GABRIELA RESENDE VIEIRA DE SOUSA

**Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores do
córtex da suprarrenal de crianças e adultos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do título
de Doutor em Ciências

Programa de Endocrinologia

Orientador: Dr. Madson Queiroz de Almeida

**SÃO PAULO
2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Sousa, Gabriela Resende Vieira de

Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores de córtex da suprarrenal de
crianças e adultos / Gabriela Resende Vieira de Sousa. -- São Paulo, 2015.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.

Orientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Carcinoma adrenocortical 2.Expressão gênica 3.MicroRNAs
4.Carcinogênese 5.Regulação neoplásica da expressão gênica 6.Proteínas de neoplasias
7.Marcadores biológicos de tumor 8.Prognóstico 9.Sobrevida

USP/FM/DBD-178/15

*"Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa
o que somos.
Vale o que realizamos com aquilo que
possuímos e, acima de tudo,
importa o que fazemos de nós!"*

Chico Xavier

Aos meus pais, Rose e Pedro, pelo amor incondicional e pelos exemplos de trabalho, dedicação e responsabilidade, os quais me tornaram quem eu sou hoje; e ao meu noivo Carlos, por compartilhar mais esse sonho comigo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me ofertar nesta vida oportunidades de estudo e crescimento e pela força que me deu para realizar este trabalho que foi de muita importância e significado para mim.

Ao meu orientador, e desde então mestre e amigo, Dr. Madson Queiroz de Almeida, que me inspira não só por seu brilhantismo profissional, mas também pela sua paixão e dedicação ao trabalho, o qual realiza com peculiar vocação, leveza e alegria. Sempre serei grata por todos os ensinamentos e orientações que recebi durante todo o período de desenvolvimento deste projeto e pelas diversas lições que a nossa convivência me proporcionou; e, ainda, por saber lidar com tantos momentos de incertezas, erros e medos, e com isso, contribuir imensamente para meu amadurecimento pessoal e profissional.

À Dr^a. Maria Cândida Barisson Villares Fragoso, por me receber na Unidade de Suprarrenal com tanto carinho e paciência, e se tornar um belo exemplo de altruísmo, de assistência e de entrega aos pacientes. Obrigada pelo cuidado, pela companhia, pelos conselhos durante os almoços, por dividir o “lanchinho” no ambulatório entre as consultas e por outros tantos momentos que serão lembrados sempre juntamente com a sua inestimável amizade.

Às Professoras Titulares da Disciplina de Endocrinologia e Metabologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Prof^{as}. Dr^{as}. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latronico, por todo apoio, incentivo e por fazerem com que a minha paixão pela medicina, pela ciência e pela pesquisa se tornassem ainda maiores depois de conhecê-las.

Ao Dr. Iberê Cauduro Soares e à Prof^a. Dr^a. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, por toda paciência e colaboração na análise e leitura dos estudos de imunohistoquímica.

Às queridas colegas de bancada e amigas Tamaya Castro Ribeiro, Mariana Furani e Aline Zamboni, biólogas do LIM-42, pela paciência em transmitir a mim os conhecimentos do mundo da biologia molecular e pela amizade que acabamos desenvolvendo durante nossa prazerosa convivência.

A todos os funcionários do LIM42, em especial à Nilda, Rosangele, Cidinha, Fran e Mirian, por toda ajuda dispensada e todo trabalho que desempenham para o ótimo funcionamento do laboratório.

Aos colegas pós-graduandos: André Faria, por me introduzir no mundo da pós-graduação e me repassar seus conhecimentos com tamanha paciência; Guilherme Asmar Alencar, pela agradável e enriquecedora convivência; Delanie Macedo, por sua amizade fiel, apoio e estímulo constante, e Letícia Assis, pelo companheirismo, carinho e amizade verdadeira.

Ao colega Antônio Marcondes Lerário com o qual tive o privilégio e a felicidade de conviver durante o período de pós-graduação no Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo e que representa para mim um médico valoroso, um pesquisador genial com potencial imenso e, sobretudo, um amigo carinhoso e dedicado.

Aos meus pais, Rose e Pedro, que sempre priorizaram o meu estudo, que primaram pelo meu desenvolvimento pessoal e profissional, me apoiaram em momentos que me faltaram forças físicas e psicológicas, acreditaram e acreditam de forma imensurável na minha capacidade de ir além e são os meus maiores exemplos de vida, cada um com sua singularidade.

Aos meus irmãos amados: Pedro, por sempre me estimular a acreditar em mim mesma; Urias, pela paciência, doçura e amor incondicional e Alexandre, pela atenção e carinho apesar da distância em que crescemos.

Ao meu noivo Carlos, um dos meus principais exemplos da busca incessante pelo conhecimento. Muito obrigada pelo amor, pelo companheirismo, pelo apoio, pela paciência em me suportar nos meus períodos de preocupação e ansiedade, e pela alegria que transparece a alegria que transparece com a concretização do meu sonho.

Às minhas amigas-irmãs, Livia Letícia e Soraia Beatriz, por me tornarem uma pessoa mais forte para lutar pelos meus sonhos pelo simples fato de me proporcionarem sua amizade e sua presença em minha vida.

Aos pacientes com câncer de suprarrenal, por representarem um estímulo para que eu me dedicasse a esta pesquisa, por modificarem minha visão sobre a vida, e, de certa forma, a minha própria maneira de viver.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo.

Apoio: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Bolsa de doutorado: 2013/09621-8, Auxílio Pesquisa: 2012/21272-6).

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*.

Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3ª ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentações; 2011.

Abreviatura dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de quadros

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Tumores do Córtex da Suprarrenal.....	2
1.2	Patogênese Molecular dos Tumores do Córtex da Suprarrenal.....	10
1.3	microRNAs: Regulação Epigenética em Tumores do Córtex da Suprarrenal.....	14
1.4	Complexo DICER1-TRBP e Seu Papel na Tumorigênese.....	21
2	OBJETIVOS	27
3	MÉTODOS.....	29
3.1	Considerações Éticas	30
3.2	Pacientes	30
3.3	Métodos	32
3.3.1	Micromatriz Tecidual (TMA) e Imunohistoquímica	32
3.3.2	Estudos moleculares.....	37
3.3.2.1	Extração de RNA	37
3.3.2.2	Expressão de RNAm por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativa em tempo real.....	37
3.3.2.3	Expressão de miRNAs por RT-PCR em tempo real	42
3.3.2.4	Extração de DNA	45
3.3.2.5	Sequenciamento automático pelo método de Sanger.....	45
3.4	Análise Estatística.....	47
4	RESULTADOS.....	49
4.1	Análise do Gene <i>DICER1</i> em Tumores do Córtex da Suprarrenal	50
4.1.1	Expressão proteica da <i>DICER1</i>	50
4.1.2	Expressão gênica da <i>DICER1</i>	57
4.1.3	Expressão dos <i>miR-103</i> e <i>miR-107</i>	59
4.1.4	Sequenciamento dos sítios de ligação de metais do domínio RNase IIIb do gene <i>DICER1</i>	60
4.2	Análise do Gene <i>TARBP2</i> em Tumores do Córtex da Suprarrenal	61
4.2.1	Expressão proteica da TRBP	61
4.2.2	Expressão gênica da <i>TARBP2</i>	62
4.2.3	Expressão do <i>miR-497</i>	63
4.2.4	Sequenciamento do éxon 5 do gene <i>TARBP2</i>	63

5	DISCUSSÃO.....	64
6	CONCLUSÕES	70
7	ANEXOS	72
8	REFERÊNCIAS	100
	APÊNDICE	124

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTH	-	Hormônio adrenocorticotrópico
BSA	-	Solução de albumina bovina
CAPPesq	-	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
cDNA	-	DNA complementar
COSMIC	-	<i>Catalogue of Somatic Mutation in Cancer</i>
C _T	-	Ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência
DDT	-	Diclorodifeniltricloroetano
DHEA	-	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	-	Sulfato de DHEA
DNA	-	Ácido desoxirribonucleico
H ₂ O ₂	-	Água oxigenada
IC 95%	-	Intervalo de confiança 95%
miRNA	-	microRNA
mTor	-	Via alvo da rapamicina de mamíferos
NEM1	-	Neoplasia endócrina múltipla tipo 1
PBS	-	Tampão fosfato-salino
PCR	-	Reação em cadeia de polimerase
pri-miRNA	-	Transcrito primário do microRNA
R1	-	Ressecção incompleta do tumor
RISC	-	Complexo silenciador induzido por RNA
RM	-	Ressonância magnética
RNA	-	Ácido ribonucleico
RNA _m	-	RNA mensageiro
RR	-	Risco relativo
RT	-	Transcrição reversa
Rx	-	Ressecção incerta
TC	-	Tomografia computadorizada
TMA	-	Micromatriz tecidual
USG	-	Ultrassonografia
ΦX	-	Peso molecular de concentração conhecida

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Investigação laboratorial de funcionalidade em tumores do córtex da suprarrenal.....	3
Quadro 2 -	miRNAs desregulados em carcinomas do córtex da suprarrenal.....	19
Quadro 3 -	Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar os quatro sítios de ligação de metais do domínio de clivagem RNaseIIIb do gene <i>DICER1</i>	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática do processo de biogênese dos miRNAs nos humanos.....	16
Figura 2 - Mecanismos de regulação dos miRNAs.....	20
Figura 3 - Representação das mutações encontradas no domínio de clivagem RNase IIIb da <i>DICER1</i> , codificado pelos exons 23-25	24
Figura 4 - Coorte de tumores do córtex da suprarrenal em adultos para a análise de imunohistoquímica, DNA e cDNA tumorais, IHQ, imunohistoquímica	31
Figura 5 - Coorte de tumores do córtex da suprarrenal em crianças para a análise de imunohistoquímica, DNA e cDNA tumorais. TMA, micromatriz tecidual; IHQ, imunohistoquímica; CB, tumores clinicamente benignos; CM, tumores clinicamente malignos.....	32
Figura 6 - (A) Imunorreatividade forte (escore 6) para a <i>DICER1</i> em um carcinoma cortical de suprarrenal virilizante diagnosticado em uma paciente de 59 anos com boa evolução clínica após 97 meses de seguimento (400x). (B) Carcinoma cortical de suprarrenal metastático e produtor de inibina em um paciente de 30 anos com imunorreatividade ausente (escore 0) para a <i>DICER1</i> (400x)	51
Figura 7 - A e B, Adenoma de córtex de suprarrenal com imunorreatividade ausente (escore 0) para a TRBP representado em aumentos de 100 e 400X, respectivamente. C e D, Adenoma de córtex de suprarrenal com imunorreatividade forte (escore 6) para a TRBP representado em aumentos de 100 e 400x, respectivamente	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características clínicas dos 198 pacientes com tumores do córtex da suprarrenal incluídos na micromatriz tecidual (TMA).....	33
Tabela 2 - Características clínicas dos 84 pacientes com tumores do córtex da suprarrenal incluídos na análise da expressão gênica.....	38
Tabela 3 - Relação entre a expressão proteica da DICER1 e as características clínicas e patológicas dos pacientes adultos com carcinoma cortical da suprarrenal (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária) (n= 79)	52
Tabela 4 - Fatores prognósticos de sobrevida global e livre de doença em adultos com carcinoma cortical da suprarrenal (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária).....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 -	Curvas de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> da <i>DICER1</i> em relação aos gene endógeno <i>GUSB (beta-glicuronidase)</i>	40
Gráfico 2 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> da <i>DICER1</i> em relação ao gene endógeno <i>ACTB (beta-actina)</i>	40
Gráfico 3 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> da <i>TARBP2</i> em relação ao gene endógeno <i>GUSB (beta-glicuronidase)</i>	41
Gráfico 4 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> da <i>TARBP2</i> em relação aos gene endógeno <i>ACTB (beta-actina)</i>	41
Gráfico 5 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>miR-103</i> em relação ao gene endógeno <i>RNU44</i>	43
Gráfico 6 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>miR-103</i> em relação aos gene endógeno <i>RNU48</i>	43
Gráfico 7 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>miR-107</i> em relação aos gene endógeno <i>RNU44</i>	44
Gráfico 8 -	Curva de eficiência de amplificação em <i>singleplex</i> do <i>miR-107</i> em relação aos gene endógeno <i>RNU48</i>	44
Gráfico 9 -	Intensidade da imunorreatividade citoplasmática para a <i>DICER1</i> [Escore 0-7 resultante da soma da positividade (0-4) e da intensidade (0-3)] em adenomas (n= 75) e carcinomas (n= 79) de adultos. A linha horizontal do box plot representa a mediana, os limites referem-se aos percentis 25 e 75 e as barras incluem os percentis de 10 a 90 dos valores do escore	50
Gráfico 10 -	Impacto da expressão proteica da <i>DICER1</i> na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma cortical de suprarenal; n= 79 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa	53
Gráfico 11 -	Impacto da expressão proteica da <i>DICER1</i> na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma cortical da suprarenal; n= 61 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa; excluídos pacientes com metástase ao diagnóstico	53

Gráfico 12 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida global em crianças com tumor cortical da suprarrenal; n= 44 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa	56
Gráfico 13 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida livre de doença em crianças com tumor cortical da suprarrenal; n= 43 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa; excluídos pacientes com metástase ao diagnóstico.....	56
Gráfico 14 - Expressão do gene <i>DICER1</i> em adenomas e carcinomas diagnosticados em adultos. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro	58
Gráfico 15 - Expressão do gene <i>DICER1</i> em tumores clinicamente benignos e malignos diagnosticados em crianças. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro padrão	58
Gráfico 16 - Expressão do <i>miR-107</i> em adenomas e carcinomas diagnosticados em adultos. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro padrão	60

RESUMO

Sousa GRV. Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2015.

INTRODUÇÃO: O carcinoma cortical da suprarrenal é uma neoplasia rara com uma incidência estimada em 0,5-2,0 por milhão por ano em adultos. No momento, poucas opções terapêuticas para os pacientes com doença metastática são disponíveis, e novas descobertas sobre a sua patogênese são necessárias. O perfil de expressão gênica dos microRNAs (miRNAs) em tumores humanos tem sido caracterizado por uma redução global da expressão dos miRNAs. A enzima DICER1 e seu cofator TRBP (codificado pelo gene *TARBP2*) estão envolvidos em uma etapa essencial do processamento dos miRNAs. De forma interessante, a desregulação do processamento dos miRNAs em células cancerosas devido ao silenciamento da *DICER1* propiciou a emergência de células com fenótipo mais agressivo, acelerando a progressão tumoral. Recentemente, mutações somáticas *missense* recorrentes no domínio de clivagem RNase IIIb da enzima DICER1 foram identificadas em 29% tumores de ovários não-epiteliais esteroideogênicos (e em até 60% de tumores ovarianos de células de Leydig). Adicionalmente, mutações inativadoras no éxon 5 do gene *TARBP2*, com consequente prejuízo da função da DICER1, foram identificadas em linhagens celulares de tumores com instabilidade cromossômica.

OBJETIVOS: Determinar a expressão gênica e proteica da DICER1 e TRBP em tumores do córtex da suprarrenal de adultos e crianças; Investigar variantes genéticas no domínio de clivagem RNase IIIb do gene *DICER1*; Investigar variantes genéticas no éxon 5 do gene *TARBP2*; Estudar a expressão dos *miR-103* e *miR-107*, envolvidos na regulação da DICER1, e do *miR-497*, envolvido na regulação da TRBP.

MÉTODOS: A expressão proteica da DICER1 e da TRBP foi avaliada por imunohistoquímica em uma micromatriz tecidual contendo 198 tumores do córtex da suprarrenal [154 em adultos (75 adenomas e 79 carcinomas) e 44 em crianças (38 clinicamente benignos e 6 clinicamente malignos)]. A expressão gênica da *DICER1* e *TARBP2* foi avaliada em um subgrupo de 84 tumores (61 adultos e 23 pediátricos) e a expressão do *miR-103*, *miR-107* e *miR-497* em 82 tumores (59 adultos e 23 pediátricos). O sequenciamento dos genes *DICER1* e *TARBP2* foi realizado em um subgrupo quase idêntico de 83 tumores.

RESULTADOS: Em adultos, uma expressão forte para a DICER1 foi encontrada em 24 de 75 adenomas (32%) e em 39

de 79 carcinomas (51%; $X^2 = 4,8$, $p = 0,028$). Similarmente, a hiperexpressão do gene *DICER1* foi encontrada em 15 de 25 carcinomas (60%) e em 7 de 30 adenomas (23%; $X^2 = 7,64$, $p = 0,006$). Dentre os carcinomas de adultos, a imunorreatividade fraca para *DICER1* foi significativamente mais frequente em carcinomas metastáticos do que em não metastáticos (66% vs. 31%; $X^2 = 9,3$, $p = 0,002$). Além de mais agressivos, os carcinomas com uma expressão fraca da *DICER1* foram diagnosticados em pacientes com uma mediana de idade menor (35 vs. 45 anos, $p = 0,02$), maior tamanho (12,3 vs. 9 cm, $p = 0,001$), estadio mais avançado (ENSAT 3 ou 4 em 55% vs. 30%, $p = 0,04$) e maior escore de Weiss (6 vs. 4, $p = 0,02$). Adicionalmente, a expressão fraca para a *DICER1* se correlacionou com uma significativa redução da sobrevida global ($p = 0,004$) e livre de doença ($p = 0,005$). Na análise multivariada, $Ki67 \geq 10\%$ ($p = 0,0001$) e expressão proteica fraca para *DICER1* ($p = 0,048$) permaneceram como marcadores significativos de recorrência. No grupo pediátrico, a expressão gênica e proteica da *DICER1* não foi diferente entre tumores clinicamente malignos e benignos. Não identificamos nenhuma variante genética nos quatro sítios de metais do domínio RNase IIIb do gene *DICER1* tanto em adultos como em crianças. Além disso, a expressão proteica e gênica da *DICER1* não se correlacionou com a expressão do *miR-103* e *miR-107*. O *miR-107* foi hiperexpresso em carcinomas em relação a adenomas de adultos, mas não apresentou impacto na análise de sobrevida. Em relação ao gene *TARBP2*, a sua expressão gênica e proteica não teve correlação com parâmetros histopatológicos e clínicos em adultos e crianças. Variantes genéticas no sequenciamento do éxon 5 do gene *TARBP2* não foram encontradas nesses tumores. Além disso, o *miR-497* não foi expresso em nenhum dos tumores da nossa coorte. **CONCLUSÕES:** A baixa expressão proteica da *DICER1* foi um marcador de prognóstico em pacientes adultos com carcinoma cortical da suprarrenal. A perda da expressão da *DICER1* em carcinomas metastáticos não foi causada por mutações inativadoras no domínio RNase IIIb do gene *DICER1* e nem por alteração na expressão do *miR-103* e *miR-107*, reguladores da sua expressão em outros tecidos. Apesar do *miR-107* ter sido hiperexpresso em carcinomas, a sua expressão não teve importância prognóstica. Por fim, a expressão do gene *TARBP2* e da proteína TRBP não apresentou importância prognóstica nos tumores do córtex da suprarrenal.

