *MYB* através de uma expressão conjunta.

Na Figura 5-B, foi realizada uma análise levando em conta informações relativas à glândula adrenal disponibilizadas pelo programa, que mostrou diferentes formas de interações fisiológicas e patológicas entre os genes supressores de tumor *WWOX*, *FHIT*, *TSC1*, *MEN1* e o oncogene *RUNX1*.

Figura 5 - Esquemas representativos das interações entre genes selecionados dos grupos de oncogenes e supressores de tumor (A e B). A-Interações entre oncogenes e supressores de tumor selecionados; B-Interações de oncogenes e supressores de tumor com genes anteriormente descritos em tumores adrenocorticais.

Dentre os genes mais estudados como marcadores de tumor, os genes supressores de tumor são aqueles que apresentam estudos ainda incipientes. Devido à constatação de que os genes *FHIT* e *WWOX* estão inibidos em quase todas as culturas estudadas, e que há uma interação física entre eles e com o gene *TP73* da família do gene *TP53* (Figura 6), os genes *FHIT*, *WWOX* e *TP73* foram validados nas culturas estudadas.

Figura 6 - Esquema representativo com interações através das publicações relacionadas entre supressores de tumor *WWOX*, *TP73*, *FHIT* e *MEN1* com genes anteriormente descritos (*TP53* e *CTNNB1*) em tumores adrenocorticais.

4.2 Análise da expressão gênica por qPCR para validação da expressão dos genes *WWOX*, *FHIT* e *TP73*.

Um pool de adrenais normais foi usado como calibrador da reação para validação dos genes *WWOX*, *FHIT* e *TP73*. Para esta análise foi utilizada uma cultura proveniente de um carcinoma adrenocortical (T83-ACC), uma cultura de recidiva de carcinoma (T36-REC), uma metástase de carcinoma adrenocortical (T43-MET), uma cultura de adenoma (T25-ACA) e uma cultura proveniente de um tumor pediátrico clinicamente benigno (T7-ACA(P)).

A Figura 7 mostra a expressão relativa do gene *WWOX* nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P). A expressão relativa ao pool de adrenais normais foi de respectivamente, $0,1534 \pm 0,0333$; $0,5469 \pm 0,0651$; $0,0859 \pm 0,0528$; $0,2834 \pm 0,0890$; $0,0990 \pm 0,0684$ ($p < 0,001$), de acordo com os resultados obtidos por PCR Array, que pode ser visualizado na Tabela C.2 - Apêndice C.

Figura 7 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene *WWOX* nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001.

Em relação à expressão do gene *FHIT* (Figura 8), os resultados mostraram que as culturas T83-ACC ($0,0130 \pm 0,0035$), T36-REC ($0,1634 \pm 0,0498$), T43-MET ($0,0041 \pm 0,0029$), T25-ACA ($0,0082 \pm 0,0037$), T7-ACA(P) ($0,0026 \pm 0,0009$) apresentaram níveis baixos de expressão em relação ao pool de adrenais normais ($p < 0,001$), sendo coerentes com os resultados obtidos por PCR Array (Tabela C.2 - Apêndice C).

Figura 8 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene *FHIT* nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001.

Na Figura 9 observamos a expressão do gene *TP73* (Figura 9), cujos níveis de expressão foram de $0,1112 \pm 0,0206$; $0,1168 \pm 0,1005$; $0,0699 \pm 0,0252$; $0,1379 \pm 0,1175$, respectivamente nas culturas de células T83-ACC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P), em relação ao pool de adrenal normal ($p < 0,01$). No entanto, a cultura de células T36-REC apresentou níveis superiores de expressão ($1,9683 \pm 0,5995$; $p < 0,001$) em relação à adrenal normal e às demais culturas estudadas. Todos esses dados estão de acordo com o observado na análise por PCR Array (Tabela C.2, Apêndice), inclusive as células T-36-REC, pois se encontra dentro da faixa de expressão ± 3 vezes em relação ao controle.

Figura 9 - Resultado de expressão relativa por PCR em tempo real do gene TP73 nas culturas T83-ACC, T36-REC, T43-MET, T25-ACA, T7-ACA(P) em relação ao pool de Adrenais normais. n=3. Análise estatística por ANOVA e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. ***p<0,001, **p<0,01.

4.3 Análise das concentrações de esteroides no meio de cultivo celular

Os meios de cultivo foram provenientes das células das culturas T83-ACC, T36-REC e T7-ACA(P), que são provenientes de tumores de pacientes com síndrome de Cushing e virilização. Os meios foram recolhidos de células crescendo exponencialmente, portanto, em meio com 10% SFB e de células que foram estimuladas com 10^{-9} M ou 10^{-7} M de ACTH (hormônio adrenocorticotrófico) ou com 10^{-9} M de Forskolina, que estimula especificamente a via PKA. Esse tratamento foi realizado em 24h, 48h e 72h, portanto, sustentado. Como controle negativo da reação foram analisados os meios de cultura com e sem soro fetal bovino na ausência de células.

4.3.1 Análise da concentração de cortisol nos meios de cultura

A média da concentração de cortisol no meio de cultura com 10% SFB foi de $57,1 \pm 7,6$ pg/ml. A Figura 10 mostra a análise da concentração de cortisol no meio de cultura das células T83-ACC. Os meios de cultura de células crescendo

exponencialmente apresentaram uma concentração de cortisol de $69,2 \pm 6,2$; $89,9 \pm 4,1$ e $77,5 \pm 3,6$ pg/ml, respectivamente em 24h, 48h e 72h de cultura. As células estimuladas com ACTH 10^{-9} M secretaram no meio de cultura, $77,4 \pm 3,5$; $92,6 \pm 4,9$ e $129,2 \pm 6,5$ pg/ml de cortisol, respectivamente após 24h, 48h e 72h de tratamento. Após 24h e 48h de tratamento com ACTH 10^{-9} M, não houve diferença significativa entre as células crescendo exponencialmente e as tratadas com ACTH 10^{-9} M. No entanto, após 72h de tratamento com ACTH 10^{-9} M, as células apresentaram: um aumento significativo ($p \leq 0,001$) de 40% da produção de cortisol em relação às células tratadas com ACTH 10^{-9} M em 24h; um aumento de 28% da produção em 48h e 40% da produção de cortisol das células crescendo exponencialmente em 72h.

Figura 10 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T83-ACC. Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M e sem tratamento. $n=3$. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. *** $p < 0,001$.

A análise da capacidade de produção de cortisol das células T36-REC, através da quantificação do meio de cultura de células tratadas e não tratadas, (Figura 11) mostrou que essas células crescendo exponencialmente apresentaram $89,9 \pm 3,1$; $135,9 \pm 7,3$ e $198,3 \pm 24,9$ pg/ml de cortisol após 24h, 48h e 72h em cultura. Os meios de cultura com células estimuladas com ACTH 10^{-9} M apresentaram no mesmo período, respectivamente $122,2 \pm 9,8$; $127,8 \pm 17,2$ e $179,1 \pm 17,8$ pg/ml de cortisol, e com Forskolina 10^{-9} M $138,8 \pm 7,3$ pg/ml; $150,0 \pm 3,8$ pg/ml e $149,4 \pm 9,4$

pg/ml. Em 24h houve um aumento significativo de 35% da produção de cortisol nas células tratadas com ACTH⁻⁹ M em relação ao controle. Em 48h não houve diferença significativa, porém, com 72h houve uma inibição de 17% da produção nas células tratadas com Forskolina 10⁻⁹ M em relação às células crescendo exponencialmente.

Figura 11 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T36-ACC. Tratamento sustentado com ACTH 10⁻⁹ M, Forskolina 10⁻⁹ M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Tukey. *p<0,05.

Para a análise do meio de cultura de células do tumor pediátrico, T7-ACA(P) (Figura 12) foram utilizadas células não tratadas e tratadas com 10⁻⁹ M ACTH. As células não tratadas apresentaram uma média de 119,4±6,7; 187,2±31,7 e 147,0±10,8 pg/ml de cortisol em, respectivamente, 24h, 48h e 72h em cultura. As células estimuladas com ACTH 10⁻⁹ M secretaram no meio de cultura 118,3±2,8 pg/ml; 112,8±5,6 pg/ml e 141,6±9,6 pg/ml de cortisol após, 24, 48 e 72h, respectivamente. Os resultados mostraram em 48h uma inibição significativa (p<0,05) de 40% da produção de cortisol nas células tratadas em relação às células crescendo exponencialmente no mesmo período.

Figura 12 - Quantificação de cortisol no meio de cultura de células T7-ACA(P). Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M e sem tratamento. $n=3$. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. $*p<0,05$.

4.3.2 Análise da concentração de testosterona nos meios de cultura

A análise da concentração de testosterona no meio de cultura com 10% de SFB foi em média $15,0 \pm 3,2$ pg/ml. A análise do meio de cultura das células T36-REC (Figura 13) mostra que as células crescendo exponencialmente, apresentaram uma média de $6,5 \pm 1,2$; $11,3 \pm 1,5$ e $18,1 \pm 3,3$ pg/ml de testosterona em 24h, 48h e 72h de cultura. As células estimuladas com ACTH 10^{-9} M secretaram no meio de cultura neste período respectivamente, $6,5 \pm 0,7$; $5,4 \pm 0,8$ e $6,7 \pm 2,5$ de testosterona. As células tratadas com Forskolina 10^{-9} M apresentaram em 24h, 48h e 72h as concentrações de $5,5 \pm 1,8$; $5,5 \pm 1,8$ e $7,2 \pm 0,4$ pg/ml, respectivamente. As células tratadas com ACTH 10^{-7} M apresentaram nos mesmos tempos $5,7 \pm 1,2$; $7,1 \pm 1,6$ e $2,9 \pm 0,8$. Não houve diferença estatística na concentração de testosterona em 24h e 48h em células tratadas e não tratadas. Em 72h houve uma inibição significativa na produção de testosterona de 63%, 60% e 84% de concentração respectivamente nas células tratadas com ACTH 10^{-9} M ($p<0,05$), Forskolina 10^{-9} M ($p<0,05$) e ACTH 10^{-7} M ($p<0,01$) em relação às células crescendo exponencialmente.

Figura 13 - Quantificação de testosterona no meio de cultura de células T36-REC. Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M, Forskolina 10^{-9} M, ACTH 10^{-7} M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. **p<0,01, *p<0,05.

A análise da concentração de testosterona no meio de cultivo das células T7-ACA(P) tratadas com ACTH 10^{-9} M, Forskolina 10^{-9} M e não tratadas foram mostradas na Figura 14. As células não tratadas apresentaram em 24h, 48h e 72h respectivamente, uma média de $13,9 \pm 1,4$; $17,7 \pm 1,7$ e $25,2 \pm 3,9$ pg/ml de testosterona no meio de cultura. As células estimuladas com ACTH 10^{-9} M secretaram no meio de cultura $14,4 \pm 3,3$; $12,7 \pm 1,6$ e $12,3 \pm 1,2$ pg/ml de testosterona em 24h, 48h e 72h. As células quando tratadas com Forskolina 10^{-9} M apresentaram em 24h uma concentração de $16,7 \pm 1,0$ pg/ml, em 48h $13,5 \pm 0,6$ pg/ml e em 72h uma concentração de $14,8 \pm 0,3$ pg/ml do esteroide. Não houve diferença estatística nos resultados de 24h e 48h. No entanto, com 72 horas, foi possível verificar uma inibição significativa ($p < 0,01$) de 51% na produção de cortisol nas células tratadas com 10^{-9} M ACTH em relação às células crescendo exponencialmente e 41% de redução na produção de cortisol nas células tratadas com Forskolina 10^{-9} M ($p < 0,01$), em relação às crescendo exponencialmente.

Figura 14 - Quantificação de testosterona no meio de cultura de células T7-ACA(P). Tratamento sustentado com ACTH 10^{-9} M, Forskolina 10^{-9} M e sem tratamento. n=3. Análise estatística por ANOVA Two-way e o teste de comparações múltiplas Student-Newman-Keuls. **p<0,01.

5 DISCUSSÃO

Nesse trabalho identificamos oncogenes e genes supressores de tumor em culturas de células de tumores adrenais de pacientes com características anatomopatológicas diferentes que podem estar relacionados com o processo tumorigênico nessa glândula. Dentre vários genes estudados identificamos baixos níveis de expressão dos genes supressores de tumor *WWOX*, *FHIT* e *TP73*, que por terem uma provável interação, podem ser importantes na tumorigênese adrenocortical. Além disso, analisamos a capacidade dessas culturas celulares de produzir e secretar esteroides, cortisol e testosterona, no meio de cultivo. Mostramos que as células estudadas mantêm a capacidade de produzir e secretar cortisol após diferentes estímulos, mas não testosterona que foi inibida após tratamentos com ACTH e Forskolina.

Foi utilizada uma plataforma com genes pré-selecionados (PCR Array) envolvidos com apoptose, ciclo celular, transição epitelial mesenquimal, angiogênese, adesão celular e fatores de transcrição relacionados em diversas etapas de processos tumorigênicos. Essa análise não foi capaz de mostrar um padrão de expressão que separasse as culturas de células obtidas em função das análises anatomopatológicas dos tumores. Dos oncogenes e supressores de tumor analisados, 7 oncogenes, até então não descritos como oncogenes nesses tumores, apresentaram níveis de expressão aumentado independente se carcinoma ou adenoma. Nove supressores de tumor foram detectados com níveis de expressão baixos cuja análise complementar de interações selecionou os genes *WWOX*, *FHIT* e *TP73*.

O gene *WWOX*, WW domínio contendo oxidoredutase, localizado no cromossomo 16q23, abrange o sítio frágil FRA16D e codifica a proteína *WWOX*, que possui dois domínios WW N-terminal e um domínio de cadeia curta desidrogenase / redutase (SDR). Os domínios WW são geralmente conhecidos por participar da interação proteína-proteína (Ilsley et al., 2002), e estão associado com vias de sinalização envolvidas na regulação da transcrição e na estabilidade de proteínas. A proteína *WWOX* está expressa em tecidos normais que são regulados por hormônios como o testículo, próstata e ovários, o que sugere seu envolvimento com o metabolismo de esteroides (Bednarek et al., 2000). Em outro estudo, que utilizou animais nocaute condicionais do gene *WWOX* descreveu anormalidades nas gônadas, como incapacidade de

desenvolvimento de células de Leydig em testículos e redução da proliferação de células da teca no ovário. Camundongos WWOX^{-/-} mostraram redução de CYP11A1, CYP17A1 e 3 β -hidroxiesteroide desidrogenase e redução dos níveis de testosterona das células de Leydig, além de problemas na próstata (Aqeilan et al., 2007). Portanto, WWOX é considerado essencial para o desenvolvimento e função das gônadas (Li et al., 2014). Este gene tem sido descrito por não estar expresso ou apresentar transcritos aberrantes em diversas linhagens de células tumorais de diferentes origens, como MCF-7, HELA, linhagens de ovário, colon entre outros (Paige et al., 2001). Apresenta perda de heterozigosidade (LOH) em tumores de fígado (Yakicier et al., 2001), esôfago (Kuroki et al., 2002), pulmão (Yendamuri et al., 2003), pâncreas (Kuroki et al., 2004), estômago (Aqeilan et al., 2004) e em metástases de mama (Driouch et al., 1997). WWOX pode ter como parceiros o p73 (Aqeilan et al. 2004), JUN (Gaudio et al. 2006), p53 (Chang et al., 2001) e β -catenina (Bouteille et al., 2009). A atividade de JUN afeta vários processos celulares, como ciclo celular, crescimento celular e apoptose (Shaulin et al., 2002), promove também a transcrição de muitos genes durante a transformação do câncer (Vogt., 2001), Gaudio et al. 2006 sugere que a ação do oncogene c-JUN é suprimida pela interação com WWOX. A parceria com p53 foi descrita com murinos sugerindo que a ligação de WOX1 com p53 é essencial para a atividade indutora de apoptose de p53 (Chang et al., 2001). Outro trabalho descreve que WWOX pode inibir a atividade de Wnt/ via β -catenina, fator que está envolvido em diversos processos celulares que pode afetar a morfogênese, diferenciação, proliferação e apoptose (Bouteille et al., 2009). Não há evidência de WWOX relacionado com tumores adrenocorticais na literatura e nossos resultados se mostram semelhantes aos obtidos em cultura *in vitro* de outros tecidos, portanto, o estudo deste gene precisa ser ampliado principalmente devido à sua relação com genes β -catenina e p53, descritos como importantes na tumorigenese adrenocortical.