Descritores: Carcinoma adrenocortical. Expressão gênica. microRNAs. Carcinogênese.

Marcadores biológicos de tumor. Prognóstico. Sobrevida.

SUMMARY

Sousa GRV. *DICER1* and *TARBP2* gene analysis in adult and pediatric adrenocortical tumors [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2015.

INTRODUCTION: Adrenocortical cancer is a rare neoplasia with an estimated incidence of 0.5-2.0/million/year in adults. There are currently few therapeutic options for patients with adrenocortical cancer, and new insights into the pathogenesis of this lethal disease are needed. The microRNA (miRNA) expression profile of human tumors has been characterized by an overall miRNA downregulation. DICER1 enzyme and its cofactor TRBP are a key component of the miRNA processing machinery. It was recently demonstrated that escaping miRNA control in cancer cells due to Dicer downregulation may allow the phenotypic emergence of more aggressive genetic variants, accelerating cancer progression. Recently, DICER1 mutations in the RNase IIIb domain were found in 29% of nonepithelial ovarian tumors, predominantly in Sertoli–Leydig cell tumors (60%). In addition, *TARBP2* truncating mutations, causing DICER1 destabilization, were identified in tumor cell lines with microsatellite instability. **AIM:** To study the mRNA and protein expression of DICER1 and TRBP in adult and pediatric adrenocortical tumors; To investigate *DICER1* mutations in metal binding sites located at the RNase IIIb domain; To investigate inactivating mutations in the exon 5 of *TARBP2* gene; To determine the expression of *miR-103* and *miR-107*, DICER1 regulators, and *miR-497*, a TRBP regulator. **METHODS:** Protein expression of DICER1 and TRBP was evaluated by immunohistochemistry in a tissue microarray with 198 adrenocortical tumors [154 in adults (75 adenomas and 79 carcinomas) and 44 in children (38 clinically benign and 6 malignant)]. Expression of *DICER1* and *TARBP2* genes was assessed in a subgroup of 84 tumors (61 adults and 23 children) and miRNA expression in 82 tumors (59 adults and 23 children). The *DICER1* and *TARBP2* gene sequencing was performed in a subgroup of 83 tumors. **RESULTS:** In adults, a strong DICER1 expression was demonstrated in 39 out of 79 carcinomas (51%) and in 24 out of 75 adenomas (32% $X^2= 4.8$, $p= 0.028$). Similarly, *DICER1* gene overexpression was demonstrated in 15 out of 25 carcinomas (60%) and in 7 out of 30 adenomas (23%; $X^2= 7.64$, $p= 0.006$). Among adult adrenocortical carcinomas, a weak DICER1 expression was significantly more frequent in metastatic than in non-metastatic adrenocortical carcinomas (66% vs. 31%; $X^2= 9.3$,

$p= 0.002$). Besides being more aggressive, adult adrenocortical carcinomas with a weak DICER expression were diagnosed in younger patients (median 35 vs. 45 yrs, $p= 0.02$) and had larger size (12.3 vs. 9 cm, $p= 0.001$), more advanced staging (ENSAT 3 or 4 in 55% vs. 30%, $p= 0.04$) and higher Weiss score (6 vs. 4, $p= 0.02$). Additionally, a weak DICER1 expression was significantly correlated with a reduced overall ($p= 0.004$) and disease-free ($p= 0.005$) survival. In the multivariate analysis, $Ki67 \geq 10\%$ ($p= 0.0001$) and a weak DICER1 expression ($p= 0.048$) remained as independent predictors of recurrence. In the pediatric group, DICER protein and gene expression was not different between clinically benign and malignant tumors. No variant was identified in the metal binding sites of the RNase IIIb domain of *DICER1* gene in both adult and pediatric tumors. Furthermore, DICER1 protein and gene expression did not correlate with *miR-103* e *miR-107* expression. *miR-107* was overexpressed in adult carcinomas compared to adenomas, but it was not a predictor of poor outcome. Regarding *TARBP2* gene, its gene and protein expression did not correlate with histopathological and clinical parameters in both children and adults. No variant was identified in exon 5 *TARBP2* gene. Additionally, *miR-497* was not expressed neither in the normal adrenal cortex and in adrenocortical tumors.

CONCLUSION: A weak DICER1 protein expression was significantly associated with poor outcome in adult adrenocortical carcinomas. However, DICER1 deregulation in adult ACCs was not caused by mutations within the RNase IIIb domain and not associated with expression of its regulatory miRNAs. Although *miR-107* was overexpressed in adult adrenocortical carcinomas, its expression was not correlated with a reduced survival. Finally, *TARBP2* gene and protein expression was not associated with poor outcome in adrenocortical tumors.

Descriptors: Adrenocortical carcinoma. Gene expression. microRNAs. Carcinogenesis. Tumor markers, biological. Prognosis. Survival.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores do Córtex da Suprarrenal

Os tumores da glândula suprarrenal são frequentemente diagnosticados como incidentalomas através de exames de imagem realizados por motivos não relacionados. São encontrados em cerca de 1% a 4% de todas as tomografias computadorizadas (TC) realizadas¹. Baseados em estudos de autópsias, a prevalência é de pelo menos 3% em indivíduos com até 50 anos, chegando a 7% a 10% em indivíduos com mais de 70 anos. A maioria desses tumores tem origem nas células do córtex da suprarrenal, não secretam hormônios e são adenomas².

Ao contrário dos adenomas do córtex da suprarrenal, os carcinomas são raros e correspondem a 0,05% a 0,2% de todos os cânceres, com uma incidência estimada em 0,7 a 2,0 por milhão por ano em adultos^{3,4}. Nos Estados Unidos, somente 25 novos casos de carcinomas do córtex da suprarrenal pediátricos são diagnosticados anualmente e constituem aproximadamente 0,2% de todas as neoplasias malignas pediátricas⁵. Contudo, a incidência de tumores do córtex da suprarrenal pediátricos é significativamente elevada no Sul e Sudeste do Brasil, sendo 10 a 15 vezes maior que a incidência mundial⁶. Essa maior incidência é decorrente da presença da mutação germinativa Arg337His (R337H) no gene supressor tumoral *TP53* encontrada em aproximadamente 70% a 80% das crianças e adolescentes com tumores do córtex da suprarrenal dessa região^{7,8}. Os tumores do córtex da suprarrenal apresentam uma distribuição bimodal, com o primeiro pico ocorrendo antes dos cinco anos e o

segundo entre a quarta e quinta décadas de vida e são mais comuns em mulheres, que representam 55% a 60% dos casos^{6,9,10}.

Ao diagnóstico, virilização isolada é a síndrome clínica mais comum em crianças com tumores do córtex da suprarrenal. A síndrome de Cushing ocorre frequentemente em associação com virilização^{6,10}. Em adultos, os tumores são classicamente diagnosticados em duas circunstâncias: em pacientes sintomáticos devido a uma síndrome clínica decorrente do excesso de esteroides (síndrome de Cushing, síndrome de Conn ou hiperandrogenismo em mulheres) ou com sintomas associados à massa tumoral; ou mais frequentemente são diagnosticados como incidentalomas^{3,4}. Nos casos de carcinomas, a maioria dos pacientes se apresenta com sinais e sintomas de excesso hormonal (50% a 60% dos casos), sendo a síndrome de Cushing, acompanhada ou não de virilização, a apresentação clínica mais comum¹¹.

Quadro 1 -Investigação laboratorial de funcionalidade em tumores do córtex da suprarrenal

Produção hormonal	Testes
Glicocorticoide	<ul style="list-style-type: none"> - Teste de supressão com 1 mg de dexametasona - Dosagem de cortisol em urina coletada em 24 horas - Cortisol sérico basal - ACTH sérico basal
Mineralocorticoide	<ul style="list-style-type: none"> - Potássio sérico - Aldosterona/Renina em pacientes hipertensos
Esteroides sexuais	<ul style="list-style-type: none"> - DHEAS - 17OH-progesterona - Androstenediona - Testosterona - Estradiol (apenas em homens e em mulheres menopausadas)
Feocromocitoma	<ul style="list-style-type: none"> - Metanefrinas urinárias ou plasmáticas

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico; DHEAS: Sulfato de DHEA

A realização de testes de funcionalidade hormonal em pacientes diagnosticados com massas em topografia da glândula suprarrenal é mandatória, pois pode confirmar a origem cortical do tumor da suprarrenal, bem como sugerir malignidade de acordo com o perfil de secreção hormonal e também ser útil para o preparo pré-operatório e o seguimento clínico¹² (Quadro 1). A investigação da produção autônoma de glicocorticoide, que pode levar a atrofia cortical da glândula contralateral devido à supressão hipofisária do ACTH pelo hipercortisolismo, é fundamental e mandatória, pois se ignorada previamente à cirurgia pode desencadear uma crise de insuficiência suprarrenal no pós-operatório imediato. Adicionalmente, é muito importante a exclusão de feocromocitoma, visto que uma crise hipertensiva letal pode ser desencadeada durante a indução anestésica ou manipulação cirúrgica do tumor³.

Os exames de imagem podem auxiliar na diferenciação entre adenomas e carcinomas na maioria dos casos de tumores do córtex da suprarrenal. A maioria dos adenomas tem tamanho menor que 5 cm e tumores maiores que 8 cm são altamente sugestivos de carcinomas⁹. Nenhum exame de imagem pode distinguir com certeza a natureza maligna ou benigna do tumor, no entanto vários estudos sugerem que a densidade da lesão menor que 10 UH (unidades de Hounsfield) na TC é um achado altamente sugestivo de benignidade¹³. Cerca de 30% dos adenomas tem uma densidade maior que 10UI devido a um menor teor de gordura e, nesse caso, a análise do clareamento do contraste da lesão na imagem após 15 minutos da injeção de contraste endovenoso é considerada um dado adicional, já que a queda da atenuação nos adenomas é mais rápida. Uma redução superior a 40% após 15 minutos é indicativa de adenoma com uma sensibilidade e especificidade superior a 90%¹⁴. Outros achados que sugerem benignidade são limites bem definidos e

estrutura homogênea. As lesões malignas costumam ser heterogêneas, com evidência de necrose ou hemorragia e margens irregulares^{15,16}.

A TC e a ressonância magnética (RM) são igualmente eficazes para diagnóstico diferencial de lesões de suprarrenal^{15,16}. No caso da RM, o carcinoma cortical da suprarrenal frequentemente apresenta um aumento do sinal nas ponderações T2. A avaliação da perda de sinal da lesão na ponderação em T1 fora de fase (*chemical shifting*) segue a mesma lógica da velocidade de clareamento do contraste na TC. Os adenomas apresentam uma perda de sinal superior a 50% em virtude do seu alto teor lipídico. A RM também é útil para o planejamento cirúrgico porque permite melhor avaliação dos órgãos adjacentes e avaliar a presença de invasão da veia cava inferior¹⁷.

O PET-FDG quando usado juntamente à TC tem um importante valor em pacientes com suspeita de carcinoma. Uma alta captação de glicose marcada ($SUV_{MAX} > 6$) demonstra um aumento do metabolismo glicolítico na lesão e sugere malignidade. No entanto, esse exame tem fundamental importância no seguimento de pacientes com carcinoma e alto risco de recidiva, como um método complementar a TC ou RM¹⁸.

Devido a grande diferença entre o prognóstico e tratamento, a distinção entre lesões benignas e malignas do córtex da suprarrenal é extremamente importante. A diferenciação entre lesões benignas e malignas é baseada em achados macroscópicos (peso do tumor, hemorragia e integridade da cápsula tumoral) e critérios histopatológicos microscópicos (escore de Weiss)^{19,20}.

O escore de Weiss compreende nove parâmetros histopatológicos relacionados com neoplasias metastáticas ou com recorrência local: três relacionados à estrutura do tumor (presença de necrose, arquitetura difusa, percentagem de células

claras), três relacionados à estrutura celular (mitoses atípicas, número de mitoses e atipia nuclear) e três relacionados à invasão (invasão de cápsula, invasão vascular e invasão sinusoidal) (Anexo A). Atipia nuclear, mitoses frequentes e atípicas (> 5 em 50 campos de alta resolução), invasão vascular e de cápsula e necrose constituem os critérios mais preditivos de malignidade. De acordo com esse sistema, um tumor é classificado como carcinoma quando apresenta pelo menos três dos nove critérios¹⁹.

Mesmo patologistas experientes podem ter dificuldade em definir com certeza a malignidade ou benignidade dos tumores³. A taxa de diagnóstico inicial incorreto na Alemanha foi de 13%²¹. O escore de Weiss continua sendo o mais usado para essa classificação, porém a variabilidade interobservador é grande. Um escore mais simplificado com um programa de treinamento estruturado poderia melhorar a reprodutibilidade do diagnóstico^{22,23}. Além disso, estudos demonstraram que a quantificação do marcador ki67 (um marcador de proliferação celular) é de extrema importância. O Ki67 representa o marcador mais importante de prognóstico no carcinoma cortical da suprarrenal e, portanto, é fundamental na decisão terapêutica e seguimento dos pacientes^{24,25}.

Um aspecto interessante é que tumores do córtex da suprarrenal em crianças se comportam de forma diferente quando comparados a tumores histologicamente similares em indivíduos adultos. Diferentemente dos adultos, os tumores pediátricos com prognóstico desfavorável baseado somente em critérios histopatológicos apresentam evolução clínica favorável sem recorrência^{26,27}. Além de importantes diferenças no prognóstico, a tumorigênese tem também padrões distintos entre crianças e adultos^{10,28,29}. Até o momento, poucos marcadores moleculares têm se mostrado úteis para prever prognóstico desfavorável em crianças com tumor cortical da suprarrenal^{3,9,28,30,31}.

Em crianças, as manifestações precoces da doença, a predominância dos tumores virilizantes e as características histopatológicas sugerem que os tumores do córtex da suprarrenal se originam da zona fetal do córtex da suprarrenal fetal³². A zona fetal representa 85% do córtex da suprarrenal durante o desenvolvimento fetal e possui uma intensa produção de dehidroepiandrosterona, em decorrência de uma alta expressão da enzima 17 α -hidroxilase/17,20 liase (P450C17)³³.

Wieneke *et al.*²⁷ conduziram um importante estudo de avaliação histopatológica e seguimento de 83 crianças com neoplasias do córtex da suprarrenal. Dentre as crianças com Weiss ≥ 3 , apenas 31% apresentaram comportamento clínico maligno com o desenvolvimento de recorrência e/ou metástases. Algumas características foram associadas com uma maior probabilidade de comportamento clínico maligno, dentre elas: peso tumoral maior que 400 g, tamanho tumoral maior que 10,5 cm, invasão de veia cava, invasão capsular e/ou vascular, extensão para tecido adiposo periadrenal, necrose confluyente, atipia nuclear severa, mais que 15 figuras mitóticas por 20 campos de grande aumento e a presença de mitoses atípicas. Na análise multivariada, invasão de veia cava inferior, necrose e índice mitótico aumentado foram independentemente associados com comportamento clínico maligno.

No passado, diferentes sistemas de estadiamento foram utilizados para carcinoma do córtex da suprarrenal, porém nenhum deles se mostrou bem consolidado^{34,35}. Apenas em 2004, a União Internacional contra o câncer através da Organização Mundial de Saúde publicou um sistema de classificação baseado no critério TNM para carcinoma do córtex da suprarrenal, porém esse sistema mostrou-se limitado para diferenciar o prognóstico dos pacientes em estágio III e IV³⁶. Baseado nessa análise, uma nova classificação TNM foi proposta pelo grupo ENSAT

(*European Network for the study of Adrenal Tumors*) (Anexo B). Nessa nova classificação, o estágio III é definido por infiltração local do tumor e/ou presença de trombo na veia cava/renal com ou sem linfonodos positivos, enquanto o estágio IV é definido apenas pela presença de metástases distância⁹.

O prognóstico do carcinoma do córtex da suprarrenal avançado é limitado, o que indica a necessidade de novas alternativas terapêuticas³⁷. O estadiamento é o mais importante fator prognóstico: sobrevida de 82% no estágio I, 61% no estágio II, 50% no estágio III e 13% no estágio IV³⁶. Tumores volumosos (diâmetro >12 cm) estão associados com sobrevida inferior após a ressecção completa. Adicionalmente, um alto índice mitótico, necrose tumoral, figuras mitóticas atípicas e alta positividade para o Ki67 ($\geq 10\%$) têm sido associados com prognóstico desfavorável em adultos^{38,39}. Em pacientes pediátricos com doença localizada, uma idade inferior a três anos, virilização isolada, estágio I, ausência de disseminação tumoral durante a cirurgia e peso tumoral < 200 g foram associados a uma maior probabilidade de sobrevida livre de doença⁴⁰.