O gene *FHIT*, tríade de histidina frágil, está localizado no cromossomo 3p14.2, que abrange o sítio frágil FRA3B. Pertence à superfamília Tríade Histidina (HIT) de hidrolases de nucleotídeos e transferases. Todos os membros da família compartilham a sequência HxHxHxx, aonde x é um aminoácido hidrofóbico (Brenner, 2002), e participam da regulação do ciclo celular e apoptose (Roz et al.,

2002; Sard et al., 1999). Foi descrito por atuar como um supressor de tumor, agindo diretamente na atividade de β -catenina regulando negativamente a transcrição de genes alvo (Weiske et al., 2007). Pode atuar como supressor da via NF- κ B (Nakagawa et al., 2006), é alvo de componentes da via Ras / Rho GTPase (Jayachandran et al., 2007) e de fosforilação Src o que sugere um ganho de função na apoptose (Pekarsky et al., 2004). Pode também modular a expressão da via PI3K Akt-survivina (Semba et al., 2006), relacionado-o com a sobrevivência celular.

Os sítios frágeis FRA3B e FRA16D, residem dentro dos genes *FHIT* e *WWOX*, e rearranjos genômicos e deleções nesses sítios são frequentes em células tumorais, cuja consequência é a redução ou perda de expressão das proteínas FHIT e WWOX. Foi sugerido que *FHIT* é o gene mais frequentemente alterado no câncer, competindo com o gene *TP53* (Saldivar et al., 2010). Estudos de expressão gênica mostraram eliminação ou perda de transcrição na maioria dos tumores malignos humanos como de pulmão, cabeça e pescoço, estômago, do esôfago, colo de útero e mama (Baffa et al., 1998; Campiglio et al., 1999; Druck et al., 1997; Hendricks et al. 1997; Sozzi et al, 1997; Virgilio et al. 1996). Em um estudo histológico de tumores adrenocorticais de pacientes com hipercortisolismo, este fator foi analisado através de imuno-histoquímica e apresentou marcação negativa em carcinomas adrenocorticais, e marcação que está entre negativa, fracamente positiva e fortemente positiva em adenomas adrenocorticais. Este fator foi sugerido em conjunto com Ki-67 e PCNA como possível marcador para diagnosticar as diferentes doenças da síndrome de Cushing (Yang et al., 2008). Diferente do trabalho acima, este trabalho analisou a expressão gênica de culturas *in vitro*, que apresentou o mesmo resultado negativo para carcinomas adrenocorticais. Portanto, análises futuras da expressão proteica nas culturas de adenomas e carcinomas precisam ser realizadas além de testes funcionais para confirmação desse gene como provável marcador desse tipo de tumor.

O gene *TP73*, localizado na região 1p36.33, codifica a proteína p73 pertencente à família p53. Este fator é um homólogo estrutural e funcional da proteína supressora de tumor p53. Está envolvido na regulação do crescimento de células, induz parada no ciclo celular e desencadeia a apoptose celular

(Kaghad et al., 1997). Apesar das funções supressoras tumorais comprovadas do p73, diferentes análises de sequenciamento de tumores de pacientes não evidenciaram alterações genéticas como uma causa comum no câncer humano (DeYoung, Ellisen, 2007; Moll, Slade, 2004; Oswald, Stiwe, 2008). Portanto, mutações desse gene em câncer não é um achado comum (Melino et al., 2002). Por outro lado, a análise comparativa de hibridação genômica em tumores adrenocorticais mostrou que a região que abrange o gene *TP73* está suprimida em 5 de 13 tumores malignos, no entanto nesse estudo não foi realizada a análise da incidência de mutações nesse gene (Sidhu et al., 2002). Os resultados apresentados estão de acordo com a literatura pois nem todas as culturas de células de tumores analisados apresentam baixa expressão do gene *TP73*, e deve ser investigado quanto à prováveis mutações.

Com relação a interação destes fatores, WWOX e p73 interagem fisicamente, primeiramente a tirosina cinase (SRC), fosforila WWOX no primeiro domínio WW aumentando sua ligação com p73, quando isso ocorre aumenta a expressão de p73 desencadeando a redistribuição de p73 nuclear para o citoplasma, resultando em apoptose de células (Aqeilan et al., 2004). Dentro dos resultados obtidos, apenas a recidiva de carcinoma T36-REC apresentou expressão maior de TP73, e que precisa ser confirmado através da utilização de outras metodologias.

WWOX pode cooperar com FHIT e p73 no desenvolvimento de tumores (Chen et al., 2013). A redução dos genes *WWOX* e *FHIT*, ambos localizados em sítios frágeis, é um passo importante na tumorigenese da mama, pulmão, esôfago, rins e colo do útero (Chen et al., 2013). Nossos resultados mostram ambos reduzidos nas culturas de células de tumores adrenocorticais, sugerindo que a exemplo do que foi descrito em outros tumores, esses fatores e suas interações possam ser importantes na tumorigênese do córtex adrenal.

O córtex da glândula adrenal sintetiza e secreta hormônios esteroides de acordo com a zona (glomerulosa, fasciculada e reticulada) e a presença de enzimas esteroideogênicas. A expressão diferencial destas enzimas nas três zonas morfológica e bioquimicamente distintas do córtex adrenal permite a síntese dos diferentes hormônios esteroides existentes (Rainey et al., 2004). O estudo destes processos até o produto final pode ser realizado por células isoladas

através de cultura primária. Para isso, é necessário o sacrifício de animais ou a aquisição contínua de tecido humano, além do fato de que a utilização desta cultura deve ser feita em um período de tempo limitado (Rainey et al., 2004). Desta forma, devido à complexidade do córtex adrenal, modelos *in vitro* trazem benefícios para o estudo de glândulas adrenais (Rainey et al., 2004).

A linhagem de tumor adrenocortical de camundongo Y1 (Yasumura et al., 1966) não responde ao ACTH para a produção de corticosterona, mas produz outros hormônios 20 α -dihidroxiprogesterona e 11 β , 20 α -dihidroxiprogesterona (Kowal, Fiedler, 1968; Pierson, 1967). Foi visto também um perfil anormal de produção esteroide pela deficiência na enzima 21-hidroxilase (CYP21) (Parker et al., 1985). A linhagem de carcinoma adrenocortical humana, NCI-H295 foi descrita por produzir mineralocorticoides, glicocorticoides e hormônios sexuais e por ter número baixos de receptores MC2R responde mal ao ACTH (Gazdar et al., 1990; Rainey et al., 1994; Staels et al., 1993). No entanto, um clone obtido dessa linhagem, células NCI-H295R responde à AngII, K⁺ e ACTH e tem capacidade de produzir mineralocorticoides, glicocorticoides e hormônios sexuais (Bird et al., 1993; Bird et al., 1995; Rainey et al., 1994). A capacidade destas células de produzir hormônios esteroides fornece um modelo útil para estudar os processos envolvidos na diferenciação adrenocortical, assim como a expressão de enzimas esteroidogênicas. No entanto, a dependência de apenas um modelo como uma fonte de estudos é uma limitação, o que exige o desenvolvimento de culturas adicionais (Wang, Rainey 2012). As culturas SW-13, L-251, ACT-1, também existentes não produzem esteróides e não respondem ao ACTH, K⁺ ou AngII (Leibovitz et al., 1973; Schteingart et al., 2001; Ueno et al., 2001).

As culturas de tumores utilizadas neste trabalho possuem como quadro clínico, Síndrome de Cushing e Virilização. A síndrome de Cushing é o quadro clínico mais comum em pacientes adultos com câncer de adrenal, que entre outras manifestações clínicas, apresentam excesso de cortisol. Frequentemente a virilização acompanha a síndrome de Cushing tornando as manifestações clínicas predominantes, provenientes do excesso de andrógenos. A virilização apresenta altos níveis séricos de testosterona (Schteingart, 2000). Foi descrito que uma característica comum nestas síndromes é a ativação anormal da proteína quinase A (PKA) e sua via de sinalização (de Jossineau et al., 2012). Nas culturas

estudadas somente a produção e secreção de cortisol foram detectados, enquanto a testosterona mostrou baixa concentração nos meios de cultivo, mesmo em culturas de células provenientes de tumores de pacientes que apresentaram quadro de virilização. No entanto, resultados anteriores de caracterização da cultura de adenoma pediátrico T7-ACA(P) mostrou, além da presença das enzimas esteroideogênicas 3- β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II, 11- β -hidroxilase, 21-hidroxilase, a capacidade de produção de cortisol e testosterona (Almeida et al., 2008) por métodos diferentes dos utilizados nesse trabalho.

6 CONCLUSÕES

- A análise da expressão de oncogenes e genes supressores de tumor em 12 culturas de tumores adrenocorticais com diferentes características anatomopatológicas e 2 linhagens, não mostrou um padrão de expressão que diferenciasse as culturas de acordo com os diagnósticos dos tumores.
- Os genes selecionados para validação por qPCR, *WWOX*, *FHIT* e *TP73* confirmaram os resultados obtidos por PCR Array e a provável interação entre esses fatores merecem estudos posteriores.
- O potencial funcional das culturas T83-ACC, T36-REC e T7-ACA(P) foram analisados e podem ser bons modelos para estudo dos mecanismos esteroidogênicos.

REFERÊNCIAS

Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(6):2027-37.

Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonca BB, Latronico AC. 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.

Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, Ressio RA, Nishi MY, Jorge AA, Lerario AM, Alves VA, Mendonca BB, Latronico AC. 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.

Antonini SRR, Colli L.M, Ferro L, Mermejo L, Castro M. Tumores adrenocorticais na criança: da abordagem clínica à avaliação molecular. *Arq Bras Endocrinol Metab.* 2011; 55(8): 599-606.

Aqeilan RI, Pekarsky Y, Herrero JJ, Palamarchuk A, Letofsky J, Druck T, Trapasso F, Han SY, Melino G, Huebner K, Croce CM. Functional association between Wwox tumor suppressor protein and p73, a p53 homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004; 101(13):4401-6.

Aqeilan RI, Trapasso F, Hussain S, Costinean S, Marshall D, Pekarsky Y, Hagan JP, Zanesi N, Kaou M, Stein GS, Lian JB, Croce CM. Targeted deletion of Wwox reveals a tumor suppressor function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(10):3949-54.

Arnaldi G, Boscaro M. Adrenal incidentaloma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2012; 26(4):405-19.

Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, Wemeau JL, Lecomte-Houcke M, Leteurtre E. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002; 26(12):1612-9.

Baffa R, Veronese ML, Santoro R, Mandes B, Palazzo JP, Ruggie M, Santoro E, Croce CM, Huebner K. Loss of FHIT expression in gastric carcinoma. *Cancer.* 1998; 58(20):4708-14.

Bednarek AK, Laflin KJ, Daniel RL, Liao Q, Hawkins KA, Aldaz CM. WWOX, a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1, a region frequently affected in breast cancer. *Cancer Res.* 2000; 60(8):2140-5.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bertherat J. Protein kinase A in Carney complex: a new example of cAMP pathway alteration in endocrine tumors. *Eur J Endocrinol.* 2001; 144(3):209-11.

Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res.* 2003; 63(17):5308-19.

Berthon A, Sahut-Barnola I, Lambert-Langlais S, de Joussineau C, Damon Soubeyrand C, Louiset E, Taketo MM, Tissier F, Bertherat J, Lefrançois-Martinez AM, Martinez A, Val P. Constitutive beta-catenin activation induces adrenal hyperplasia and promotes adrenal cancer development. *Hum Mol Genet.* 2010; 19(8): 1561-76.

Beuschlein F, Reincke M, Karl M, Travis WD, Jaursch-Hancke C, Abdelhamid S, Chrousos GP, Allolio B. Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res.* 1994; Sep 15;54(18):4927-32.

Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur J Endocrinol.* 2001; Mar;144(3):199-206.

Bird IM, Hanley NA, Word RA, Mathis JM, McCarthy JL, Mason JI, Rainey WE. Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. *Endocrinology.* 1993; Oct;133(4):1555-61.

Bornstein SR, Stratakis CA, Chrousos G. Adrenocortical Tumors: Recent Advances in Basic Concepts and Clinical Management. *Ann Intern Med.* 1999; 130(9): 759-71.

Bossis I, Stratakis CA. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology.* 2004; Dec;145(12):5452-8.

Bouteille N, Driouch K, Hage PE, Sin S, Formstecher E, Camonis J, Lidereau R, Lallemand F. Inhibition of the Wnt/beta-catenin pathway by the WWOX tumor suppressor protein. *Oncogene.* 2009; 28(28):2569-80.

Brenner C. Hint, Fhit, and GalT: function, structure, evolution, and mechanism of three branches of the histidine triad superfamily of nucleotide hydrolases and transferases. *Biochemistry.* 2002; Jul 23;41(29):9003-14.

Brito LP, Ribeiro TC, Almeida MQ, Jorge AAL, Soares IC, Latronico AC, Mendonça BB, Fragoso MCBV, Lerario AM. The Role of fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4) overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. *Endocr Relat Cancer.* 2012; May 3;19(3):L11-3.

Cagle PT, Hough AJ, Pysher TJ, Page DL, Johnson EH, Kirkland RT, Holcombe JH, Hawkins EP. Comparison of adrenal cortical tumors in children and adults. *Cancer*. 1986; Jun 1;57(11):2235-7.

Campiglio M, Pekarsky Y, Menard S, Tagliabue E, Pilotti S, Croce CM. FHIT loss of function in human primary breast cancer correlates with advanced stage of the disease. *Cancer Res*. 1999; Aug 15;59(16):3866-9.

Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore)*. 1985; Jul;64(4):270-83.

Chang NS, Pratt N, Heath J, Schultz L, Slevin D, Carey GB, Zevotek N. Hyaluronidase induction of a WW domain-containing oxidoreductase that enhances tumor necrosis factor cytotoxicity. *J Biol Chem*. 2001; Feb 2;276(5):3361-70.

Chen X, Zhang H, Li P, Yang Z, Qin L, Mo W. Gene expression of WWOX, FHIT and p73 in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Lett*. 2013; 6(4):963-969.

de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, Bertherat J, Bertagna X, Plouin PF, Baudin E., Berger F., Gicquel C., Chabre O., Feige JJ. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metabolism*. 2005; 90(3):1819–29.

de Joussineau C, Sahut-Barnola I, Levy I, Saloustros E, Val P, Stratakis CA, Martinez A. The cAMP pathway and the control of adrenocortical development and growth. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; Mar 31;351(1):28-36.

Deyoung MP, Ellisen LW. p63 and p73 in human cancer: defining the network. *Oncogene*. 2007; Aug 9;26(36):5169-83.

Driouch K, Dorion-Bonnet F, Briffod M, Champéme MH, Longy M, Lidereau R. Loss of heterozygosity on chromosome arm 16q in breast cancer metastases. *Genes Chromosomes Cancer*. 1997; Jul;19(3):185-91.

Druck T, Hadaczek P, Fu TB, Ohta M, Siprashvili Z, Baffa R, Negrini M, Kastury K, Veronese ML, Rosen D, Rothstein J, McCue P, Cotticelli MG, Inoue H, Croce CM, Huebner K. Structure and expression of the human FHIT gene in normal and tumor cells. *Cancer Res*. 1997; Feb 1;57(3):504-12.

Durkin SG, Glover TW. Chromosome fragile sites. *Annu Rev Genet*. 2007; 41:169-92.

Fassnacht M, Libé R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*. 2011; 7(6):323-35.