A ressecção cirúrgica constitui o tratamento de escolha para o carcinoma do córtex da suprarrenal, sendo a única opção de tratamento curativo⁴¹. Em pacientes com carcinomas em estágios I e II, o tumor pode ser ressecado por cirurgia videolaparoscópica ou aberta, a depender do tamanho do tumor e da experiência do cirurgião⁴². A evolução desses tumores depende do volume de cirurgias de suprarrenal realizadas por ano pelo serviço. Os pacientes com suspeita de carcinoma devem ter seu tratamento restrito a serviços que realizem mais de 20 adrenalectomias por ano e com experiência nesse tipo de cirurgia⁴³.

A maioria dos dados existentes mostra uma alta taxa de recorrência do tumor mesmo após a ressecção completa, mostrando a necessidade de um tratamento

adjuvante. A melhor evidência para o tratamento adjuvante vem de um estudo retrospectivo realizado por Terzolo *et al.*⁴⁴. Nesse estudo o risco de recorrência foi menor no grupo que fez uso de mitotane. A droga mitotane (o, p'-DDD), uma isoforma do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), é a única droga aprovada para o tratamento do carcinoma do córtex da suprarrenal. Ela é utilizada para bloqueio hormonal de neoplasias funcionantes avançadas e possui também atividade adrenolítica direta⁴⁴. Além do mitotane, pode se considerar o uso da radioterapia adjuvante em pacientes com alta probabilidade de recidiva loco regional do tumor como em casos de paciente com ressecção incompleta do tumor (R1) ou ressecção incerta (Rx)⁴⁵.

Em pacientes com doença metastática, se a ressecção cirúrgica completa do tumor e das metástases for possível, ela deve ser realizada e seguida da terapia adjuvante com mitotane. Se a cirurgia não for possível, o tratamento deve ser mantido com o mitotane e, nos casos de doença progressiva e agressiva, o tratamento quimioterápico com drogas citotóxicas deve ser adicionado. Os melhores resultados na taxa de resposta foram relatados no protocolo de Berruti com a combinação do mitotane com etoposide, doxorrubicina e cisplatina. A resposta nesses casos foi de 49%, incluindo cinco pacientes com resposta completa, sendo considerado o tratamento de primeira linha⁴⁶. A terapia citotóxica com estreptozotocina e mitotane foi associada a respostas parciais em somente 36% dos casos representando a segunda linha de tratamento⁴⁷. As terapias alvo moleculares com inibidores de receptores tirosina quinases (por exemplo: anti-EGFR, anti-VEGFs, anti-PDGFR, anti-IGF1R) foram utilizadas em pacientes com doença avançada como terapia de resgate em estudos Fase I e II principalmente⁴⁸⁻⁵¹. Os resultados foram, no entanto, desanimadores com raros relatos de respostas objetivas.

1.2 Patogênese Molecular dos Tumores do Córtex da Suprarrenal

Na última década foram realizados consideráveis avanços no entendimento sobre os mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese dos tumores do córtex da suprarrenal em adultos de diferentes etnias^{30,52-56}. No entanto, os mecanismos moleculares envolvidos com a patogênese dos tumores do córtex da suprarrenal ainda são muito pouco claros. Os estudos iniciais sobre alterações genéticas eram baseados em poucos casos e a investigação era realizada através da pesquisa de genes candidatos. Outra abordagem realizada foi através da elucidação genética de síndromes familiares que tinham predisposição ao carcinoma do córtex da suprarrenal como, por exemplo, a síndrome de Li-Fraumeni, Beckwith-Wiedemann e Gardner⁵⁷.

Um dos mecanismos mais estudados na tumorigênese das lesões do córtex da suprarrenal é a hiperexpressão do fator de crescimento semelhante à insulina tipo II (IGF2). O IGF2 é um potente estimulador do crescimento *in vitro* de linhagens celulares de carcinoma do córtex da suprarrenal⁵⁸. O gene *IGF2* está localizado no cromossomo 11p15 e codifica um fator de crescimento que se expressa unicamente através do alelo paterno, enquanto o alelo materno sofre *imprinting*. Alterações genéticas ou epigenéticas na região 11p15 podem alterar a expressão dos genes *CDKN1C*, *IGF2* e *H19* (estruturalmente organizados em um cluster), aumentando a expressão do *IGF2* e inativando os genes *CDKN1C* e *H19* (regulador negativo do ciclo celular e repressor transcricional do *IGF2*, respectivamente), como acontece nos pacientes com a Síndrome de Beckwith-Wiedemann⁵⁹. Essa síndrome é caracterizada por crescimento aumentado, visceromegalia, macroglossia, hipoglicemia neonatal, anormalidade nos ouvidos e da parede abdominal. As

crianças com essa síndrome têm um risco aumentado de neoplasias como tumor de Wilms, hepatoblastoma, rabdomiosarcoma e carcinoma do córtex da suprarrenal⁶⁰. Estudos envolvendo perfil de expressão gênica (*microarray*) dos tumores do córtex da suprarrenal demonstraram que o *IGF2* representa o transcrito mais hiperexpresso em carcinomas diagnosticados em adultos quando comparados aos adenomas^{54,55,61-64}. O aumento da expressão do *IGF2* nos carcinomas do córtex da suprarrenal de adultos em relação aos adenomas foi confirmado na nossa casuística de tumores do córtex da suprarrenal. No grupo pediátrico, a hiperexpressão do *IGF2* foi identificada em ambos os tumores clinicamente benignos e malignos²⁸. Embora os estudos de *microarray* tenham estabelecido a hiperexpressão do *IGF2* como um marcador para o diagnóstico de carcinomas do córtex da suprarrenal, a expressão do *IGF2* não se mostrou útil para definir prognóstico dentre os pacientes com carcinomas^{54,55,61-64}.

O efeito mitogênico do *IGF2* é mediado através da sua ação autócrina e parácrina no receptor de IGF1 (*IGF1R*)^{58,65}. Demonstramos previamente o aumento da expressão gênica do *IGF1R* em 18 de 27 tumores do córtex da suprarrenal pediátricos²⁸. De forma interessante, o aumento da expressão deste receptor constituiu um marcador prognóstico independente para o desenvolvimento de metástases no grupo pediátrico. Além disso, um inibidor seletivo da atividade de tirosina-quinase do *IGF1R* apresentou efeitos antitumorais em linhagens celulares de tumor do córtex da suprarrenal²⁸.

Um estudo de análise de perfil de expressão gênica com 94 carcinomas do córtex da suprarrenal em adultos demonstrou que os genes *DGL7* e *PINK1*, envolvidos na regulação do ciclo celular, foram diferencialmente expressos entre tumores recorrentes e não recorrentes³⁰. A hiperexpressão do *DGL7* em células

tronco de ratos inibe a diferenciação e estimula o crescimento celular⁶⁶. Além disso, o cálculo da diferença da expressão dos genes *BUB1B* e *PINK1* foi um preditor significativo de redução da sobrevida global dos pacientes³⁰. A importância prognóstica da expressão combinada dos genes *BUB1B* e *PINK1* foi posteriormente validada nos tumores do córtex da suprarrenal de pacientes adultos da nossa coorte⁶⁷.

O carcinoma do córtex da suprarrenal representa a manifestação menos comum (de 3% a 10%) dos pacientes com síndrome de Li-Fraumeni, caracterizada pelo desenvolvimento precoce de vários tipos de tumores como neoplasias de mama, sarcomas, cerebrais e hematológicos⁶⁸. Em 70% dos casos dessa síndrome é possível identificar uma mutação germinativa no gene *TP53* herdada de forma autossômica dominante. A mutação germinativa p.R337H, descrita inicialmente na região sul do Brasil, foi encontrada em 78% das crianças e 13% dos adultos com carcinoma aparentemente esporádico na nossa casuística. Após o diagnóstico da mutação germinativa do *TP53*, os pacientes acompanhados na nossa Instituição são então rastreados anualmente com ultrassonografia (USG) de tireoide, mamografia em mulheres adultas, USG abdominal e pélvico. A forma ideal de rastreamento, bem como o risco-benefício da exposição anual a exames com maior radiação como TC, ainda não estão estabelecidos.

As mutações somáticas do gene *TP53* foram observadas em carcinomas do córtex da suprarrenal esporádicos, mas representam um evento tardio do processo da perda da diferenciação celular⁶⁹. Nos tumores esporádicos, as mutações somáticas do p53 foram identificadas em 25% a 35% dos carcinomas do córtex da suprarrenal e foram associadas a uma significativa redução da sobrevida global em adultos com carcinoma⁷⁰.

A via Wnt/ β -catenina constitui outra via fundamental no desenvolvimento normal do córtex da suprarrenal (regulando o crescimento celular, motilidade e diferenciação)⁷¹. Essa via também colabora para o processo de tumorigênese e sua desregulação é frequente nos cânceres humanos⁷². A proteína Wnt regula pelo menos três vias distintas: a via canônica da β -catenina, da polaridade celular e a via do cálcio^{73,74}.

Na ausência das proteínas Wnt que ativam a via canônica, as proteínas caseína quinase 1 β (CK1 β) e glicogênio sintetase quinase 3 β (GSK-3 β) fosforilam a β -catenina, que sofre ubiquitinação levando a sua degradação pelos proteossomos. Como resultado, os níveis de β -catenina no citoplasma ficam baixos, impedindo a sua migração para o núcleo e consequente ativação dos genes alvos⁷⁵. A via é ativada quando a proteína Wnt se liga a seu receptor transmembrana ‘*Frizzled*’ (Fz) formando com o seu coreceptor [lipoproteína de baixa densidade 5 ou 6 (LRP6/5)] um complexo Wnt-Fz-LRP6/5. A ativação desse complexo recruta a proteína Dishevelled (Dvl), que antagoniza a GSK-3 β por um mecanismo desconhecido e impede a fosforilação e posterior degradação da β -catenina^{72,76}.

Mutações inativadoras no éxon 3 do gene da β -catenina (*CTNNB1*), que codifica um sítio que é fosforilado pela GSK-3 β essencial para a degradação da β -catenina, foram descritas previamente em tumores do córtex da suprarrenal^{56,72,77}. Essas mutações foram descritas com frequência similar em adenomas (27%) e carcinomas (30%) do córtex da suprarrenal⁵⁶. No entanto, quando somente os carcinomas foram estudados, tanto a mutação no gene *CTNNB1* como o acúmulo anômalo da β -catenina por imunohistoquímica se correlacionaram com estadiamento tumoral mais avançado (ENSAT III ou IV), maior escore de Weiss, maior frequência de necrose e mitoses, além de uma diminuição de sobrevida global e livre de doença⁷⁷.

Recentemente, o sequenciamento exômico de 45 carcinomas do córtex da suprarrenal identificou alterações em genes previamente conhecidos (*CTNNB1*, *TP53*, *CDKN2A*, *RBI* e *MEN1*) e em genes ainda não descritos (*ZNRF3*, *DAXX*, *TERT* e *MED12*)⁷⁸. O gene *ZNRF3* codifica uma ubiquitina ligase E3 presente na superfície celular que age como um regulador negativo da sinalização da via Wnt/ β -catenina através da degradação do receptor *Frizzled*⁷⁹. O *ZNRF3* foi o gene mais frequentemente alterado, com a presença de deleções em homozigose em 19 (21%) dos 45 tumores sequenciados⁷⁸. Desta forma, a inativação do gene *ZNRF3* pode representar um novo mecanismo para ativação da via *Wnt*⁷⁸.

1.3 microRNAs: Regulação Epigenética em Tumores do Córtex da Suprarrenal

Os microRNAs (miRNAs) são integrantes importantes do processo de tumorigênese. Os miRNAs constituem uma classe de pequenos ácidos ribonucleicos (RNAs) não-codificáveis capazes de reprimir a expressão de determinados genes alvo ao ligarem-se à sequências complementares existentes na região 3' não-traduzível do RNA mensageiro (RNAm)⁸⁰. Eles formam uma importante classe de reguladores que participam de inúmeras funções biológicas, incluindo desenvolvimento, proliferação celular, diferenciação e apoptose. Os miRNAs estão envolvidos na patogênese de muitas doenças, incluindo as neoplasias devido ao seu papel crucial na modulação epigenética da expressão gênica⁸¹.

O processamento dos miRNAs se inicia no núcleo da célula com a transcrição dos genes codificadores de miRNAs pela enzima RNA polimerase II em uma estrutura de fita única com formato de uma “alça” ou “grampo” (pri-miRNA). O próximo passo é o processamento do pri-miRNA pela enzima Droscha e pelo produto

do gene *DGRC8* (os quais juntamente integram um complexo microprocessador) em pre-miRNA (fita de mais ou menos 60 nucleotídeos dobrada em uma estrutura em forma de grampo) (Figura 1). O pre-miRNA é transportado ao citoplasma da célula através de uma proteína da membrana nuclear denominada Exportina 5 (EXPO-5). No citoplasma, o pre-miRNA é clivado pela enzima DICER1 em cooperação com seu cofator TRBP, formando uma fita de mais ou menos 20 a 22 nucleotídeos, o miRNA maduro. Uma vez liberado no citoplasma, o miRNA maduro liga-se a um conjunto de proteínas denominado “complexo silenciador induzido por RNA” (RISC). Guiado pelo reconhecimento de sequências complementares localizadas na região 3’UTR, o miRNA permite a ligação do complexo RISC a um RNAm específico. Um mesmo RNAm pode apresentar vários sítios de pareamento na sua região 3’UTR, permitindo a ligação de várias cópias de um mesmo miRNA. Do mesmo modo, miRNAs diferentes são capazes de inibir com graus de eficiência diferentes um mesmo RNAm⁸².

Os miRNAs coordenam a expressão de um extenso grupo de genes, modulando o transcriptoma de mamíferos. A redução da biosíntese de miRNAs, como nos modelos animais de *knockout* da Dicer, é letal em virtude de defeitos na proliferação e diferenciação de células tronco embrionárias^{83,84}.

Figura 1 - Representação esquemática do processo de biogênese dos miRNAs nos humanos. miRNAs são pequenos RNAs não-codificáveis com cerca de 20-25 nucleotídeos que desempenham um importante papel na regulação da expressão gênica. Eles são expressos no núcleo como qualquer outro gene. Passo 1: A enzima RNA polimerase tipo II é responsável pela transcrição reversa do gene, formando o transcrito primário no núcleo. Passo 2: O transcrito primário (Pri-miRNA) é clivado no núcleo pela enzima DROSHA (RNASEN) juntamente com seu cofator DGCR8. Passo 3: O Pré-miRNA é formado. Passo 4: O Pré-miRNA é exportado ao citoplasma pela proteína Exportina 5, processo que requer uma proteína nuclear relacionada a Ras (RAN). Passo 5: O Pré-miRNA é processado pela enzima DICER1 e seu cofator TRBP para formar o miRNA maduro, que então interage com o RISC (Passo 6) e se liga à sequência complementar de RNAm alvo (Passo 7), finalmente levando ao bloqueio da expressão proteica, por meio da repressão translacional ou clivagem do RNAm. RNA pol II, Enzima RNA polimerase Tipo II; RNASEN (também conhecida como DROSHA), ribonuclease nuclear tipo III; DGCR8, região do gene 8 crítica para síndrome de Di George (cofator de RNASEN); RAN, proteína nuclear relacionada a Ras; *Pri-miRNA*, transcrito primário de miRNA; TRBP, proteína de transativação ligadora de RNA; *Pre-miRNA*, molécula precursora de miRNA; dsRNA, RNA de dupla hélice; RISC, complexo silenciador induzido por ribossomo; AGO, proteínas membro da família de proteínas Argonauta; GEMIN3, GEMIN 4 E GW-182, cofatores das proteínas da família argonauta [Modificado de Heravi-Moussavi *et al.*⁸⁵]

A primeira evidência que os miRNAs estariam envolvidos com a patogênese das neoplasias em humanos veio da observação de que eles estavam localizados em regiões frágeis dos cromossomos, no entanto, apenas em 2002 ocorreu a primeira demonstração de um perfil de expressão de miRNAs em determinado tipo de neoplasia: pacientes diagnosticados com leucemia linfóide crônica e deleção na

região 13q14 apresentavam uma baixa expressão do *miR-15* e *miR-16*⁸⁶. Posteriormente, observou-se que a análise de expressão de miRNAs em diferentes tecidos tumorais poderia ser capaz de distinguir amostras de tumores da mesma linhagem ou classificar amostras de tecidos tumorais pobremente diferenciados de acordo com sua origem⁸⁷.

Desde então, vários estudos estão sendo realizados para determinar os diferentes perfis de expressão dos miRNAs nos diversos tumores humanos. O perfil de expressão dos miRNAs pode classificar os tumores quanto ao prognóstico, risco de recorrência e resposta às terapias⁸⁸. Além disso, a classificação das amostras de tumores baseadas em seu perfil de expressão de miRNAs pode auxiliar no diagnóstico. De uma forma global, o perfil expressão gênica de miRNAs em tumores humanos tem sido caracterizado por uma redução global da expressão de miRNAs^{87,89,90}. Na verdade, assinatura gênica de miRNAs tem sido útil na classificação e determinação do prognóstico em tumores malignos^{74,90}. Como os miRNAs são mais estáveis que os RNAm, eles podem ser medidos diretamente no plasma e urina, e auxiliar no diagnóstico de forma menos invasiva⁹¹.

Os miRNAs atuam de forma específica em cada tecido, portanto o mesmo miRNA pode funcionar como supressor tumoral em um tecido e como oncogene em outro tipo de tecido^{73,92}.

Entre os miRNAs hiperexpressos em tumores do córtex da suprarrenal estão o *miR-483-3p* e *miR-483-5p*, transcritos a partir do gene *miR483*⁹³. A inibição desses miRNAs resultou em significativa redução da proliferação celular *in vitro*⁹⁴. O gene *miR-483* está localizado no segundo intron do gene *IGF2*, o gene mais diferencialmente expresso em carcinomas do córtex da suprarrenal^{95,96}.

Soon *et al.*⁹⁷ analisaram a expressão de miRNAs em tumores do córtex da suprarrenal e evidenciaram a redução da expressão do *miR-335* e *miR-195* em carcinomas de adultos quando comparados a adenomas. Adicionalmente, a menor expressão do *miR-195* e a maior expressão do *miR-483-5p* foram associados a uma menor sobrevida em pacientes com carcinoma^{95,93}.

Recentemente, uma análise de 36 amostras (10 córtex de suprarrenais normais, 10 adenomas não secretores, 10 adenomas secretores e sete carcinomas) identificou uma expressão diferente de 22 miRNAs, com 14 deles expressos preferencialmente em carcinomas (Quadro 2). Os miRNAs hiperexpressos nos carcinomas em relação aos adenomas incluíram os *miR-184*, *miR-503* e *miR-210*. Os miRNAs hipoexpressos foram *miR-511*, *miR-214* e *miR-375*. Os *miR-184*, *miR-503* e *miR-511* foram capazes de distinguir tumores benignos de malignos com especificidade de 80-97% e sensibilidade de 100%⁹⁸.

Um estudo recente de sequenciamento de nova geração realizado em 45 amostras de carcinomas do córtex da suprarrenal identificou três *clusters* que juntamente com outras alterações moleculares se correlacionaram com o comportamento clínico dos tumores. Além do *miR-483-5p*, o cluster dos *miR-506-514* também foi hiperexpresso em carcinomas recorrentes⁷⁸.

Quadro 2 -miRNAs desregulados em carcinomas do córtex da suprarrenal

miRNA	Hiper ou hipoexpressão em carcinomas	Genes Alvo	Mecanismo Alterado	Referência
<i>miR483-3p</i>	Hiperexpresso	<i>PUMA</i>	Apoptose	Ozata <i>et al.</i> ⁹³
<i>miR483-5p</i>	Hiperexpresso		Processamento de miRNAs	Ozata <i>et al.</i> ⁹³
<i>miR-503</i>	Hiperexpresso	<i>DICER1/ TARBP2</i>	Processamento de miRNAs	Yang <i>et al.</i> ⁹⁹
<i>miR-195</i>	Hipoexpresso	<i>DICER1/ TARBP2</i>	Processamento de miRNAs	Caramuta <i>et al.</i> ¹⁰⁰
<i>miR-497</i>	Hipoexpresso		Processamento de miRNAs	Caramuta <i>et al.</i> ¹⁰⁰
<i>miR-335</i>	Hipoexpresso	<i>DICER1/ TARBP2</i>	Processamento de miRNAs	Caramuta <i>et al.</i> ¹⁰⁰
<i>miR-99a</i>	Hipoexpresso	<i>IGF1R/ mTOR</i>	Sinalização	Doghman <i>et al.</i> ¹⁰¹
<i>miR-100</i>	Hipoexpresso	<i>IGF1R/ mTOR</i>	Sinalização	Doghman <i>et al.</i> ¹⁰¹

Doghman *et al.*¹⁰¹ avaliaram o papel dos miRNAs em 25 tumores do córtex da suprarrenal pediátricos. Neste estudo, os *miR-99-a* e *miR-100* estavam hipoexpressos nos tumores corticais em relação ao córtex de suprarrenais normais¹⁰¹. Estudos funcionais *in vitro* demonstraram que a hipoexpressão dos *miR-99a* e *miR-100* promoveu a ativação das vias de sinalização do IGF1R e mTOR¹⁰¹. Contudo, em decorrência do limitado número de casos, não foi possível identificar miRNAs diferencialmente expressos entre tumores pediátricos com evolução benigna e maligna.

Figura 2 - Mecanismos de regulação dos miRNAs. A diminuição da expressão dos miRNAs no câncer pode ser devido a: alterações cromossômicas, mutações, polimorfismos, defeito na maquinaria responsável pela sua biogênese e alterações epigenéticas.; Pol II- Enzima RNA polimerase tipo II; Pri-miR- transcrito primário do miRNA; Drosha: Endoribonuclease tipo III; Pre-miR- Precursor de miRNA [Modificado de Iorio *et al.*⁹¹]

A expressão dos miRNAs pode estar alterada nos tumores humanos por vários mecanismos (Figura 2): (1) anormalidades cromossômicas, como sugerido por estudos que mostram que os genes dos miRNAs podem estar em regiões com alterações genéticas vistas no câncer e confirmada por estudos em carcinomas de ovário, câncer de mama e melanoma¹⁰²; (2) mutações nos transcritos primários como visto em casos de leucemia linfóide crônica¹⁰³; (3) polimorfismos, descritos em câncer de pulmão; (4) defeitos na “maquinaria” da biogênese dos miRNAs em decorrência de desregulação na expressão das enzimas DROSHA e DICER¹⁰⁴⁻¹⁰⁷; ou (5) alterações epigenéticas, como metilação do ácido desoxirribonucleico (DNA)¹⁰⁸.

1.4 Complexo DICER1-TRBP e Seu Papel na Tumorigênese

A DICER1 é uma endoribonuclease da família RNase III que pode ser considerada enzima protagonista no processo de biogênese dos miRNAs maduros. Em humanos, o gene *DICER1* está localizado no cromossomo 14q32.13 e possui 27 éxons. A DICER1 é uma enzima citoplasmática com 219 KDa e vários domínios dispostos em uma estrutura terciária organizada¹⁰⁹. Em uma extremidade da enzima, estão intimamente conectados o domínio PAZ e a plataforma dos domínios que envolvem as extremidades de ligação 3' e 5'. Na outra metade do seu “corpo” em forma de “L” estão os domínios RNase IIIa e IIIb que formam um dímero intramolecular e constituem um núcleo catalítico, com cada um de seus domínios sendo responsável pela clivagem de uma das fitas do substrato de RNA sobre qual ela atua. A atividade dessa enzima requer a presença de íons magnésios na interface entre os centros catalíticos, uma área altamente conservada entre as enzimas RNases (especificamente os resíduos E1330, E1564, D1709 e E1813). Existe um ligante entre o núcleo catalítico e as extremidades dos domínios de ligação que inclui um conector helicoidal. Os resíduos de fosfato da fita de RNA estão ao longo do conector helicoidal e ligados ao corpo do “L”, seguindo um caminho para a superfície carregada positivamente que parece ser o canal de reconhecimento do substrato. O conector funciona também posicionando o pre-miRNA através do centro catalítico de acordo com as extremidades 3' e 5', determinando o tamanho dos microRNAs formados através da clivagem realizada pela DICER1. Em mamíferos, a DICER1 forma um heterodímero transativado com a proteína TRBP, que é codificada pelo gene *TARBP2**. Esse conjunto possui várias funções como o

* Nomenclatura adotada será *TARBP2* para o gene e TRBP para a proteína.

reconhecimento e direcionamento dos distintos substratos da enzima até integrar o complexo proteico silenciador da tradução¹¹⁰.

A DICER1, portanto, representa um modulador crucial da expressão de RNAm, por meio da síntese de miRNAs que são importantes reguladores pós-transcricionais da expressão gênica. Apenas uma mutação em qualquer um dos componentes da “maquinaria” de processamento dos miRNAs tem o potencial de modificar o perfil completo de expressão de miRNAs em uma célula ou tecido. Esse fato motivou vários grupos a estudar os efeitos das variações dessa enzima, e também de outros integrantes da ‘maquinaria’ do processamento dos miRNAs, na incidência e evolução de vários tipos de câncer. Os baixos níveis de expressão do RNAm da *DICER1* se correlacionaram com um pior prognóstico nos seguintes tumores: câncer de pulmão, câncer de mama, câncer de ovário, adenocarcinoma endometrial e pele^{104,107,111-113}.

Recentemente, Krill *et al.*¹¹⁴ demonstraram a importância da Dicer no desenvolvimento do córtex de suprarenal de ratos. A deleção da *Dicer1* é letal em embriões de ratos, e a sua deleção específica no córtex de suprarenal resultou em mortalidade perinatal e falência do córtex de suprarenal no final da gestação. As suprarenais com *knouckt* específico da *Dicer1* tiveram perda significativa da expressão do Fator esteroideogênico tipo 1 (SF1). Consistente com a ausência de Dicer, houve a diminuição da degradação de RNAm mediada por miRNAs. Em conjunto, estes dados sugeriram um papel da regulação mediada por miRNAs para o crescimento normal e homeostase da suprarenal¹¹⁴.

A DICER1 destaca-se como o único membro da via de processamento de miRNAs no qual mutações germinativas foram associadas com alguma condição

clínica. Mutações germinativas em heterozigose no gene da *DICER1* foram inicialmente identificadas em 11 crianças com blastomas pleuropulmonares familiares, um tumor raro, proveniente do mesênquima pulmonar e precoce na infância¹¹⁵. Todas essas crianças possuíam história familiar de blastoma pleuropulmonar ou uma síndrome displásica familiar que inclui uma variedade de tumores como nefroma cístico¹¹⁶, tumores ovarianos de células do cordão estromal (principalmente as células de Sertoli/Leydig)^{117,118} e bócio multinodular¹¹⁸.

Recentemente, mutações somáticas *missense* recorrentes no domínio de clivagem RNase IIIb da enzima DICER1 foram identificadas em tumores de ovários não-epiteliais esteroideogênicos (tumores de células Sertoli-Leydig, tumores de células granulosas e de saco vitelino). A avaliação inicial por sequenciamento paralelo de última geração evidenciou quatro mutações *missense* da *DICER1* no resíduo D1709. O resíduo D1709 está dentro de um domínio de resíduos ácidos que são responsáveis pela ligação de metais no centro catalítico do domínio da RNase IIIb. Posteriormente, mutações do gene *DICER1* foram identificadas em 30 de 102 tumores ovarianos não-epiteliais (29%). A maioria destas variações genéticas foram mutações *missense* e estavam todas localizadas nos domínio de ligação de metais do sítio catalítico RNase IIIb, que é essencial para interação e processamento de miRNAs⁸⁵ (Figura 3). Mutações somáticas da *DICER1* foram também identificadas em dois de cinco rabdomiosarcomas embrionários⁸⁵. Apesar da adequada cobertura da sequência, não foram observadas mutações no domínio RNase IIIa da DICER1.

Figura 3 - Representação das mutações encontradas no domínio de clivagem RNase IIIb da *DICER1*, codificado pelos exons 23-25. As mutações foram identificadas em 4 regiões *hot-spot* (resíduos 1702, 1705, 1810 e 1813), que correspondem aos sítios de ligação de metais. A maioria destas variações genéticas foram mutações *missense* [Modificado de Heravi-Moussavi *et al.*⁸⁵].

Estudos de clivagem de RNA demonstraram que a atividade da *DICER1* contendo as mutações *hot-spot* D1709N, D1709E e E1705K está reduzida, mas não completamente abolida. A ação da *DICER1* selvagem promove a formação de dois produtos de miRNA, contendo 22 (ação do sítio RNase IIIb) e 18 nucleotídeos (ação do sítio RNase IIIa). As proteínas mutantes levaram a uma clivagem anômala dos miRNA, com o produto de 22 nucleotídeos estando significativamente reduzido⁸⁵. Estes achados sugerem que mutações no domínio RNase IIIb do gene *DICER1* ocasionam um processamento anormal de miRNAs, podendo também interferir no acoplamento do miRNA ao complexo RISC de degradação.

De forma interessante, a desregulação do processamento de miRNAs em células cancerosas devido ao silenciamento da *DICER1* propiciou a emergência de células com fenótipo mais agressivo, acelerando a progressão tumoral¹¹⁹. A redução

da expressão da *DICER1* foi causada pela hiperexpressão do *miR-103* e *miR-107*. A hiperexpressão do *miR-103* e *miR-107* se correlacionou com prognóstico desfavorável e metástase em câncer de mama¹¹⁹.

Baseado em dados prévios demonstrando que a redução da expressão da *DICER1* se correlacionou com prognóstico desfavorável em câncer epitelial de ovário¹⁰⁴, mutações na *DICER1* foram também investigadas em uma série de 266 tumores, incluindo câncer epitelial de ovário e endometrial. Apenas uma mutação somática no sítio de ligação de metal da *DICER1* (E1813G) foi identificada em um caso de coriocarcinoma de ovário⁸⁵. Mutações no gene *DICER1* não foram descritas no banco de dados 1000 *Genomes Project Data* ou no banco de dados públicos do *Cancer Genome Atlas Consortium*⁸⁵. Adicionalmente, mutações recorrentes na *DICER1* não foram descritas no banco de dados *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer* (COSMIC), no qual somente quatro de 938 cânceres apresentam mutações somáticas da *DICER1*, mas não localizadas nos domínios de clivagem RNase IIIb ou RNase IIIa equivalentes¹²⁰.

Melo *et al.*¹²¹ estudaram enzimas envolvidas no processamento de miRNA em linhagens celulares com instabilidade cromossômica. Os genes analisados incluíam membros da família de endonucleases da RNase tipo III (*DICER1* e *DROSHA*), de proteínas ligadoras que tem ação catalítica (*DGCR8*, *TRBP* e *PACT*) e membros da família Argonaute (*AGO1*, *AGO2* e *AGO4*). Foram encontradas duas mutações *frameshift* no gene *TARBP2*: uma deleção na repetição (C)₅ do éxon 5 em linhagens celulares de câncer colorretal (Co115) e uma inserção na repetição de (C)₇ do éxon 5 em algumas linhagens celulares de câncer endometrial (SKUT-1B). A expressão da proteína TRBP nessas linhagens estava reduzida, corroborando os achados anteriores.

As células deficientes em TRBP apresentaram uma diminuição de 90% de eficiência no processamento de miRNAs. Além disso, mutações inativadoras da TRBP, que é essencial para a função da DICER1, promoveram uma desregulação no processamento de miRNAs em células tumorais levando à transformação celular.

Um estudo recente demonstrou a desregulação do cofator TRBP e de seu gene *TARBP2* nos carcinomas do córtex da suprarrenal. Tanto a proteína TRBP como o seu gene estavam hiperexpressos nos carcinomas em relação a adenomas do córtex da suprarrenal em uma amostra de 34 tumores (17 adenomas e 17 carcinomas)¹⁰⁰. Através de uma análise *in silico* usando o TargetScan[†], o *miR-497* foi identificado como um potencial regulador da expressão do gene *TARBP2*. A expressão do *miR-497* estava significativamente reduzida em carcinomas do córtex da suprarrenal¹⁰⁰.

Os achados descritos em outros tipos de neoplasias sugerem uma associação de mutações da *DICER1* com tumores de origem embrionária ou primitiva. Levando-se em consideração que os tumores do córtex da suprarrenal são esteroidogênicos a semelhança dos tumores de Leydig, e que provavelmente possuem uma origem embrionária no grupo pediátrico (12% dos casos são diagnosticados no primeiro ano de vida ou período neonatal), investigamos alterações genéticas da *DICER1* e do seu cofator *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos. Além disso, avaliamos a expressão gênica e proteica da DICER1 e TRBP, bem como determinamos a expressão de miRNAs provavelmente relacionados com a regulação da expressão dos genes *DICER1* e *TARBP2*.

[†] <http://www.targetscan.org>.

2 OBJETIVOS

- a) Estudar a expressão da *DICER1* e *TARBP2* ao nível de RNAm e proteína em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.
- b) Investigar variantes genéticas no domínio de clivagem RNase IIIb do gene *DICER1* e no éxon 5 do gene *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.
- c) Determinar a expressão dos *miR-103* e *miR-107*, reguladores da expressão da *DICER1*, em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.
- d) Determinar a expressão do *miR-497*, regulador da expressão da *TARBP2*, em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.
- e) Correlacionar os achados moleculares com as características clínicas, diagnóstico histológico e evolução dos tumores do córtex da suprarrenal.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq), da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (processo nº 04331813.7.0000.0068). O termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi assinado por todos os pacientes ou responsáveis (Anexos de C a G). Os estudos moleculares foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM 42, Divisão de Endocrinologia e Metabologia do Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

3.2 Pacientes

Foram selecionados tumores do córtex da suprarrenal no período de 1979 a 2007 (Figuras 4 e 5). Os pacientes foram submetidos à avaliação hormonal e realização de exames de imagem (ultrassonografia, TC e/ou RM). O diagnóstico de tumores funcionantes foi estabelecido a partir da determinação do cortisol urinário em amostras de 24 h, avaliação da supressão do cortisol sérico após 1 mg de dexametasona, dosagem de ACTH, andrógenos (testosterona, androstenediona, dehidroepiandrosterona [DHEA] e seu composto sulfatado), precursores esteroidais (17OH-progesterona e 11-deoxicortisol), estradiol, aldosterona e atividade plasmática de renina (Quadro 1).

Os tumores do córtex da suprarrenal em pacientes adultos foram classificados de acordo com os critérios histopatológicos de Weiss: adenomas do córtex da suprarrenal (escore de Weiss ≤ 2) e carcinomas do córtex da suprarrenal (escore de Weiss ≥ 3)¹⁹. No grupo pediátrico (< 15 anos), observamos que 54% dos tumores adrenocorticais com escore de Weiss > 2 apresentaram evolução clínica benigna, confirmando que os critérios histopatológicos de Weiss não são preditivos de malignidade em crianças^{26,27,122}. Consequentemente, os tumores do córtex da suprarrenal pediátricos foram classificados em clinicamente benignos ou clinicamente malignos²⁷. O comportamento clínico de malignidade no grupo pediátrico foi estabelecido a partir do estadiamento avançado (III ou IV) ou evolução clínica desfavorável. O gene supressor tumoral *Tp53* foi estudado previamente em 22 crianças e 26 adultos com tumores do córtex da suprarrenal. A mutação germinativa Arg337His do p53 foi identificada em 77% e 12% das crianças e adultos, respectivamente. Erro nas figuras 4 e 5 “análise de RNAm” ao invés de “análise da RNAm”.