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

Flack MR, Chrousos GP. Neoplasms of adrenal cortex. In: JF Holland, RC Bast Jr, DL Morton, E Frei III, DW Kufe, RR Weichselbaum, Eds. *Cancer Medicine*, 4th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, 1996. v.1, pp 1563–70.

França MM, Ferraz-de-Souza B, Santos MG, Lerario AM, Fragoso MC, Latronico AC, Kuick RD, Hammer GD, Lotfi CF. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013; 22;371(1-2):140-7.

Gaudio E, Palamarchuk A, Palumbo T, Trapasso F, Pekarsky Y, Croce CM, Aqeilan RI. Physical association with WWOX suppresses c-Jun transcriptional activity. *Cancer Res.* 2006; Dec 15;66(24):11585-9.

Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990; 50(17): 5488–96.

Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, Le Bouc Y. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; Jun;78(6):1444-53.

Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, Bertherat J, Chapuis Y, Duclos JM, Schlumberger M, Plouin PF, Luton JP, Le Bouc Y. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2001; 61(18): 6762–7.

Gicquel C, Baudin E, Lebouc Y, Schlumberger M. Adrenocortical carcinoma. *Ann Oncol.* 1997; May;8(5):423-7.

Grumbach MM, Biller BM, Braunstein GD, Campbell KK, Carney JA, Godley PA, Harris EL, Lee JK, Oertel YC, Posner MC, Schlechte JA, Wieand HS. Management of the clinically inapparent adrenal mass (“incidentaloma”). *Ann. Int. Med.* 2003; 138 (5), pp. 424–429.

Hecker M, Newsted JL, Murphy MB, Higley EB, Jones PD, Wu R, Giesy JP. Human adrenocarcinoma (H295R) cells for rapid in vitro determination of effects on steroidogenesis: hormone production. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2006; 217(1):114-24.

Hendricks DT, Taylor R, Reed M, Birrer MJ. FHIT gene expression in human ovarian, endometrial, and cervical cancer cell lines. *Cancer Res.* 1997; Jun 1;57(11):2112-5.

Ilseley JL, Sudol M, Winder SJ. The WW domain: linking cell signalling to the membrane cytoskeleton. *Cell Signal.* 2002; 14(3):183-9.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell.* 1997; Aug 22;90(4):809-19.

Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev.* 1995; 16:460–483.

Kowal J, Fiedler R. Adrenal cells in tissue culture. I. Assay of steroid products; steroidogenic responses to peptide hormones. *Arch. Biochem. Biophys.* 1968; pp. 406–421.

Kuroki T, Trapasso F, Shiraishi T, Alder H, Mimori K, Mori M, Croce CM. Genetic alterations of the tumor suppressor gene WWOX in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2002; Apr 15;62(8):2258-60.

Kuroki T, Yendamuri S, Trapasso F, Matsuyama A, Aqeilan RI, Alder H, Rattan S, Cesari R, Noll ML, Williams NN, Mori M, Kanematsu T, Croce CM. The tumor suppressor gene WWOX at FRA16D is involved in pancreatic carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004; Apr 1;10(7):2459-65.

Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonca BB. 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.

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

Leibovitz A, McCombs WM 3rd, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex. *J Natl Cancer Inst.* 1973; Aug; 51(2): 691-7.

Lerario AM, Moraitis A, Hammer GD. Genetics and epigenetics of adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2014; Apr 5;386(1-2):67-84.

Li J, Liu J, Ren Y, Yang J, Liu P. Common Chromosomal Fragile Site Gene WWOX in Metabolic Disorders and Tumors. *Int J Biol Sci.* 2014; 10(2):142-8.

Libè R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer.* 2007; 14(1):13-28.

Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl.* 1958; Sep;23(3):155-86.

Melino G, De Laurenzi V, Vousden KH. p73: Friend or foe in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2002; 2(8):605-1.

Mermejo L, Leal L, Colli L, Fragoso M, Latronico A, Tone L, Scrideli C, Tucci S, Martinelli C, Yunes J, Mastellaro M, Seidinger A, Brandalise S, Moreira A, Ramalho L, Antonini S, Castro M. Altered expression of noncanonical wnt pathway genes in paediatric and adult adrenocortical tumours. *Clin Endocrinol.* 2014.

Miller WL. Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev.* 1988; 9(3):295-318.

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. *Mol Cancer Res.* 2004; Jul;2(7):371-86.

Nakagawa Y, Akao Y. Fhit protein inhibits cell growth by attenuating the signaling mediated by nuclear factor-kappaB in colon cancer cell lines. *Exp Cell Res.* 2006; 312(13):2433-42.

Nesterova M, Bossis I, Wen F, Horvath A, Matyakhina L, Stratakis CA., An Immortalized Human Cell Line Bearing a PRKAR1A-Inactivating Mutation: Effects of Overexpression of the Wild-Type Allele and Other Protein Kinase A Subunits. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(2): 565–71.

Orth DN, Kovacs WJ. The adrenal cortex. J.D Wilson, D.W Foster, H.M Kronenberg, P.R Larsen (Eds.), *Williams Textbook of Endocrinology* (9th ed.), W.B. Saunders, Philadelphia, 1998; pp. 517–664.

Oswald C, Stiewe T. In good times and bad: p73 in cancer. *Cell Cycle.* 2008; Jun 15;7(12):1726-31.

Paige AJ, Taylor KJ, Taylor C, Hillier SG, Farrington S, Scott D, Porteous DJ, Smyth JF, Gabra H, Watson JE. WWOX: a candidate tumor suppressor gene involved in multiple tumor types. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001; 98(20):11417-22.

Parker KL, Chaplin DD, Wong M, Seidman JG, Smith JA, Schimmer BP. Expression of murine 21-hydroxylase in mouse adrenal glands and in transfected Y1 adrenocortical tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1985; 82(23):7860-4.

Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: A key determinant of endocrine development and function. *Endocr Rev.* 1997; 18: 361-77.

Parmar J, Key RE, Rainey WE. Development of an adrenocorticotropin-responsive human adrenocortical carcinoma cell line. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(11):4542-6.

Pekarsky Y, Garrison PN, Palamarchuk A, Zanesi N, Aqeilan RI, Huebner K, Barnes LD, Croce CM. Fhit is a physiological target of the protein kinase Src. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(11):3775-9.

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

Pierson RWJ. Metabolism of steroid hormones in adrenal cortex tumor cultures. *Endocrinology*, 1967; pp. 693–707.

Ragazzon B., Assié G., Bertherat J. Transcriptome analysis of adrenocortical cancers: from molecular classification to the identification of new treatments. *Endocr Relat Cancer*. 2011; 18(2): R15-27.

Rainey WE, Bird IM, Mason JI. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. *Mol Cell Endocrinol*. 1994; Apr;100(1-2):45-50.

Rainey WE, Saner K, Schimmer BP. Adrenocortical cell lines. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 228(1-2): 23–38.

Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; Sep;82(9):3054-8.

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

Ross NS, Aron DC. Hormonal evaluation of the patient with an incidentally discovered adrenal mass. *N Engl J Med*. 1990; 323(20):1401-5.

Roz L, Gramegna M, Ishii H, Croce CM, Sozzi G. Restoration of fragile histidine triad (FHIT) expression induces apoptosis and suppresses tumorigenicity in lung and cervical cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(6):3615-20.

Saldivar JC, Shibata H, Huebner K. Pathology and biology associated with the fragile FHIT gene and gene product. *J Cell Biochem*. 2010; Apr;109(5):858-6.

Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997; 82(7): 2027-31.

Sard L, Accornero P, Tornielli S, Delia D, Bunone G, Campiglio M, Colombo MP, Gramegna M, Croce CM, Pierotti MA, Sozzi G. The tumor-suppressor gene FHIT is involved in the regulation of apoptosis and in cell cycle control. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(15):8489-92.

Schteingart DE. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. *Braz J Med Biol Res.* 2000; Oct;33(10):1197-200.

Schteingart DE, Giordano TJ, Benitez RS, Burdick MD, Starkman MN, Arenberg DA, Strieter RM. Overexpression of CXC chemokines by an adrenocortical carcinoma: a novel clinical syndrome. *J Clin Endocrinol Metabolism.* 2001; 86(8): 3968–74.

Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; Jul;87(7):3467-74.

Sidhu S, Gicquel C, Bambach CP, Campbell P, Magarey C, Robinson BG, Delbridge LW. Clinical and molecular aspects of adrenocortical tumourigenesis. *ANZ J Surg.* 2003; Sep;73(9):727-38.

Semba S, Trapasso F, Fabbri M, McCorkell KA, Volinia S, Druck T, Iliopoulos D, Pekarsky Y, Ishii H, Garrison PN, Barnes LD, Croce CM, Huebner K. Fhit modulation of the Akt-survivin pathway in lung cancer cells: Fhit-tyrosine 114 (Y114) is essential. *Oncogene.* 2006; May 11;25(20):2860-72

Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol.* 1988; 50:427-40.

Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, Bartsch DK. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006; 154(4): 587–98.

Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist.* 2008; 13(5): 548-61.

Sozzi G, Tornielli S, Tagliabue E, Sard L, Pezzella F, Pastorino U, Minoletti F, Pilotti S, Ratcliffe C, Veronese ML, Goldstraw P, Huebner K, Croce CM, Pierotti MA. Absence of Fhit protein in primary lung tumors and cell lines with FHIT gene abnormalities. *Cancer Res.* 1997; Dec 1;57(23):5207-12.

Staels B, Hum DW, Miller WL. Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol.* 1993; 7(3):423-33.

Stocco DM, Wang X, Jo Y, Manna PR. Multiple signaling pathways regulating steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression: more complicated than we thought. *Mol Endocrinol.* 2005; Nov;19(11):2647-59.

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

Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005; Sep 1;65(17):7622-7.

Ueno M, Nakashima J, Akita M, Ban SI, Nakanoma T, Iida M, Deguchi N. Characterization of a newly established cell line derived from human adrenocortical carcinoma. *Int J Urol.* 2001; 8(1):17-22.

Virgilio L, Shuster M, Gollin SM, Veronese ML, Ohta M, Huebner K, Croce CM. FHIT gene alterations in head and neck squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996; Sep 3;93(18):9770-5.

Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene.* 2001; 20(19):2365-77.

Wang T, Rainey WE. Human adrenocortical carcinoma cell lines. *Mol Cell Endocrinol.* 2012; 351(1):58-65.

Weiske J, Albring KF, Huber O. The tumor suppressor Fhit acts as a repressor of beta-catenin transcriptional activity. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007; 104(51):20344-9.

Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984; 8:163–169.

Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL Jr., Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989; 13(3):202-6.

Xing Y, Parker CR, Edwards M, Rainey WE. ACTH is a potent regulator of gene expression in human adrenal cells. *J Mol Endocrinol.* 2010; 45(1):59-68.

Yakicier MC, Legoix P, Vaury C, Gressin L, Tubacher E, Capron F, Bayer J, Degott C, Balabaud C, Zucman-Rossi J. Identification of homozygous deletions at chromosome 16q23 in aflatoxin B1 exposed hepatocellular carcinoma. *Oncogene.* 2001; 20(37):5232-8.

Yang JY, Yang MQ, Luo Z, Ma Y, Li J, Deng Y, Huang X. A hybrid machine learning-based method for classifying the Cushing's Syndrome with comorbid adrenocortical lesions. *BMC Genomics.* 2008; 2008;9.

Yasumura Y, Buonassisi V, Sato G. Clonal analysis of differentiated function in animal cell cultures. I. Possible correlated maintenance of differentiated function and the diploid karyotype. *Cancer Res.* 1966; 26(3): 529-35.

Yendamuri S, Kuroki T, Trapasso F, Henry AC, Dumon KR, Huebner K, Williams NN, Kaiser LR, Croce CM. WW domain containing oxidoreductase gene expression is altered in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003; Feb 15;63(4):878-81.

Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M. Contemporary Management of Adrenocortical Carcinoma. *Europe Anurology*. 2011; 60(5): 1055–65.

APÊNDICES

APÊNDICE A - Descrição dos genes disponíveis no PCR Array

Tabela A. 1 - Descrição dos genes disponíveis no PCR Array

Posição	Identificador	Símbolo	Descrição	Grupos
A01	NM_005157	ABL1	V-abl Abelson Oncogene viral de leucemia murina	Fatores de transcrição
A02	NM_005163	AKT1	Homólogo ao oncogene Viral V-akt de Thimona Murino 1	Angiogênese
A03	NM_000038	APC	Polipose adenomatosa coli	Adesão celular
A04	NM_000051	ATM	Mutado na ataxia telangiectasia	Supressores de tumor / Ciclo Celular
A05	NM_004324	BAX	Proteína X associada a BCL2	Oncogenes / Apoptose
A06	NM_000633	BCL2	Célula-B CLL / linfoma 2	Apoptose
A07	NM_138578	BCL2L1	Semelhante ao BCL-2 tipo 1	Oncogenes / Apoptose
A08	NM_004327	BCR	Região de ponto de interrupção do cluster	Ambos Oncogenes e Supressores de tumor
A09	NM_007294	BRCA1	Câncer de mama 1, início precoce	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Apoptose / Ciclo celular
A10	NM_000059	BRCA2	Câncer de mama 2, início precoce	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesenquima / Ciclo celular
A11	NM_001228	CASP8	Caspase 8, a apoptose relacionada com peptidase cisteína	Oncogenes / Apoptose
A12	NM_053056	CCND1	Ciclina D1	Ciclo celular
B01	NM_004360	CDH1	Caderina 1, tipo 1, E-caderina (epitelial)	Supressor de tumor / Adesão celular
B02	NM_000075	CDK4	Ciclina dependente de quinase 4	Oncogenes / Ciclo Celular
B03	NM_000389	CDKN1A	Inibidor 1A de quinase dependente de ciclina (p21, CIP1)	Ciclo Celular
B04	NM_000077	CDKN2A	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2A (melanoma, p16, inibidor CDK4)	Fatores de transcrição / Adesão celular / Ciclo Celular
B05	NM_004936	CDKN2B	Inibidor de quinase dependente de ciclina 2B (p15, inibidor CDK4)	Supressores de tumor / Transição epitélio-mesenquima / Ciclo Celular

B06	NM_005192	CDKN3	Inibidor de quinase dependente de ciclina 3	Supressores de tumor / Ciclo Celular
B07	NM_001904	CTNNB1	Catenina (caderina associada a proteína) beta 1	Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesênquima / Angiogênese / Adesão celular
B08	NM_005225	E2F1	Fator de transcrição E2F1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Apoptose / Ciclo Celular
B09	NM_001963	EGF	Fator de crescimento Epidermal	Ambos Oncogenes e Supressores de tumor / Angiogênese
B10	NM_005229	ELK1	ELK1, membro da família de oncogenes ETS	Oncogenes / Fatores de transcrição
B11	NM_004448	ERBB2	Homólogo 2 ao oncogene viral (v-erb-b2) de leucemia eritroblástica, oncogene homólogo derivado de neuro / glioblastoma (aviária)	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Transição epitélio-mesênquima / Angiogênese
B12	NM_000125	ESR1	Receptor de Estrógeno 1	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
C01	NM_005238	ETS1	Oncogene E26 1 / Homólogo do oncogene viral (V-ets) de eitroblastose E26	Oncogenes / Fatores de transcrição
C02	NM_002012	FHIT	Gene "Fragile histidine triad"	Supressores de tumor
C03	NM_005252	FOS	Homólogo ao oncogene viral (v-fos FBJ) de osteosarcoma murino	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
C04	NM_012183	FOXD3	Forkhead caixa-D3	Supressores de tumor / Fatores de transcrição
C05	NM_000601	HGF	Fator de crescimento hepatocítico	Oncogenes / Transição epitélio-mesênquima / Ciclo Celular
C06	NM_006497	HIC1	Hipermetilado em câncer 1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição
C07	NM_005343	HRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ha-ras Harvey	Ambos Oncogenes e supressores de tumor
C08	NM_000876	IGF2R	Receptor fator de crescimento semelhante à insulina 2	Supressores de tumor
C09	NM_004972	JAK2	Janus Quinase 2	Oncogenes / Transição epitélio-mesênquima
C10	NM_002228	JUN	Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 / Proto-oncogene JUN	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
C11	NM_002229	JUNB	Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 B / Proto-oncogene JUN B	Oncogenes / Fatores de transcrição
C12	NM_005354	JUND	Oncogene homólogo ao v-jun sarcoma vírus 17 D / Proto-oncogene JUN D	Oncogenes / Fatores de transcrição