Figura 4 - Coorte de tumores do córtex da suprarrenal em adultos para a análise de imunohistoquímica, DNA e cDNA tumorais, IHQ, imunohistoquímica

Figura 5 - Coorte de tumores do córtex da suprarrenal em crianças para a análise de imunohistoquímica, DNA e cDNA tumorais. TMA, micromatriz tecidual; IHQ, imunohistoquímica; CB, tumores clinicamente benignos; CM, tumores clinicamente malignos

3.3 Métodos

3.3.1 Micromatriz Tecidual (TMA) e Imunohistoquímica

Os procedimentos abaixo descritos foram realizados no Laboratório de Investigação em Patologia Hepática LIM 14 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Para a construção do TMA, cortes histológicos representativos dos casos, corados pela Hematoxilina e Eosina foram revisados e as áreas de interesse foram selecionadas nas lâminas. As mesmas áreas foram marcadas nos respectivos blocos de parafina doadores dos tecidos. Cilindros de 1,0 mm de diâmetro das áreas marcadas nos blocos de parafina doadores foram transportados para um bloco de parafina receptor através de um sistema mecanizado de precisão (*Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA*), com um intervalo de 0,3 mm entre os cilindros. Cada cilindro foi alocado numa posição do bloco receptor definida em um sistema cartesiano de coordenadas, com o conjunto das amostras constituindo uma TMA com 13 linhas e 16 colunas. No total, o TMA construído contém 208 posições (205 amostras de 202 casos, com uma amostra por caso, tendo três pacientes amostras em

duplicata e um paciente com perda de representatividade por tratar-se de tecido hepático). Houve uma perda de 5% da representatividade, restando 198 casos para análise. Duas amostras de tecido renal normal foram usadas para determinar o posicionamento do TMA. O bloco de TMA foi então cortado em secções histológicas numeradas e consecutivas de 3µm (*Leica Instruments, Singapore*). Outros dois blocos de TMA semelhantes foram feitos para se obter duas triplicatas, uma para cada tipo de anticorpo (anti-DICER1 e anti-TRBP) (Tabela 1).

Tabela 1 - Características clínicas dos 198 pacientes com tumores do córtex da suprarrenal incluídos na micromatriz tecidual (TMA)

	Crianças		Adultos	
	CB (n=36)	CM (n=8)	Adenomas (n=75)	Carcinomas (n=79)
Idade (anos) ^(A)	2,6 ± 0,4	3,6 ± 0,9	44 ± 1,9	40 ± 1,8
Sexo (F:M)	1,7 : 1	1,7 : 1	6,5 : 1	3,5 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	127 ± 14	44 ± 20	77 ± 7,4	53 ± 7,5
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	1	0	47	13
Virilizante	25	3	2	9
Mista	10	5	0	33
Não funcionante	0	0	22	16
Outras	0	0	0	2
Não disponível	0	0	4	5

(A): Média ± EPM; CB: clinicamente benigno; CM: clinicamente maligno; Ad: adenoma; Ca: carcinoma.

Os anticorpos utilizados foram anti-DICER1, anticorpo de coelho policlonal, com título de 1/100 (HPA 000694, *Sigma Life Science, St. Louis, United States*) e anti-TRBP, anticorpo de coelho policlonal, com título 1/50 (ab72547, *Abcam, Cambridge, Reino Unido*). O controle positivo do anti-DICER1 foi mucosa normal de estômago e do anti-TRBP foi córtex de suprarrenal normal.

Para realização do procedimento de imunohistoquímica das lâminas de TMA, foram seguidas as seguintes etapas enumeradas e descritas abaixo:

1. Desparafinização dos cortes de 3µm de espessura, do material incluído em parafina; incubação com xilol a 60°C por 15 minutos, seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos.
2. Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com três banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos; posteriormente, lavagem em água corrente e água destilada.
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de ácido cítrico 10 mM pH 6,0 (*Merck, Darmstadt, Alemanha*) em panela a vapor, após a fervura da água da panela, a cuba com as lâminas foram colocadas em solução de recuperação, por 40 minutos e, após, para resfriar por 20 minutos à temperatura ambiente; lavagens em água corrente e água destilada.
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada; lavagens em água corrente e água destilada; lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por cinco minutos.
5. Bloqueio de proteínas inespecíficas com Cas Block™ (*Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA*) por 10 minutos a 37°C; incubação com o anticorpo primário.
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (*Sigma, St Luis, MO, EUA*) 1,0% e azida sódica NaN₃ (*Inlab, São Paulo, Brasil*) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4°C; lavagens em tampão PBS com três trocas de cinco minutos cada.

7. Incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block*, *NovoLink Max Polymer Detection System*, *Vision Biosystems™*, *Reino Unido*), por 30 minutos a 37°C; lavagens com tampão PBS com três trocas de três a cinco minutos cada.
8. Incubação com NovoLink (Polímero) do mesmo kit por 30 minutos a 37°C; lavagens com tampão PBS com três trocas de três a cinco minutos.
9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (*Sigma*, *St Luis*, *MO*, *EUA*) a 0,06%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfóxido (*Labsynth*, *São Paulo*, *Brasil*) a 1% em PBS, em banho de cinco minutos, a 37°C; lavagens em água corrente e água destilada.
10. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por um minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (sol. de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.
11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de um minuto cada), diafanização em três banhos de xilol e montagem em meio permanente (*Merck*, *Darmstadt*, *Alemanha*) com lamínula.

Os controles utilizados na reação imunohistoquímica foram um controle positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imunohistoquímicos.

Em cada cilindro de amostras tumorais, foram avaliados a imunorreatividade do compartimento citoplasmático para os anticorpos anti-DICER1 e anti-TRBP. Na análise das reações, consideramos a marcação somente no compartimento citoplasmático. As lâminas de TMA para o anticorpo anti-DICER1 foram analisadas pelos patologistas Dra. Maria Cláudia Zerbini e Dr. Iberê Cauduro Soares, para determinar o coeficiente de variabilidade interobservador. As lâminas de TMA para o anticorpo anti-TRBP foram analisadas somente pela patologista M.C.N.Z. A intensidade da imunorreatividade foi avaliada em uma escala de zero a três (0 ausente, 1 fraco, 2 moderado e 3 intenso). O percentual de células tumorais positivas foi calculado para cada amostra: 0%, escore 0; 1 a 25%, escore 1; 26 a 50%, escore 2; 51-75% escore 3, escore 4, 76-100%. A partir da soma da intensidade e percentual de positividade, obtivemos um escore final semiquantitativo (variando de zero a sete). A mediana do escore final foi utilizada como ponto de corte para diferenciar uma expressão fraca de uma expressão forte. Para a DICER1, um escore final variando de 0 a 3,4 foi definido como expressão fraca e um escore $\geq 3,5$ expressão forte. Para a TRBP, um escore final variando de 0 a 4,9 foi definido como expressão fraca e um escore $\geq 5,0$ expressão forte. Como cada amostra tumoral foi analisada em triplicata, a média dos três valores obtidos representou o escore de imunorreatividade para cada patologista. O escore de imunorreatividade final foi calculado a partir da média da análise dos dois patologistas. O coeficiente de reprodutibilidade interobservador (Kappa) foi 0,72 para a DICER1 ($p < 0,0001$). Um coeficiente Kappa $> 0,61$ é considerado uma concordância substancial.

3.3.2 Estudos moleculares

3.3.2.1 Extração de RNA

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual e armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de RNA. O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos congelados em nitrogênio líquido utilizando-se o método do Trizol Reagente (*Invitrogen, Carlsbad, CA, E.U.A.*). A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir da relação de absorbância $A_{260/280}$ e da integridade das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,8 em todas as amostras. As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em nanofotômetro.

3.3.2.2 Expressão de RNAm por Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) quantitativa em tempo real

O estudo da expressão gênica para RNAm foi realizado em 84 pacientes não relacionados com tumores do córtex da suprarrenal diagnosticados em 23 crianças e 61 adultos (Tabela 2). A maioria dos pacientes (75%) está inclusa no grupo de 198 pacientes incluídos no TMA e apresenta características clínicas e demográficas semelhantes ao grupo de pacientes que tiveram as amostras dos seus tumores incluídas no TMA (Figuras 4 e 5).

Tabela 2 - Características clínicas dos 84 pacientes com tumores do córtex da suprarrenal incluídos na análise da expressão gênica

	Crianças		Adultos	
	CB (n= 18)	CM (n= 5)	Adenomas (n= 31)	Carcinomas (n= 30)
Idade (anos) ^(A)	3,1 ± 0,7	3,2 ± 0,7	38,7 ± 2,8	35,4 ± 2,8
Sexo (F:M)	2,0 : 1	4,0 : 1	14,5 : 1	43,3 : 1
Seguimento (meses) ^(A)	100 ± 14	31 ± 12	71 ± 12	53 ± 13
Síndrome clínica <i>n</i>				
Cushing	1	0	18	7
Virilizante	12	3	0	3
Mista	5	2	1	13
Não funcionante	0	0	8	4
Outras	0	0	0	2
Não disponível	0	0	4	1

(A): Média ± DP; CB: clinicamente benigno; CM: clinicamente maligno; Ad: adenoma; Ca: carcinoma.

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa (RT) utilizando-se o produto comercial *Superscript III FirstStrand S* (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho ABI Prism 7000 (*AppliedBiosystems, Forster City, CA, EUA*) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema Taqman (*AppliedBiosystems*). Os ensaios Taqman para os genes alvos *DICER1* (ensaio Hs00998580_m1), *TARPB2* (ensaio Hs00998379_m1) e endógenos *GUSB* (*beta-glucoronidase*) e *ACTB* (*beta-actina*) contém oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas interexônicas para o fragmento amplificado, que garantem a não amplificação de DNA genômico. As sondas dos genes alvos são marcadas com a fluorescência FAM, enquanto a sonda da *beta-glucoronidase* e *beta-actina* são marcadas com VIC. Estas sondas incitam comprimentos de ondas distintos, que emitem sinais captados pelo aparelho.

Durante a reação de PCR, o ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassar o limiar de detecção da fluorescência (C_T) foi determinado e utilizado

para quantificação da expressão gênica. As reações de amplificação foram realizadas em uma etapa inicial de 95°C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95°C por 15 s e 60°C por 10 min. A amplificação dos genes alvos foi normalizada pelas condições de amplificação dos controles endógenos, *GUSB* e *ACTB* em cada amostra tumoral. Um grupo comercial de córtex de glândulas adrenais normais (*Human Adrenal Cortex RNA, Clontech, Palo Alto, CA, EUA*) foi utilizado como amostra de referência na análise da quantificação relativa. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ¹²³, onde o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno (média dos dois genes usados) de uma determinada amostra (tumor ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ corresponde à diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral e o ΔC_T do calibrador. Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene alvo está expresso no tecido tumoral em relação ao pool de tecido normal. A mediana de expressão foi utilizada como ponto de corte para diferenciar hiperexpressão de hipoexpressão.

A validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foi realizada pela construção de curvas de amplificação com concentrações progressivamente maiores de cDNA a fim de avaliar se as eficiências de amplificação dos genes alvos e endógeno foram comparáveis (inclinação da reta $< 0,1$). A eficiência de amplificação do gene *DICER1*, foi comparável à da *GUSB* e *ACTB* (Gráficos 1 e 2) nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos). A eficiência de amplificação do gene *TARBP2*, de forma semelhante, foi comparável à da *GUSB* e *ACTB* (Gráficos 3 e 4) nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos).

Gráfico 1- Curvas de eficiência de amplificação em *singleplex* da *DICER1* em relação aos gene endógeno *GUSB* (*beta-glicuronidase*)

Gráfico 2 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* da *DICER1* em relação ao gene endógeno *ACTB* (*beta-actina*)

Gráfico 3 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* da *TARBP2* em relação ao gene endógeno *GUSB* (*beta-glicuronidase*)

Gráfico 4 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* da *TARBP2* em relação aos gene endógeno *ACTB* (*beta-actina*)

3.3.2.3 Expressão de miRNAs por RT-PCR em tempo real

O estudo da expressão gênica para miRNAs foi realizado em 82 pacientes não relacionados com tumores do córtex da suprarrenal esporádicos diagnosticados em 23 crianças e 59 adultos. A maioria dos pacientes (75%) está incluída no grupo de 198 pacientes incluídos no TMA e apresentavam características clínicas e demográficas semelhantes ao grupo de pacientes que tiveram as amostras dos seus tumores incluídas no TMA (Figuras 4 e 5).

O cDNA de cada amostra tumoral foi sintetizada por meio do ensaio *TaqManMicroRNA Reverse Transcription* e dos primers *Megaplex RT* (*AppliedBiosystems*). Cada oligonucleotídeo iniciador presente neste ensaio é complementar a um único miRNA maduro. Durante a reação, os oligonucleotídeos específicos assumem uma configuração em grampo (*stem-loop*) ao hibridizarem no miRNA alvo e promovem um alongamento das moléculas que serão sintetizadas. As moléculas de cDNA resultantes da reação de transcrição reversa são mais longas que os miRNAs e podem então ser utilizadas como moldes para o ensaio TaqMan. O cDNA sintetizado então para cada amostra tumoral foi utilizado para determinar a expressão do *miR-103*, *miR-107* e *miR-497*. A partir desta etapa, a metodologia segue o que foi descrito anteriormente na seção sobre PCR quantitativo em tempo real. Foram utilizados os ensaios para a amplificação dos genes alvo *miR-103* (000439), *miR-107* (000443) e *miR-497* (001043) e os genes endógenos *RNU44* e *RNU48*. A validação do método $2^{-\Delta\Delta CT}$ foi realizada pela construção de curvas de amplificação com concentrações progressivamente maiores de cDNA a fim de avaliar se as eficiências de amplificação dos genes alvos e endógeno foram comparáveis (inclinação da reta $< 0,1$). A eficiência de amplificação dos genes *miR-103* e *miR-107*

foi comparável à do *RNU44* e *RNU48* nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos). O *miR-497* não foi expresso no pool de córtex normais de suprarrenais e nem nos tumores (Gráficos de 5 a 8).

Gráfico 5 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do *miR-103* em relação ao gene endógeno *RNU44*

Gráfico 6 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do *miR-103* em relação aos gene endógeno *RNU48*

Gráfico 7 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do *miR-107* em relação aos gene endógeno *RNU44*

Gráfico 8 - Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do *miR-107* em relação aos gene endógeno *RNU48*

3.3.2.4 Extração de DNA

O sequenciamento foi realizado em 83 pacientes não relacionados com tumores do córtex da suprarrenal diagnosticados em 23 crianças e 60 adultos. A maioria dos pacientes (75%) está incluída no grupo de 198 pacientes incluídos no TMA e apresenta características clínicas e demográficas semelhantes ao grupo de pacientes que tiveram as amostras dos seus tumores incluídas no TMA (Figuras 4 e 5).

Os tecidos tumorais dos pacientes foram obtidos através de procedimento cirúrgico e armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de DNA. Aproximadamente 50 a 100 mg de tecido foram separados e transferidos para um tubo previamente colocado no gelo, sendo adicionado *cell lysis solution* (*Genomic DNA isolation kit- Gentra Systems*) e posteriormente *proteinase k solution*. Os tubos foram incubados overnight a 55 graus até completa dissolução dos tecidos. A solução foi posteriormente submetida a tratamento com RNase (*RNase solution*) com subsequente precipitação da proteína (*Precipitation Protein Solution*) para consequente precipitação e hidratação do DNA.

3.3.2.5 Sequenciamento automático pelo método de Sanger

Em cada reação de PCR foram amplificados 100 a 300 ng do DNA genômico utilizando 200 μ M de cada trifosfato de nucleotídeo (dNTP), 20 pmol/ μ L de cada oligonucleotídeo específico, além do tampão (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl₂, 50mM KCl), e Taq DNA polimerase 2,5 U (*Pharmacia, Upsala, Sweden*) para um volume final de 25 μ L.

Os domínios de ligação de metais do sítio catalítico de clivagem RNaseIIIb do gene *DICER1* foram sequenciados utilizando oligonucleotídeos e condições de PCR previamente descritas (Quadro 3). Em resumo, foram utilizados oligonucleotídeos marcados com M13 e as reações de PCR seguiram o protocolo a seguir: denaturação a 94°C por 1 min, seguida de 40 ciclos de PCR (94°C por 30 s, 64°C por 30 s e 72°C por 30 s) com uma fase de extensão final de 72°C por 5min.

O éxon 5 do gene *TARBP2* foi sequenciado utilizando-se oligonucleotídeos previamente publicados: Forward 5'CGGGAGATGGTAGTCAGGAA3' e Reverse 5'CATCCTCATTTCCCATGCATG3', gerando um produto de PCR com 176 pares de bases. O éxon 5 possui três regiões de microsátélites: uma repetição (C)₇ e duas repetições (C)₅. As reações de PCR seguiram o protocolo a seguir: denaturação a 94°C por 1 min, seguida de 35 ciclos de PCR (94°C por 30 s, 55°C por 30 s e 72°C por 30 s) com uma fase de extensão final de 72°C por 5min.

A concentração de DNA dos produtos gerados pela PCR foi estimada através da comparação com fragmentos do marcador de peso molecular de concentração conhecida (ΦX) em gel de agarose. Posteriormente, os produtos de amplificação foram submetidos à purificação enzimática com a combinação das enzimas fosfatase alcalina de camarão (2 U/μl) e exonuclease I (10 U/μl) (*PCR productpre-sequencing kit, Amersham Life Science, Cleveland, E.U.A*) com incubação a 37°C por 15 minutos seguido de 80°C por mais 15 minutos para inativação das enzimas. A reação de sequenciamento foi realizada utilizando o kit *ABI PrismTMBigDyeTerminator* (*Perkin Elmer*) e quantidades variáveis de produto de PCR (10 a 100 ng) de acordo com o tamanho do fragmento. Os produtos desta reação foram submetidos à eletroforese em sequenciador automático *ABI PrismGeneticAnalyzer 3100 automatic*

DNA sequencer. A leitura dos eletroferogramas foi realizada através do programa *Sequencher 4.10.1* (GeneCodes Corporation, Ann Arbor, E.U.A).