D01	NM_000222	KIT	V-kit Hardy-Zuckerman 4 homólogo de oncogene viral de sarcoma felino	Oncogenes / Transição epitélio-mesenquima
D02	NM_003994	KITLG	Ligante KIT	Oncogenes / Adesão celular
D03	NM_004985	KRAS	Homólogo do oncogene viral do sarcoma de rato v-Ki-ras2 Kirsten	Ambos Oncogenes e supressores de tumor
D04	NM_021960	MCL1	Sequência de células de leucemia mieloide 1 (BCL2-relacionados)	Oncogenes / Transição epitélio-mesenquima / Apoptose
D05	NM_002392	MDM2	MDM2 oncogene, proteína ligase E3 ubiquitina	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
D06	NM_000244	MEN1	Múltiplas neoplasias endócrinas 1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Ciclo Celular
D07	NM_000245	MET	Proto-oncogene Met (Receptor do fator de crescimento hepatocítico)	Oncogenes
D08	NM_002412	MGMT	O6-metilguanina DNA metiltransferase	Supressores de tumor / Apoptose
D09	NM_000249	MLH1	Homólogo MutL 1, câncer do cólon , nonpolyposis tipo 2	Supressores de tumor
D10	NM_005372	MOS	V-mos do sarcoma murino de Moloney homólogo do oncogene viral	Oncogenes
D11	NM_005375	MYB	Oncogene mieloblastosis vírus	Oncogenes / Fatores de transcrição
D12	NM_002467	MYC	Homólogo ao oncogene viral v-myc de mielocitomatose	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
E01	NM_005378	MYCN	Mielocitomatose v-myc oncogene viral relacionado neuroblastoma, derivado (aviária)	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
E02	NM_000267	NF1	Neurofibromina 1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesenquima / Angiogênese / Adesão celular
E03	NM_000268	NF2	Neurofibromina 2	Supressores de tumor / Adesão celular
E04	NM_003998	NFKB1	Fator nuclear do gene enhancer do polipeptídeo leve Kappa nas células-B 1	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
E05	NM_020529	NFKBIA	Inibidor de fator nuclear do gene enhancer do polipeptídeo leve Kappa nas células-B 1, Alfa	Oncogenes
E06	NM_002524	NRAS	Oncogene homólogo de neuroblastoma RAS viral (v-ras)	Oncogenes
E07	NM_002645	PIK3C2A	Fosfatidilinositol-4-fosfato de 3-cinase, catalítica da subunidade do tipo 2 alfa	Ambos Oncogenes e supressores de tumor

E08	NM_006218	PIK3CA	Fosfatidilinositol-4 ,5-bisfosfato-3-quinase, subunidade catalítica alfa	Oncogenes
E09	NM_033238	PML	Leucemia promielocítica	Oncogenes / Fatores de transcrição / Angiogênese
E10	NM_002737	PRKCA	Proteína quinase C, Alfa	Oncogenes
E11	NM_002880	RAF1	Oncogene homólogo v-raf-1 leucemia viral 1	Oncogenes
E12	NM_000964	RARA	Receptor ácido retinóico, Alfa	Oncogenes / Fatores de transcrição
F01	NM_007182	RASSF1	Família Ras associação domínio (RalGDS/AF-6), membro 1	Supressores de tumor
F02	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
F03	NM_002908	REL	Oncogene homólogo viral v-rel reticuloendoteliose viral (Aviário)	Oncogenes / Fatores de transcrição
F04	NM_020630	RET	Proto-oncogene Ret	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição
F05	NM_002944	ROS1	C-ros oncogene 1 , receptor tyrosina quinase	Oncogenes
F06	NM_001754	RUNX1	Factor de transcrição 1 relacionado com Runt	Oncogenes / Fatores de transcrição / Angiogênese
F07	NM_004350	RUNX3	Factor de transcrição 3 relacionado com Runt 3	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesenquima
F08	NM_002961	S100A4	Cálcio S100 ligado a proteína A4	Supressores de tumor / Transição epitélio-mesenquima
F09	NM_002639	SERPINB5	Inibidor de serpina peptidase, subtipo B, membro 5	Supressores de tumor
F10	NM_014631	SH3PXD2A	SH3 e PX domínios 2A	Ambos Oncogenes e supressores de tumor
F11	NM_005359	SMAD4	Membro 4 da família SMAD	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesenquima
F12	NM_005417	SRC	Oncogene homólogo viral v-src (Schmidt-Ruppin A-2)	Oncogenes
G01	NM_003150	STAT3	Transdutor de sinal e ativação de transcrição 3	Oncogenes / Fatores de transcrição
G02	NM_000455	STK11	Serina/treonina quinase 11	Supressores de tumor / Ciclo Celular

G03	NM_000660	TGFB1	Fator transformador de crescimento, beta 1	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesênquima / Angiogênese / Adesão Celular
G04	NM_000594	TNF	Fator de necrose tumoral	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição / Apoptose
G05	NM_000546	TP53	Proteína p53	Ambos Oncogenes e supressores de tumor / Fatores de transcrição / Ciclo Celular
G06	NM_005427	TP73	Proteína p73	Supressores de tumor / Fatores de transcrição
G07	NM_000368	TSC1	Esclerose tuberosa 1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição
G08	NM_000551	VHL	Supressor de tumor Von Hippel-Lindau	Supressores de tumor / Fatores de transcrição / Transição epitélio-mesênquima / Apoptose
G09	NM_000378	WT1	Tumor Wilms 1	Supressores de tumor / Fatores de transcrição
G10	NM_016373	WWOX	WW domínio contendo óxidorredutase	Supressores de tumor
G11	NM_006297	XRCC1	X-ray reparação complementando com defeito de reparo em células de hamster chinês 1	Supressores de tumor
G12	NM_014943	ZHX2	Zinc fingers e homeoboxes 2	Oncogenes / Fatores de transcrição
H01	NM_004048	B2M	Microglobulina 2 Beta	Genes de Referência
H02	NM_000194	HPRT1	Hipoxantina fosforribosil 1	Genes de Referência
H03	NM_012423	RPL13A	Proteína Ribossomal L13a	Genes de Referência
H04	NM_002046	GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase	Genes de Referência
H05	NM_001101	ACTB	Beta Actina	Genes de Referência
H06	SA_00105	HGDC	Human Genomic DNA Contamination	Genes de Referência
H07	SA_00104	RTC	Controle de Transcrição Reversa	Controles da placa
H08	SA_00104	RTC	Controle de Transcrição Reversa	Controles da placa
H09	SA_00104	RTC	Controle de Transcrição Reversa	Controles da placa

H10	SA_00103	PPC	Controle positivo de PCR	Controles da placa
H11	SA_00103	PPC	Controle positivo de PCR	Controles da placa
H12	SA_00103	PPC	Controle positivo de PCR	Controles da placa

APÊNDICE B - Gráfico de dispersão de genes no PCR Array

Figura 15 - Gráfico de dispersão dos genes diferencialmente expressos nas placas de PCR array. Expressão gênica das culturas NCI-H295R, SW-13, T83-ACC, T53-ACC, T20-ACC, T36-REC, T24-REC, T43-MET, T19-NEO T25-ACA e T16-HN, T105-ACC, T7-ACA e T47-ACA em relação ao pool de adrenais normais humanas. Limiar de expressão de três vezes para mais e para menos. Pontos em vermelho são genes mais expressos, verdes são genes menos expressos e pretos não apresentaram diferença em relação ao controle. n=1.