Quadro 3 - Oligonucleotídeos utilizados para sequenciar os quatro sítios de ligação de metais do domínio de clivagem RNaseIIIb do gene *DICER1*

Nome	Sequência	Descrição
DICER1_P2-F	TGTAACGACGGCCAGTCTTCTGCACAAGCTTACGGTTCCA	RNaseIIIb (E1705 e D1709)
DICER1_P2-R	CAGGAAACAGCTATGACCCAGCGATGCAAAGATGGTGTGT	RNaseIIIb (E1705 e D1709)
DICER1_TMF	TGTAACGACGGCCAGTGAACTACATCTGTGGACTGCCTG	RNaseIIIb (E1810 e D1813)
DICER1_TMR	CAGGAAACAGCTATGACTTAGTGCCGCATCATGGGATAGT	RNaseIIIb (E1810 e D1813)

3.4 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada utilizando os programas SPSS (*PASW version 19.0*; SPSS Inc., Chicago, IL). Dados contínuos foram expressos por valores de mediana (do mínimo ao máximo). Diferenças nos níveis de expressão entre dois grupos foram analisadas por meio do teste Mann-Whitney *U* de cauda dupla. O teste exato de Fisher ou o teste do χ^2 foi utilizado para investigação de variáveis dicotômicas. A sobrevida global foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico primário e a data do óbito relacionado ao carcinoma do córtex da suprarrenal ou última visita de seguimento. A sobrevida livre de doença foi definida como o tempo entre a data da ressecção tumoral completa e a data da primeira evidência radiológica de recorrência local ou à distância. Todas as curvas de sobrevida foram obtidas por estimativas de Kaplan-Meier e as diferenças entre curvas de sobrevida foram avaliadas pelo teste de *log-rank* Mantel-Cox. Nesse

contexto, a expressão do RNAm ou do miRNA foram consideradas como variáveis categóricas, sendo escolhido o valor da mediana de todas as amostras para cada RNAm ou miRNA como o ponto de corte para definição de hiper ou hipoeexpressão. Fatores preditores de prognóstico foram identificados por meio dos modelos de regressão de riscos proporcionais de Cox, que foi utilizado para estimativa do risco relativo (RR) e seus intervalos de confiança 95% (IC 95%) em análises univariadas e multivariadas. $p < 0,05$ foi considerado significativo. Todos os dados que foram analisados encontram-se no Anexo H.

4 RESULTADOS

4.1 Análise do Gene *DICER1* em Tumores do Córtex da Suprarrenal

4.1.1 Expressão proteica da *DICER1*

Em tumores do córtex da suprarrenal de adultos, uma expressão forte para a *DICER1* foi encontrada em 24 de 75 adenomas (32%) e em 39 de 79 carcinomas (51%; $\chi^2 = 4,8$, $p = 0,028$). Desta forma, a expressão proteica da *DICER1* foi significativamente maior nos carcinomas em relação aos adenomas (Gráfico 9, Figura 6).

Gráfico 9 - Intensidade da imunorreatividade citoplasmática para a *DICER1* [Escore 0-7 resultante da soma da positividade (0-4) e da intensidade (0-3)] em adenomas (n= 75) e carcinomas (n= 79) de adultos. A linha horizontal do box plot representa a mediana, os limites referem-se aos percentis 25 e 75 e as barras incluem os percentis de 10 a 90 dos valores do escore

Figura 6 - (A) Imunorreatividade forte (escore 6) para a DICER1 em um carcinoma cortical de suprarrenal virilizante diagnosticado em uma paciente de 59 anos com boa evolução clínica após 97 meses de seguimento (400x). (B) Carcinoma cortical de suprarrenal metastático e produtor de inibina em um paciente de 30 anos com imunorreatividade ausente (escore 0) para a DICER1 (400x)

Quando analisamos somente os carcinomas do córtex da suprarrenal no grupo de adultos ($n= 79$), a imunorreatividade fraca para DICER foi significativamente mais frequente em carcinomas metastáticos em relação a carcinomas não metastáticos (66% vs 31%; $X^2= 9,3$, $p= 0,002$). Além de mais agressivos, os carcinomas com uma expressão fraca para a DICER1 apresentaram uma mediana de idade menor (35 vs 45 anos, $p= 0,02$), maior tamanho (12,3 vs 9 cm, $p= 0,001$), estadio mais avançado (ENSAT 3 ou 4 em 55% vs 30%, $p= 0,04$) e maior escore de Weiss (6 vs 4, $p= 0,02$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Relação entre a expressão proteica da DICER1 e as características clínicas e patológicas dos pacientes adultos com carcinoma cortical da suprarrenal (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária) (n= 79)

	Expressão <i>DICER1</i> fraca	Expressão <i>DICER1</i> forte	<i>p</i>
n (%)	40 (51%)	39 (49%)	
Escore, mediana	2,4	5,4	
Idade, mediana (anos)	35	45	0,02
Sexo [masculino, n (%)]	11 (28)	6 (15)	0,19
Tamanho tumoral, mediana (cm)	12,3	9,0	0,001
Estadiamento (ENSAT) [n (%)]			0,04
1-2	18 (45)	25 (68)	
3-4	22 (55)	12 (32)	
Status hormonal [n (%)]			0,76
Cushing	6 (16)	7 (19)	
Não Cushing	31 (84)	30 (81)	
Escore Weiss, mediana	6	4	0,02
Índice Ki67 (%)			0,47
< 10	25 (63)	26 (70)	
≥ 10	15 (37)	11 (30)	
Metástase à distância ou recorrência local [n (%)]*			
Pacientes afetados	29 (72)	15 (38)	0,002
Pacientes não afetados	11 (28)	24 (62)	

* Desenvolvimento de metástases à distância ou recorrência local durante o seguimento. Pacientes com metástase ao diagnóstico foram excluídos dessa análise, pois eles já são representados como estadiamento ENSAT 4.

Dentre os carcinomas de adultos, a expressão fraca para a DICER1 se correlacionou com uma significativa redução da sobrevida global ($p= 0,004$). Vinte e quatro (60%) pacientes do grupo de 40 carcinomas com expressão fraca foram a óbito, enquanto somente dez pacientes (26%) dos 39 carcinomas com expressão forte para a DICER1 apresentaram desfecho final desfavorável. Em relação à sobrevida livre de doença, pacientes com carcinomas mostrando expressão fraca para a DICER1 também tiveram menor tempo de sobrevida livre de doença ($p= 0,005$) (Gráfico 10 e 11 e Tabela 4).

Gráfico 10 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida global em pacientes adultos com carcinoma cortical de suprarenal; n= 79 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa

Gráfico 11 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida livre de doença em pacientes adultos com carcinoma cortical da suprarenal; n= 61 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa; excluídos pacientes com metástase ao diagnóstico

Tabela 4 - Fatores prognósticos de sobrevida global e livre de doença em adultos com carcinoma cortical da suprarrenal (somente amostras de tumor derivadas de cirurgia primária)

	<i>Análise univariada</i>			<i>Análise multivariada</i>		
	Sobrevida global					
	RR	95% IC	P	RR	95% IC	P
Idade	0,99	0,98-1,0	0,87			
Sexo masculino	0,85	0,36-2,0	0,71			
Tamanho tumoral ≥ 8 cm	24,6	0,3-1778	0,14			
Estadiamento (ENSAT 3/4)	4,8	2,3-9,9	0,0001	2,9	1,3-6,8	0,014
Síndrome de Cushing	1,0	0,4-2,4	0,99			
Escore Weiss ≥ 6	4,2	1,9-9,2	0,001	2,0	0,8-5,3	0,14
Índice Ki67 ≥ 10 %	3,9	1,9-8,0	0,0001	2,5	1,2-5,2	0,017
Expressão proteica fraca da DICER1	2,8	1,3-8,0	0,006	1,7	0,8-3,3	0,14
	Sobrevida livre de doença					
	RR	95% IC	P	RR	95% IC	P
Idade	1,0	0,98-1,0	0,75			
Sexo masculino	1,5	0,7-3,3	0,36			
Tamanho tumoral ≥ 8 cm	26	0,3-2169	0,15			
Síndrome de Cushing	0,6	0,2-1,7	0,35			
Escore Weiss ≥ 6	3,8	1,7-8,6	0,001	1,5	0,6-4,0	0,4
Índice Ki67 ≥ 10 %	6,3	2,8-14,3	0,0001	6,2	2,5-15,6	0,0001
Expressão proteica fraca da DICER1	3,1	1,4-14,3	0,008	2,6	1,1-6,7	0,048

Na análise univariada de sobrevida global, o estadiamento avançado ($p = 0,0001$), escore de Weiss ≥ 6 ($p = 0,001$), Ki67 $\geq 10\%$ ($p = 0,0001$) e a expressão fraca para a DICER1 ($p = 0,006$) foram preditores de evolução para óbito. Na análise multivariada, somente o estadiamento avançado [Risco relativo (RR) 2,9; Intervalo de confiança (IC) 1,3-6,8; $p = 0,014$] e o Ki67 $\geq 10\%$ (RR 2,5; IC 1,2-5,2; $p = 0,017$) foram preditores de redução da sobrevida global. Embora especulativo, acreditamos que a expressão fraca para a DICER1 não foi um marcador significativo de redução da sobrevida global em virtude do número de casos da análise. A positividade para o

Ki67 e o estadiamento ao diagnóstico são com certeza os fatores prognósticos mais significativos, mas seria necessário um número maior de desfechos para excluirmos a importância do escore de Weiss ≥ 6 e da expressão proteica fraca para a DICER1.

Em relação a sobrevida livre de doença, escore de Weiss ≥ 6 ($p = 0,001$), Ki67 $\geq 10\%$ ($p = 0,0001$) e expressão fraca para a DICER1 ($p = 0,017$) foram preditores de recorrência. Na análise multivariada, Ki67 $\geq 10\%$ (RR 6,2; IC 2,5-15,6; $p = 0,0001$) e a expressão proteica fraca para DICER1 (RR 2,6; IC 1,1-6,7; $p = 0,048$) permaneceram como marcadores significativo de recorrência.

No grupo pediátrico, 34 de 44 tumores (77%) apresentaram expressão forte, enquanto 10 de 44 tumores (23%) tiveram expressão fraca para a DICER1. A imunorreatividade para a DICER1 não foi significativamente diferente entre tumores clinicamente benignos e malignos. A expressão da DICER1 foi fraca em sete de 36 tumores clinicamente benignos (19%) e em três de oito tumores clinicamente malignos (38%; $X^2 = 1,21$, $p = 0,27$). Em relação à sobrevida das crianças com tumores do córtex da suprarrenal, a expressão da DICER1 não se correlacionou com tempo de sobrevida global e livre de doença ($p = 0,98$ e $p = 0,37$, respectivamente) (Gráficos 12 e 13).

Gráfico 12 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida global em crianças com tumor cortical da suprarrenal; n= 44 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa

Gráfico 13 - Impacto da expressão proteica da DICER1 na sobrevida livre de doença em crianças com tumor cortical da suprarrenal; n= 43 amostras tumorais de cirurgia primária com dados clínicos completos; somente pacientes com ressecção completa; excluídos pacientes com metástase ao diagnóstico

4.1.2 Expressão gênica da *DICER1*

Nos tumores do córtex da suprarrenal em adultos, os níveis de expressão do gene *DICER1* foram significativamente maiores em carcinomas (mediana 3,9; variando de 0,37 a 21,31) do que em adenomas (1,7; de 0,36 a 23,33, $p= 0,015$) (Gráfico 14). De forma similar a expressão proteica, a hiperexpressão do gene *DICER1* foi mais frequente em carcinomas [15 de 25 carcinomas (60%) e sete de 30 adenomas (23%); $X^2 = 7,64$, $p= 0,006$]. Adicionalmente, a expressão do gene *DICER1* não se correlacionou com sobrevida global ($p= 0,93$) e sobrevida livre de doença ($p= 0,27$).

Nos tumores pediátricos, os níveis de expressão do gene *DICER1* não foram significativamente diferentes entre tumores clinicamente benignos (4,2; de 1,26 a 221) e clinicamente malignos (4,9; de 1,08 a 12,7, $p= 0,33$) (Gráfico 15). A hiperexpressão do gene *DICER1* foi encontrada em 13 de 16 tumores clinicamente benignos (81%) e em três de cinco tumores clinicamente malignos (60%; $X^2 = 0,94$, $p= 0,91$). No grupo pediátrico, a expressão do gene *DICER1* não se correlacionou com sobrevida global ($p= 0,85$) e sobrevida livre de doença ($p= 0,46$).

Gráfico 14 - Expressão do gene *DICER1* em adenomas e carcinomas diagnosticados em adultos. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro

Gráfico 15 - Expressão do gene *DICER1* em tumores clinicamente benignos e malignos diagnosticados em crianças. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro padrão

4.1.3 Expressão dos *miR-103* e *miR-107*

Nos tumores do córtex da suprarrenal em adultos, os níveis de expressão do *miR-103* não foram diferentes entre adenomas (13,7; de 6,3 a 62,6) e carcinomas (20,3; de 3,0 a 393,4, $p=0,37$). Dentre os carcinomas ($n=30$), a expressão do *miR-103* não se correlacionou com sobrevida global ($p=0,24$) e sobrevida livre de doença ($p=0,13$).

Em relação ao *miR-107* em tumores diagnosticados em adultos, os níveis de expressão foram significativamente maiores em carcinomas (17,3; 3,4 a 329,5) do que em adenomas (31,9; 4,6 a 165,8, $p=0,049$) (Gráfico 16). No entanto, a expressão do *miR-107* não se correlacionou com sobrevida global ($p=0,5$) e sobrevida livre de doença ($p=0,47$) nos carcinomas.

Nos tumores pediátricos, os níveis de expressão do *miR-103* não foram significativamente diferentes entre tumores clinicamente benignos (9,1; de 2,5 a 25,7) e clinicamente malignos (13,9; de 6,9 a 29,2, $p=0,23$). Adicionalmente, a expressão do *miR-103* não se correlacionou com sobrevida global ($p=0,08$) e sobrevida livre de doença ($p=0,23$). Em relação a *miR-107*, não houve também diferença na sua expressão entre tumores clinicamente benignos (21,7; de 1,2 a 72,6) e clinicamente malignos (11,43; de 7,0 a 52,7, $p=0,33$). A expressão do *miR-107* não se correlacionou com sobrevida global ($p=0,7$) e sobrevida livre de doença ($p=0,96$).

Tanto em adultos como em crianças, a expressão do *miR-103* e *miR-107* não se correlacionou de forma significativa com a expressão gênica da *DICER1*.

Gráfico 16 - Expressão do *miR-107* em adenomas e carcinomas diagnosticados em adultos. O gráfico representa a mediana de cada grupo com o intervalo de confiança (95%) do erro padrão

4.1.4 Sequenciamento dos sítios de ligação de metais do domínio RNase IIIb do gene *DICER1*

Não foi encontrada nenhuma variante genética nos sítios de ligação de metais (E1705, D1709, E1810 e E1813) do domínio de clivagem RNase IIIb da *DICER1*, codificado pelos éxons 24-25 em tumores do córtex da suprarrenal de 60 adultos (30 adenomas e 30 carcinomas) e 23 crianças (18 tumores clinicamente benignos e cinco tumores clinicamente malignos).

4.2 Análise do Gene *TARBP2* em Tumores do Córtex da Suprarrenal

4.2.1 Expressão proteica da TRBP

Em tumores do córtex da suprarrenal de adultos, uma expressão forte para a TRBP foi encontrada em 11 de 73 adenomas (15%) e em sete de 80 carcinomas (8%; $X^2 = 1,47$, $p = 0,22$). Desta forma, a expressão proteica da TRBP foi semelhante nos adenomas e carcinomas de adultos. A expressão proteica da TRBP também foi similar entre adenomas (mediana 5; variando de 0 a 7) e carcinomas (4,83; de 0 a 6, $p = 0,13$). Dentre os 73 pacientes com tumor apresentado expressão fraca para a TRBP, 38% (28 de 73) evoluíram para óbito, enquanto que dos sete pacientes com tumor apresentado expressão forte, seis casos evoluíram para óbito. Contudo, como o número de tumores com expressão forte é muito reduzido, não realizamos análises de sobrevida.

No grupo pediátrico, 33 de 36 tumores (91%) apresentaram expressão fraca, enquanto três de 36 (9%) tiveram expressão forte para a TRBP ($X^2 = 0,804$, $p = 0,37$). Não houve, portanto, diferença entre a expressão da TRBP entre os tumores clinicamente benignos e clinicamente malignos. Como somente três tumores apresentaram expressão forte, não foi possível realizar análise de sobrevida.

Figura 7 - A e B, Adenoma de córtex de suprarrenal com imunorreatividade ausente (score 0) para a TRBP representado em aumentos de 100 e 400X, respectivamente. C e D, Adenoma de córtex de suprarrenal com imunorreatividade forte (score 6) para a TRBP representado em aumentos de 100 e 400x, respectivamente

4.2.2 Expressão gênica da *TARBP2*

Nos tumores do córtex da suprarrenal em adultos, os níveis de expressão do gene *TARBP2* foram similares entre adenomas (mediana 0,54; variando de 0,1 a 9,7) e carcinomas (0,52; de 0,1 a 2,7, $p= 0,71$). A hiperexpressão do gene *TARBP2* foi demonstrada em 14 de 31 adenomas (45%) e em 13 de 30 carcinomas (43%; $X^2 = 0,02$, $p= 0,89$). Dentre os carcinomas ($n = 30$), a expressão do gene *TARBP2* não se correlacionou com sobrevida global ($p= 0,31$) e sobrevida livre de doença ($p= 0,85$).

Nos tumores pediátricos, os níveis de expressão do gene *TARBP2* não foram significativamente diferentes entre tumores clinicamente benignos (0,89; de 0,0 a 10,4) e clinicamente malignos (0,5; de 0,3 a 4,8, $p = 0,54$). A hiperexpressão do gene

TARBP2 foi encontrada em 13 de 18 tumores clinicamente benignos (72%) e em três de cinco tumores clinicamente malignos (60%; $X^2 = 1,79$, $p = 0,18$). No grupo pediátrico, a expressão do gene *TARBP2* não se correlacionou com sobrevida global ($p = 0,48$) e sobrevida livre de doença ($p = 0,22$).

4.2.3 Expressão do *miR-497*

O *miR-497* não foi expresso no pool de 14 córtex de suprarrenais normais e nos tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.

4.2.4 Sequenciamento do éxon 5 do gene *TARBP2*

Não foram identificadas variantes genéticas no sequenciamento do éxon 5 do gene *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de 60 adultos (30 adenomas e 30 carcinomas) e 23 crianças (18 tumores clinicamente benignos e cinco tumores clinicamente malignos).

5 DISCUSSÃO

A desregulação das enzimas e cofatores envolvidos no processamento dos miRNAs já foi demonstrada em vários tipos de cânceres, sugerindo um papel essencial dessas enzimas e dos miRNAs no processo de progressão tumoral⁸¹. No presente estudo, demonstramos que a expressão proteica da DICER1 foi significativamente maior nos carcinomas em relação aos adenomas do córtex da suprarrenal de adultos. No grupo de carcinomas de adultos, observamos uma significativa redução da sobrevida global e sobrevida livre de doença em pacientes com tumores apresentando uma expressão proteica fraca da DICER1. Adicionalmente, a imunorreatividade fraca para DICER foi um preditor significativo de recorrência tumoral na análise multivariada.

Nossos achados são consistentes com um estudo prévio em tumores do córtex da suprarrenal que analisou a expressão proteica da DICER1 em um grupo de 23 adenomas e 19 carcinomas do córtex da suprarrenal de adultos¹⁰⁰. Caramuta *et al.*¹⁰⁰ demonstraram uma maior expressão da DICER1 em carcinomas comparados a adenomas do córtex da suprarrenal de adultos. Entretanto, o pequeno número de carcinomas (somente 19) não permitiu a avaliação da expressão proteica da DICER1 como marcador de prognóstico. Desta forma, os nossos dados são pioneiros ao demonstrar que carcinomas agressivos (com maior tamanho, maior escore de Weiss e diagnóstico em estádios mais avançados) apresentam uma significativa redução na expressão proteica da DICER1.

Desde a identificação da DICER1 como um importante modulador da expressão gênica, muito se tem procurado compreender sobre o efeito da desregulação da sua expressão e de outros componentes do processamento de miRNAs nas diferentes neoplasias⁸¹. A baixa expressão proteica da DICER1 se correlacionou com estadio tumoral avançado, pior resposta à quimioterapia e redução da sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de ovário¹⁰⁴. Em pacientes com adenocarcinoma gástrico, a diminuição da expressão proteica da DICER1 foi um preditor de invasão linfonodal¹²⁴. De forma similar, a expressão proteica baixa ou negativa da DICER1 se correlacionou com uma diminuição da sobrevida global e livre de doença em outras neoplasias do trato gastrointestinal, como adenocarcinoma de cólon¹²⁵ e de vesícula biliar¹²⁶.

Embora o achado mais frequente seja a correlação da baixa expressão proteica de DICER1 com fenótipos mais agressivos em diversos tipos de cânceres^{104,107,111-113}, um aumento da expressão da DICER1 foi demonstrado em adenocarcinomas de próstata avançados¹²⁷. Não está claro se essa discordância em adenocarcinoma de próstata possa ser atribuída a diferenças e dificuldades técnicas ou a especificidade para o tecido ou ainda a algum outro processo biológico que ainda precisa ser mais bem elucidado.

Baseado nos nossos achados, podemos especular que o aumento da expressão gênica e proteica da DICER1 em carcinomas do córtex da suprarrenal de adultos em relação aos adenomas pode representar um mecanismo compensatório em decorrência da desregulação de miRNAs nos tumores malignos. Contudo, durante a progressão tumoral em carcinomas, a perda da expressão proteica da DICER1 foi um preditor molecular de recorrência local e/ou metástases. Embora este achado possa parecer inicialmente contraditório, devemos enfatizar que o desenvolvimento dos adenomas e a progressão dos carcinomas do córtex da suprarrenal não são eventos

contínuos¹²⁸. Adicionalmente, não podemos concluir se a perda da expressão proteica da DICER1 tem um papel direto na progressão dos carcinomas do córtex da suprarrenal ou se constitui um epifenômeno, refletindo outras alterações genéticas.

Em crianças, não houve diferença na expressão gênica e proteica da DICER1 em tumores clinicamente benignos e clinicamente malignos¹²⁹. Dados previamente publicados pelo nosso grupo têm demonstrado que os tumores pediátricos, principalmente se diagnosticados antes dos quatro anos, diferem substancialmente daqueles diagnosticados em adolescentes e adultos em relação a apresentação clínica, achados histopatológicos, marcadores de prognóstico e sobrevida^{29,130}.

Recentemente, mutações inativadoras do gene *DICER1* foram descritas em tumores ovarianos não-epiteliais. A maioria dessas mutações eram *missense* e estavam localizadas nos domínio de ligação de metais do sítio catalítico RNase IIIb, que é essencial para interação e processamento de miRNAs⁸⁵. Em tumores do córtex da suprarrenal, não encontramos nenhuma variante genética nos quatro domínio de ligação de metais do sítio catalítico RNase IIIb do gene *DICER1*. Desta forma, a baixa expressão proteica da DICER1 em carcinomas metastáticos de adultos não foi explicada pela presença de mutações inativadoras no gene *DICER1*. Mutações na *DICER1* fora da área de *hot-spot* foram descritas somente em quatro de 938 cânceres no banco de dados *Catalogue of Somatic Mutation in Cancer* (COSMIC)¹²⁰. Em virtude deste fato, decidimos não sequenciar todo a região codificadora da *DICER1*.

Estudos *in vitro* demonstraram que a desregulação do processamento de miRNAs em células cancerosas devido ao silenciamento da *DICER1* propiciou a emergência de células com fenótipo mais agressivo, acelerando a progressão tumoral¹¹⁹. A redução da expressão da *DICER1* foi causada pela hiperexpressão do

miR-103 e *miR-107*. A hiperexpressão do *miR-103* e *miR-107* se correlacionou com prognóstico desfavorável e metástase em câncer de mama¹¹⁹. Na nossa coorte de tumores do córtex da suprarrenal, a expressão do *miR-103* não teve relevância clínica e nem correlação com parâmetros histopatológicos, enquanto o *miR-107* foi mais expresso em carcinomas de adultos. No entanto a expressão do *miR-107* não se correlacionou com prognóstico. Tanto a expressão do *miR-103* como a do *miR-107* não se correlacionaram com a expressão gênica e proteica da DICER1.

O *miR-107* está hiperexpresso em diversos tipos de cânceres como cólon, pâncreas e estômago¹³¹. Além disso, estudo recente demonstrou uma correlação entre a hiperexpressão do *miR-107* em câncer de mama e uma menor sobrevida livre de doença¹¹⁹. A hiperexpressão *miR-107* também se correlacionou com um prognóstico ruim em pacientes com câncer de esôfago¹³². O *miR-107* funcionaria como um oncogene ao promover o silenciamento da *DICER1* e a hiperexpressão da família de miRNAs *Let-7*. Em contraste, uma redução na expressão do *miR-107* foi evidenciada em câncer de cabeça e pescoço e de pulmão^{133,134}.

Apesar de não termos encontrado relevância para o *miR-103* em tumores do córtex da suprarrenal, o *miR-103* tem papel de oncogene em câncer de mama e colorretal através do silenciamento dos genes *DICER1* e *PTEN*^{119,135}. O *miR-103* regula ainda a expressão do gene supressor tumoral *TIMP-3* (gene inibidor tecidual da metaproteínase 3) e estimula o crescimento e invasão em linhagens de câncer endometrial¹³⁶.

A TRBP é um componente do complexo processador de miRNAs formado pela DICER1, interage diretamente com a DICER1 e é essencial para a sua estabilização^{137,138}. Recentemente, Melo *et al.*¹²¹ identificaram mutações com alteração do código de leitura em carcinomas hereditários e esporádicos com instabilidade de

microssatélites. Adicionalmente, Caramuta *et al.*¹⁰⁰ demonstraram uma maior expressão do gene *TARBP2* nos carcinomas em relação aos adenomas em uma casuística incluindo apenas 17 adenomas e 17 carcinomas do córtex da suprarrenal. A hiperexpressão do gene *TARBP2* se correlacionou com a hipoexpressão do *miR-497* em carcinomas. Estudos funcionais demonstraram que o *miR-497* pode regular diretamente o gene *TARBP2* na linhagem NCI-H295R¹⁰⁰. Em contraste com esses dados prévios, a expressão do gene *TARBP2* e da sua proteína TRBP não se correlacionaram com parâmetros clínicos e histopatológicos nos tumores do córtex da suprarrenal diagnosticados em adultos e crianças incluídos na nossa coorte. Além disso, o *miR-497* não foi expresso no pool de córtex normais e em nenhum dos tumores da nossa casuística. Investigamos ainda a presença de mutações inativadoras na região *hot-spot* do éxon 5 do gene *TARBP2*. Entretanto, não identificamos variantes genéticas no éxon 5 do gene *TARBP2*.

Em resumo, demonstramos neste estudo que a baixa expressão proteica da DICER1 foi um marcador de prognóstico em pacientes adultos com carcinoma cortical de suprarrenal. A perda da expressão da DICER1 em carcinomas recorrentes não foi causada por mutações inativadoras no domínio RNase IIIb do gene *DICER1* e nem por alteração na expressão do *miR-103* e *miR-107*, reguladores da sua expressão em outros tecidos. Apesar do *miR-107* ter sido hiperexpresso em carcinomas em relação aos adenomas em adultos, a sua expressão não teve nenhuma importância prognóstica dentre os carcinomas. Por fim, a expressão do gene *TARBP2* e da sua proteína TRBP não apresentaram importância prognóstica para os tumores do córtex da suprarrenal em adultos e crianças.

6 CONCLUSÕES

a) A expressão gênica e proteica da *DICER1* foi significativamente maior nos carcinomas em relação aos adenomas do córtex da suprarrenal de adultos.

b) Dentre os carcinomas de adultos, a expressão proteica fraca para a *DICER1* se correlacionou com redução da sobrevida global e livre de doença.

c) A expressão proteica fraca para a *DICER1* foi um preditor independente de recorrência tumoral em adultos com carcinoma do córtex da suprarrenal.

d) Não foram encontradas variantes genéticas nos sítios de ligações de metais do domínio de clivagem RNase IIIb do gene *DICER1* nos tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.

e) A expressão da *DICER1* não se correlacionou com a expressão dos *miR-103* e *miR-107* nos tumores do córtex da suprarrenal de adultos e crianças.

f) A expressão do *miR-107* foi maior nos carcinomas em relação aos adenomas em adultos.

g) A expressão proteica da TRBP não se correlacionou com parâmetros clínicos e histopatológicos nos tumores do córtex da suprarrenal em adultos e crianças.

h) A expressão do gene *TARBP2* não se correlacionou com parâmetros clínicos e histopatológicos nos tumores do córtex da suprarrenal em adultos e crianças..

i) Nenhuma variante genética foi encontrada no éxon 5 do gene *TARBP2*.

Anexo A - Pontuação dos critérios histológicos de Weiss

	Critério Histológico de Weiss	
	Ausente	Presente
Grau nuclear	1 e 2	3 e 4
Mitoses	≤ 5 por 50 campos 400x	≥ 6 por 50 campos 400x
Mitoses atípicas	Ausente	Presente
Células Claras	$>25\%$	$\leq 25\%$
Arquitetura Difusa	$\leq 33\%$	$>33\%$
Necrose Confluente	Ausente	Presente
Invasão venosa	Ausente	Presente
Invasão sinusoidal	Ausente	Presente
Invasão vascular	Ausente	Presente

Anexo B - Estadiamento ENSAT - Carcinoma de córtex de suprarrenal

Estadio	ENSAT
I	T ₁ , N ₀ , M ₀
II	T ₂ , N ₀ , M ₀
III	T ₁₋₂ , N ₁ , M ₀ T ₃₋₄ , N ₀₋₁ , M ₀
IV	T ₁₋₄ , N ₀₋₁ , M ₁

T₁: tamanho do tumor $\leq$ 5cm; T₂: tamanho do tumor > 5cm; T₃: invasão do tecido adjacente pelo tumor; T₄: invasão órgão adjacentes e/ou trombo em veia cava inferior; N₀: linfonodos não acometidos; N₁: linfonodos acometidos; M₀: sem metástases a distância; M₁: metástases a distância.

Anexo C - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - 2-6 anos incompletos

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO ESTADO DE SÃO PAULO

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO

SUJEITOS DE PESQUISA DE 2 A 6 ANOS INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO :M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:.....
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
 2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, cuidador, etc):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO:M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....
-

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos**
2. PESQUISADOR : **Gabriela Resende Vieira de Sousa**
CARGO/FUNÇÃO: **Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 152.469**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses**CONFIDENCIAL****INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA****SUJEITOS DE PESQUISA DE 2- 6 ANOS INCOMPLETOS**

O médico vai perguntar se você quer participar de um estudo. O papai e a mamãe já sabem disso.

O que vai acontecer?

O médico vai examinar você.

Você vai coletar exames de sangue e fazer um exame para ver dentro da sua barriga.

Você tem um carocinho doente dentro da barriguinha e vai precisar fazer uma cirurgia pra tirar ele de lá. Isso vai ser feito enquanto você estiver dormindo. Você não vai ver e nem sentir nada.

Quando acordar, já terá acabado e você estará com um curativo!

Depois disso, vamos estudar o carocinho que tiramos de dentro de sua barriguinha para criar remédios contra eles que outras crianças poderão usar para melhorar!

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal (localizadas acima dos rins). A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) ou o seu filho (a) decida não participar da pesquisa.

Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor) e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa), através de uma picada com agulha estéril, descartável. A coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) será realizada durante a cirurgia, quando você estará dormindo em virtude da anestesia. Desta forma, você não sentirá nenhum desconforto ou dor.

Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

Entendi todas as informações que foram dadas sobre o estudo **Análise do gene *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.**

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o termo de assentimento deste paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo D - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - 6-10 anos incompletos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO

SUJEITOS DE PESQUISA DE 6 A 10 ANOS INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)
2. RESPONSÁVEL LEGAL:
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, cuidador, etc):
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO: M ☐ F ☐
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO.....Nº.....APTO:
BAIRRO:.....CIDADE:
CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos**
2. PESQUISADOR : **Gabriela Resende Vieira de Sousa**
CARGO/FUNÇÃO: **Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 152.469**
UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**
3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses

CONFIDENCIAL

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA

SUJEITOS DE PESQUISA DE 6 a 10 ANOS INCOMPLETOS

O medico irá perguntar a você se você quer participar de uma pesquisa, seus pais já foram informados sobre isso.

O QUE ACONTECERÁ COMIGO SE EU RESOLVER PARTICIPAR DO ESTUDO?

Seu médico irá examinar você.

Você precisará colher exames de sangue e vai sentir apenas o desconforto da picadinha da agulha, que é bem rápido.

Além disso, você vai precisar fazer um exame de imagem que pode ser um ultrassom que é um aparelho que você passa por fora da barriga pra enxergar o que tem lá dentro.

Você fará uma tomografia computadorizada ou ressonância magnética. Se tratam de máquinas nas quais tem um lugar para você deitar e ela tirá várias fotos de você. Nessas fotos o médico pode ver tudo que tem por dentro de sua barriga.

O QUE ACONTECERÁ DEPOIS?

Você tem um nódulo dentro da sua barriga, perto do rim. Existem outras crianças que tem o mesmo problema que você e também precisaram (ou precisarão) realizar uma cirurgia para tirar esse nódulo de dentro da barriga porque ele pode deixar a pessoa doente. Durante a cirurgia, você estará anestesiado e dormindo, por isso não irá ver ou sentir nada. No momento em que você acordar, a cirurgia terá acabado. Se você concordar com o estudo, o médico irá utilizar um pedaço do nódulo que foi retirado de dentro da sua barriga para fazer pesquisas e poder ajudar você e outras crianças com o mesmo problema.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

- Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Adrenal da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo CEP: 05403-000, Brasil.
- Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (Av. Dr Éneas de Carvalho Aguiar, 255 Cerqueira César- 05403-000/ São Paulo – Brasil) pelo telefone (11) 2661-6442 Ramais 16/17/18/20.

Entendi todas as informações que foram dadas sobre o estudo **Análise do gene *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos.**

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o termo de assentimento deste paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo E - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - 10-14 anos incompletos

**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO
ESTADO DE SÃO PAULO**

INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO

SUJEITOS DE PESQUISA DE 10 A 14 ANOS INCOMPLETOS

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

3. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

4. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, cuidador, etc):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA **Análise dos genes *DICER1* e *TARBP2* em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos**

2. PESQUISADOR : **Gabriela Resende Vieira de Sousa**

CARGO/FUNÇÃO: **Médica INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº 152.469**

UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : 48 meses**CONFIDENCIAL****INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA****SUJEITOS DE PESQUISA DE 10 a 14 ANOS INCOMPLETOS**

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal (localizadas acima dos rins). A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) e o seu filho (a) decida não participar da pesquisa.

Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor) e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa), através de uma picada com agulha estéril, descartável. A coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) será realizada durante a cirurgia, quando você estará dormindo em virtude da anestesia. Desta forma, você não sentirá nenhum desconforto ou dor.

Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

- Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Adrenal da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo CEP: 05403-000, Brasil.
- Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (Av. Dr Éneas de Carvalho Aguiar, 255 Cerqueira César- 05403-000/ São Paulo – Brasil) pelo telefone (11) 2661-6442 Ramais 16/17/18/20.

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o termo de assentimento deste paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo F - Termo Consentimento Livre e Esclarecido - 14-18 anos incompletos**HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DO
ESTADO DE SÃO PAULO****INFORMAÇÕES AO SUJEITO DE PESQUISA E TERMO DE ASSENTIMENTO****SUJEITOS DE PESQUISA DE 14 A 18 ANOS INCOMPLETOS****DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

5. NOME:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE: DDD (.....)

6. RESPONSÁVEL LEGAL:

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, cuidador, etc):

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº :SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO:/...../.....