APÊNDICE C - Relação de genes diferencialmente expressos

Tabela C. 1 - Relação de oncogenes diferencialmente expressos

ONCOGENES														
GENES	NCI-H295R	SW-13	T83-ACC	T53-ACC	T20-ACC	T36-REC	T24-REC	T43-MET	T19-NEO	T25-ACA	T16-HN	T105-ACC(P)	T7-ACA(P)	T47-ACA(P)
BAX	-	-	-	-	3,1	-	3,3	-	-	-	-	-	-	-
BCL2L1	-	-	-	-6,8	-	-	-	-12,4	-10,3	-7,2	-4,7	-	-	-
CASP8	-	-23,0	-5,3	-5,1	-6,6	-3,1	-5,6	-6,3	-14,5	-21,9	-5,7	-3,2	-12,7	-8,8
CDK4	-	-	-5,8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,0	-4,1
ELK1	-	-	-	-4,9	-	-6,4	-7,9	-23,1	-	-3,1	-	-3,2	-	-
ETS1	-700,4	-389,1	-	-8,0	-	-6,7	-3,4	-28,8	-6,4	-4,4	-	-3,5	-	-
HGF	-930,6	-45,4	-	-6,2	-156,9	-157,2	-5,4	-	-74,2	-32,9	-46,4	-36,8	-	-7,4
JAK2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3,2	-
JUNB	-14,0	-23,2	-6,1	-97,3	-22,1	-42,7	-180,5	-204,8	-1997,5	-754,8	-646,3	-18,0	-63,8	-27,2
JUND	-	-4,9	-4,4	-6,2	-4,9	-3,4	-	-52,3	-28,5	-28,8	-40,7	-4,5	-9,8	-7,8
KIT	-9,3	-31,6	-	3,4	-	-	10,2	-	3,0	-	-	-	3,7	9,3
KITLG	4,3	19,2	5,7	-	3,7	8,3	5,4	8,5	-	5,4	3,3	10,8	-	5,1
MCL1	-	-	-	-	-	-	-	10,2	-	-	-	-	-	-
MET	-	-	15,9	5,1	10,7	11,3	6,7	11,6	6,1	7,4	-	-	7,1	20,3
MOS	-18,5	-	-	-	-	-5,3	-4,0	-	-3,6	-3,2	-	-	-14,5	-16,2
MYB	93,6	33,5	6,5	9,3	-	19,8	-	28,3	26,6	27,3	24,3	-	3,8	-2,3
NFKBIA	-	-22,2	-6,6	-	-3,2	-4,8	-3,8	-	-7,5	-10,4	-14,8	-	-8,9	-23,4
NRAS	-	3,7	-	-	-	-3,0	-	-	-3,6	-	-	-	-	-
PIK3CA	-	5,5	7,3	3,9	6,3	3,3	7,1	10,4	3,7	4,7	-	3,9	-	4,1
PML	-4,2	-3,3	-	-3,7	-	-	-	-14,7	-6,7	-6,6	-6,7	-	-	-
PRKCA	-14,1	-10,1	-	-4,0	-	-4,6	-6,2	-4,8	-4,4	-4,6	-5,8	-6,8	-4,1	-
RARA	-3,1	-	-	-7,5	-	-4,2	-	-6,2	-41,2	-22,9	-7,5	-4,4	-	-
REL	-	-	-	-	-	-	-	-6,4	-6,4	-7,5	-13,2	-	-3,0	-

ROS1	-	-	4,5	6,0	-	-	-	11,8	-	3,2	3,8	-	-	-
RUNX1	-	-111,0	7,1	3,4	13,6	4,2	5,8	3,6	-	-	-	5,4	3,1	5,0
SRC	-340,6	-4,8	-4,6	-9,5	-3,7	-9,6	-5,3	-50,1	-39,2	-82,1	-22,1	-6,5	-14,7	-8,7
STAT3	-	-	-	-	-	-3,1	-	-23,7	-4,2	-5,1	-	-	-	-
ZHX2	-3,7	-85,9	-5,0	-3,1	-4,5	-8,8	-4,6	-56,8	-19,2	-19,6	-13,0	-	-16,9	-13,5

Tabela C. 2 - Relação de supressores de tumor diferencialmente expressos

SUPRESSORES DE TUMOR														
GENES	NCI-H295R	SW-13	T83-ACC	T53-ACC	T20-ACC	T36-REC	T24-REC	T43-MET	T19-NEO	T25-ACA	T16-HN	T105-ACC (P)	T7-ACA (P)	T47-ACA (P)
ATM	-	-	-	-20,0	-	-3,1	-	-10,2	-	-4,2	-9,0	-4,3	-	-
BRCA1	37,0	37,4	-	4,1	3,9	6,5	-	-	4,6	5,6	3,8	-	-	-
BRCA2	49,8	123,3	18,4	9,1	30,2	84,7	14,2	40,8	7,5	50,9	10,7	16,3	12,4	19,3
CDH1	-9,9	-4,9	-	-	-4,0	-4,6	4,4	-	-	3,0	-	-13,3	-	-
CDKN2A	20,1	13,9	15,5	10,6	7,9	-16,1	33,9	36,6	32,4	6,2	-	28,6	4,3	-
CDKN2B	-	-	5,5	3,0	-	-72,8	5,0	-	4,1	6,3	-	-	4,0	9,4
CDKN3	114,4	71,3	-	16,2	-	34,2	5,9	87,5	24,4	17,9	16,2	4,4	8,1	7,5
E2F1	4,9	6,3	-	-	-	-	-	-	-	-4,6	-	-	-3,5	-3,0
FHIT	-9,4	-2126,1	-144,6	-12,5	-254,9	-6,8	-33,5	-45,5	-18,2	-23,4	-59,1	-4,7	-160,5	-188,2
FOXD3	-3,9	-	-5,3	-	-11,2	-9,9	-4,5	-	-9,7	-3,7	-3,2	-	-16,5	-8,9
HIC1	-71,1	-39,5	-	-9,2	-	-41,0	-	-6,1	-12,5	-6,3	-6,0	-4,7	-2,2	-2,5
IGF2R	-	-	-	-9,3	-	-3,1	-	-32,2	-8,8	-13,1	1216242,9	-3,2	-3,7	-2,9
MEN1	-	-	-	-12,0	-	-3,1	-4,2	-31,3	-13,7	-12,8	-13,2	-4,5	-4,8	-4,1
MGMT	-	-	-8,1	-	-	-	-	-	-	-	-3,6	-3,5	-	-3,3
MLH1	-	-	-	-	-	-	-	5,4	-	-	-	-	-	-
NF2	-	-	-	-	-	-	-	-3,8	-	-	-	-	-	-
RASSF1	-	-	6,3	-	-	-	-	-	-6,7	-	-	-	-	-
RUNX3	-29,1	8,0	-6,4	-3,4	-76,3	-50,8	-23,2	-5,1	-50,0	-5,9	-16,2	-	-31,7	-94,7
S100A4	-5,3	-95,3	-3,8	-	-36,4	-30,8	9,5	-	-	-	-13,1	-	-	-
SERPINB5	-4,5	-	4,4	-	-	-	-	4,7	-	-	-	-	-	-
SMAD4	-	-	-	-	-	-	-	-	-4,5	-	-4,0	-	-	-
STK11	-	-	-	-3,6	-	-	-4,6	-6,1	-10,6	-8,6	-15,0	-4,2	-9,9	-3,5
TP73	-3,9	-	-	-	-8,4	-	-	-	-7,6	-3,0	-	-	-13,6	-6,9
TSC1	-	-3,6	-	-3,5	-	-	-	-3,0	-3,6	-5,2	-6,1	-	-5,0	-3,9
VHL	-	-	-3,0	-	-	-	-	-	-	-	-4,6	-	-4,4	-2,8

WT1	-30,1	-	7,5	5,1	3,4	-	-	-	4,7	-	-	3,9	-11,4	-
WWOX	-	-3,0	-7,4	-5,5	-11,9	-9,6	-7,2	-11,4	-10,4	-14,3	-19,4	-9,9	-19,6	-12,3
XRCC1	-	-	-	-3,2	-	-	-4,6	-22,9	-6,1	-5,9	-3,7	-	-3,8	-