ENDEREÇO.....Nº.....APTO:

BAIRRO:.....CIDADE:

CEP:.....TELEFONE:DDD(.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA *Análise dos genes **DICER1** e **TARBP2** em tumores do córtex da suprarrenal de crianças e adultos*2. PESQUISADOR : **Gabriela Resende Vieira de Sousa**CARGO/FUNÇÃO: **Médica** INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL Nº **152.469**UNIDADE DO HCFMUSP: **Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios LIM-42**

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

RISCO MÍNIMO	☒	RISCO MÉDIO	☐
RISCO BAIXO	☐	RISCO MAIOR	☐

4. DURAÇÃO DA PESQUISA : **48 meses**

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é pesquisar genes (que são estruturas presentes em todas as células do corpo e que dão as características às pessoas) que estão envolvidos no desenvolvimento dos tumores da glândula suprarrenal (localizadas acima dos rins). Seus pais foram informados. A participação neste estudo é voluntária (não obrigatória) e o seu tratamento será realizado mesmo que o Sr. (a) e o seu filho (a) decidam não participar da pesquisa.

Para que seja feita a avaliação do gene, será necessário a coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) obtido durante o ato cirúrgico para ressecção tumoral (retirada do tumor) e também a coleta de 5 ml de sangue (correspondente a 1 colher de sopa), através de uma picada com agulha estéril, descartável. A coleta do material (um pequeno pedaço do tumor) será realizada durante a cirurgia, quando você estará dormindo em virtude da anestesia. Desta forma, você não sentirá nenhum desconforto ou dor.

Os riscos e desconfortos desses procedimentos serão mínimos. O desconforto da coleta de sangue é a dor da picada e eventualmente o aparecimento de um pequeno hematoma (mancha arroxeadada em torno da picada) que desaparecerá em pouco menos de uma semana.

Entendi todas as informações que foram dadas sobre o estudo “Análise do gene DICER1 em tumores adrenocorticais de crianças e adultos”.

COM QUEM DEVO FALAR SE EU TIVER DÚVIDAS?

- Você pode procurar seu médico ou alguém da equipe da Unidade de Adrenal da Disciplina de Endocrinologia, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC- FMUSP). Av. Dr Éneas Carvalho Aguiar, 44, Cerqueira César, São Paulo CEP: 05403-000, Brasil.
- Você pode procurar também o comitê que aprova as pesquisas em Comissão de ética para análise de Projetos de Pesquisa (Av. Dr Éneas de Carvalho Aguiar, 255 Cerqueira César- 05403-000/ São Paulo – Brasil) pelo telefone (11) 2661-6442 Ramais 16/17/18/20.

Assinatura do paciente

Data ____/____/____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o termo de assentimento deste paciente para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

Data ____/____/____

Anexo H - Dados da Casuística

Adultos

Número Paciente	Nome	Idade	Diagnóstico	Weiss	Estadiamento	Metástases	Tempo de seguimento	Tempo de recidiva
1.	ACR	49	Carcinoma	7	3	sim	36	32,43333333
2.	AMJ	72	Adenoma	1	1		69,23333	
3.	AMS	32	Carcinoma	8	4	sim	12,4	0
4.	AAMS	16,9	Adenoma	2	1			
5.	AFF	29,5	Carcinoma	7	2	sim	28,333334	11,566667
6.	ALDSC	22,4	Carcinoma	6	2	não	29,83333333	29,83
7.	AMAV	67,6	Adenoma	0	1		30,16666667	
8.	AMD	58,8	Carcinoma	5	2	não	99,2	99,2
9.	APF	35,7	Carcinoma	10	9	sim	25,833334	0
10.	ASS	62,1	Carcinoma	5	2	sim	15,633333	3,9333334
11.	APS	34,3	Adenoma	1	1		18,56666667	
12.	AA	62,7	Adenoma	0	1		52,2	
13.	AXS	33	Carcinoma	8	4	sim	4,1	0
14.	AJS	66,5	Carcinoma	8	2	sim	18	16,33
15.	ALS	72,4	Adenoma	1	1		52,2	
16.	AMBR	36,5	Carcinoma	10	9	sim	146,73334	2
17.	AEL	57,4	Carcinoma	3	1	não	48,733334	48,7
18.	AAF	65,6	Carcinoma	6	4	sim	4,4666667	0
19.	ARF	51,4	Carcinoma	8	3	sim	22	12
20.	ASN	29	Carcinoma	8	4	sim	3,9	0
21.	BBO	34,6	Adenoma	0	1		1,3333334	
22.	BFS	23,3	Carcinoma	3	2	não	49,9	49,2
23.	CCS	42,3	Carcinoma	9	3	sim	6,5	6,3333335
24.	CHT	36,1	Carcinoma	8	2	sim	60	20,366667
25.	CMS	55,2	Adenoma	0	1		67,166664	
26.	CMD	57,5	Adenoma	0	9		98,4	
27.	CRQ	36	Adenoma	1	2		147	
28.	CRS	62,8	Carcinoma	7	3	sim	15,8	4,3
29.	CMA	15	Adenoma	1	1		246,7	
30.	CCT	63	Adenoma	2	1		164	
31.	CFS	18	Adenoma	2	1		153	
32.	CSM	59	Adenoma	2	1		154,3333333	
33.	CRA	37	Adenoma	0	1		135	
34.	CAOC	51	Carcinoma	6	2	sim	30	24
35.	CGS	74,7	Adenoma	0	1		36,36666667	
36.	CPG	29,7	Carcinoma	3	2	sim	8,833333	6,6666665
37.	DAP	52	Carcinoma	7	2	sim	15	3,8666666
38.	DCM	23	Carcinoma	7	2	não	168,7666667	168,77
39.	DP	51	Adenoma	0	1		83	
40.	DABO	27	Adenoma	2	2		91	
41.	EAAA	53,5	Carcinoma	6	2	não	23,3	23,3
42.	ESA	40,5	Carcinoma	3	3	não	51	51
43.	EBA	51,6	Adenoma	0	9		24	
44.	ANM	29	Carcinoma	3	2	não	61	61
45.	ENSA	46	Adenoma	0	1		86,7	
46.	ECNF	31	Carcinoma	7	3	sim	16	5
47.	BEM	30,3	Carcinoma	3	3	sim	65	3,7
48.	ERL	79,6	Carcinoma	3	3	não	11,966666	12
49.	EAP	17	Carcinoma	7	2	não	60	60
50.	EAC	72	Carcinoma	7	3	sim	31	14

Continua

Continuação

Número Paciente	Nome	Idade	Diagnóstico	Weiss	Estadiamento	Metástases	Tempo de seguimento	Tempo de recidiva
51.	EDS	34	Adenoma	0	1		0	
52.	ESM	67,5	Adenoma	0	9		112,23333	
53.	FMD	15	Carcinoma	8	4	sim	22	0
54.	FSA	22,7	Carcinoma	8	4	sim	22	0
55.	FK	33	Carcinoma	5	4	sim	16	0
56.	FPV	36	Adenoma	2	2		203	
57.	FLS	35	Carcinoma	8	4	sim	1,7	0
58.	FMJ	47	Carcinoma	5	4	sim	18	0
59.	FMSB	35	Carcinoma	3	1	não	133,1666667	133,17
60.	FPSM	29	Adenoma	2	1		187	
61.	FGMN	30	Carcinoma	6	3	sim	12	4
62.	GMS	55,5	Carcinoma	8	3	sim	35,1	8
63.	GNS	21,8	Adenoma	0	1		28,53333333	
64.	GS	40,2	Adenoma	2	9		5,5	
65.	HS	69,8	Adenoma	1	9		71	
66.	HCF	38	Adenoma	2	2		229,1	
67.	HRG	26	Adenoma	1	2		68	
68.	HTB	54,1	Carcinoma	3	3	não	12,2	12,2
69.	IAF	66,4	Adenoma	1	1		0	
70.	IJS	28,3	Adenoma	0	9		49,2	
71.	IAP	22	Adenoma	2	1		180	
72.	ITY	37	Adenoma	1	1		54	
73.	ICA	19	Carcinoma	6	2	não	102	102
74.	IAS	68,4	Adenoma	1	9		95,3	
75.	IMS	22,6	Carcinoma	6	2	não	55,1	55,1
76.	ICS	47	Adenoma	0	2		98,23333333	
77.	IMO	48,1	Adenoma	1	1		121	
78.	IMSR	45	Carcinoma	8	3	não	152	152
79.	JJS	30,4	Carcinoma	8	2	não	14,1	14,1
80.	JCLV	23,1	Carcinoma	5	3	sim	52,7	7
81.	JFM	19	Carcinoma	4	1	não	125,5	125,5
82.	JEC	17,7	Carcinoma	8	4	sim	8	0
83.	JLS	64	Carcinoma	4	4	sim	53	0
84.	JDM	46	Carcinoma	6	3	não	122,9666667	122,97
85.	JHG	38	Carcinoma	7	2	sim	26	20
86.	JOL	54,1	Adenoma	0	9		89,5	
87.	JPD	49,2	Adenoma	0	9		54	
88.	JAF	64,3	Adenoma	0	9		31,733334	
89.	JMSF	53,4	Adenoma	0	9		22	
90.	JMM	54	Adenoma	1	1		43	
91.	JNS	42	Carcinoma	5	2	sim	21	11
92.	JVN	34	Adenoma	1	9		33	
93.	JPP	40	Adenoma	0	1		211,8333333	
94.	JAF	35	Adenoma	1	1		121	
95.	JAQO	22	Adenoma	1	1		144	
96.	JSR	23,9	Adenoma	2	1		40,96666667	
97.	JC	49	Carcinoma	4	2	não	179,1666667	179,17
98.	KCM	18	Carcinoma	8	3	sim	19	8
99.	KAF	23	Carcinoma	6	4	sim	17	0
100.	LTP	65,3	Carcinoma	4	2	não	27,57	27,57

Continua

Continuação

Número Paciente	Nome	Idade	Diagnóstico	Weiss	Estadiamento	Metástases	Tempo de seguimento	Tempo de recidiva
101.	LYNHD	28	Adenoma	2	1		86	
102.	LZA	22	Carcinoma	9	3	sim	60	48
103.	LOB	38,9	Carcinoma	9	3	sim	8	5,8
104.	LAS	27	Adenoma	1	1		128,0333333	
105.	LS (1)	42,8	Carcinoma	3	1	não	17,93333333	17,93
106.	LS (2)	29	Carcinoma	6	4	sim	31	0
107.	LSS	41	Adenoma	0	1		79,03333333	
108.	MBZ	53	Adenoma	2	1		95	
109.	MRA	30	Carcinoma	3	2	não	9,7333334	9,7
110.	MRCT	67,8	Adenoma	0	9		15,7	
111.	MCHS	24	Adenoma	1	1		34	
112.	MASS	66,2	Carcinoma	4	2	não	9,4	9,4
113.	MAC	64	Adenoma	0	1		46	
114.	MAPG	64	Adenoma	1	1		48	
115.	MCBCF	70,1	Adenoma	0	2		5,3	
116.	MCS	33	Carcinoma	3	2	não	27	27
117.	MDAC	31,6	Adenoma	2	1		0	
118.	MFBS	21,3	Carcinoma	4	1	não	106,0666666	106,1
119.	MLC	69,1	Carcinoma	3	1	não	8,2	8,2
120.	MSCS	49,6	Adenoma	0	1		4,433333333	
121.	MSSS	27	Adenoma	0	1		1	
122.	MSS	37	Adenoma	1	1		127	
123.	MEO	56,4	Adenoma	0	9		123,8	
124.	MEFC	37,8	Adenoma	0	9		89,8333336	
125.	MES	37,7	Carcinoma	5	2	sim	34	6,63
126.	MIC	58,7	Carcinoma	4	2	não	97,3333336	97,3
127.	MJSS	39	Adenoma	1	1		93	
128.	MJL	55,7	Carcinoma	4	2	não	17,8	15,9
129.	MVSS	50	Carcinoma	4	2	não	58	58
130.	MCS	15	Adenoma	1	2		24	
131.	MFM	51,2	Adenoma	1	9		73,4333334	
132.	MMS	25,2	Adenoma	2	9		12,0333334	
133.	MFP	54,8	Adenoma	10	9		190,73334	
134.	ML	56,8	Carcinoma	4	4	sim	0,6333333	0
135.	MAFL	39,9	Adenoma	0	9		54,7	
136.	MASB	26,5	Carcinoma	7	4	sim	7,4	0
137.	MBS	58,8	Adenoma	0	2		6,8	
138.	MOO	66	Carcinoma	4	2	não	86,96666667	86,97
139.	NAFO	36	Adenoma	0	1		45,16666667	
140.	OAS	45	Carcinoma	6	4	sim	314,0333333	0
141.	OTO	40	Carcinoma	4	2	não	376,2333333	376,23
142.	OLS	47	Adenoma	1	1		302,6666667	
143.	PRGA	42	Carcinoma	5	3	sim	4,2	3
144.	RSST	37,4	Carcinoma	4	2	não	27	27
145.	RBJ	48,8	Adenoma	0	9		57,0333333	
146.	RFBV	54	Adenoma	1	1		68	
147.	RFA	25	Adenoma	2	1		1	
148.	RL	44,7	Carcinoma	7	2	sim	73,36667	33,333332
149.	RI	21	Adenoma	2	1		99	
150.	RAM	21	Adenoma	0	1		23	

Continua

Número Paciente	Nome	Idade	Diagnóstico	Weiss	Estadiamento	Metástases	Conclusão	
							Tempo de seguimento	Tempo de recidiva
151.	RVS	17	Carcinoma	4	3	não	125	125
152.	SOM	28	Carcinoma	3	2	não	130	130
153.	SFS	53,5	Carcinoma	9	3	sim	10,366667	9,4
154.	SPMO	53,9	Carcinoma	3	1	não	32,2	32,2
155.	SSA	27,6	Carcinoma	8	4	sim	10,1	0
156.	SLS	36,5	Carcinoma	10	2	sim	12,366667	5
157.	SCG	40	Carcinoma	7	4	sim	38	6
158.	SA	37,4	Carcinoma	10	2	não	91,1	91,1
159.	SMF	37	Adenoma	2	1		49	
160.	SRBT	35	Carcinoma	6	2	sim	21	14
161.	TCSO	30,9	Adenoma	1	9		10,066667	
162.	TMP	24	Adenoma	2	1		195,866667	
163.	TMC	22	Carcinoma	7	3	sim	10	4,9
164.	TSS	60,4	Adenoma	0	9		97,7	
165.	TCP	81	Carcinoma	4	2	sim	19,633333	19,6
166.	TBL	39	Adenoma	1	1		157	
167.	VOS	41	Adenoma	1	1		234	
168.	VBO	42	Adenoma	2	1		73	
169.	VFG	44	Carcinoma	8	4	sim	46	0
170.	VRS	51,2	Carcinoma	3	2	não	32,433333	32,4
171.	VLE	36	Carcinoma	3	2	não	104	104
172.	VEO	77	Adenoma	2	1		90	
173.	VRPC	21,5	Adenoma	0	1		24,9	
174.	ZAP	43,2	Adenoma	0	1		24,6	

Número Paciente	DICER_RNA	TARBP2_RNA	Escore DICER1_prot	Escore TARBP_prot
1.	3			5
2.	1,7			5,333333333
3.	6,5	1,08		0
4.	1,453	0,569		
5.				
6.	4,704	2,491	2,5	3,333333333
7.			1,85	5
8.			4,515	5
9.			5,5	1,666666667
10.			5,7	4,666666667
11.	1,402	2,891	6,665	5,333333333
12.			2,535	0
13.			1,75	6
14.	3,431	0,962	3,5	5
15.	0,953	0,202	2,35	5,5
16.			6,035	0
17.			3,75	5,333333333
18.			6,335	0
19.			4,015	5,666666667
20.	23,135	2,679	2,25	5,666666667
21.	2,444	0,109	3,865	5
22.			4,665	0
23.				
24.			3,185	2,5
25.				
26.			5,165	0
27.			5,185	2,666666667
28.	8,05	0,395		
29.			3,335	6
30.			1,2	5,333333333
31.	1,387	1,295	2,835	5
32.			6,1	4
33.	0,808	0,509	0	0
34.			3,335	0
35.	0,546	0,359	1	
36.			2,5	5,5
37.			2,5	0
38.			5,665	0
39.			1	5
40.	1,649	0,646	0,7	4
41.			7,665	
42.			6,7	4,666666667
43.			0,7	0,666666667
44.	7,817	0,797	2,5	5
45.			1,2	7
46.	0,494	0,361	3,335	5
47.				
48.				1,666666667
49.	12,442	0,578	0,35	5
50.			5,765	5

Continua

Continuação

Número Paciente	DICER_RNA _m	TARBP2_RNA _m	Escore DICER1_prot	Escore TARBP_prot
51.	3,131	0,128	2,365	5
52.			2,2	5
53.	1,162	0,68	2,2	5,666666667
54.	2,705	0,53		
55.		1,989		
56.				
57.			2,5	2,666666667
58.	4,053		4	
59.		0,361	5,7	5
60.	16,807	0,77	4,35	1,666666667
61.	0,361	0,263	0,35	5
62.			3,335	4,333333333
63.	1,745	0,493	5	5
64.			5,5	6
65.			0,5	6
66.	2,044	0,316	6,35	5
67.	3,252	1,215		
68.		9	1,35	1,666666667
69.	1,609	9,652	2,2	2,5
70.			2,2	1,666666667
71.			2,835	4,666666667
72.	2,961	2	2,035	5
73.	4,422	1,99	0	5
74.			1,7	5
75.			6,515	5
76.		1,01	0,7	5
77.		0,455		
78.	1,256	0,562	4,165	1,666666667
79.			6	3,333333333
80.	0,877	0,154	1	5
81.	1,216	0,223	5,25	3,333333333
82.	3,902	0,231	5,035	3,333333333
83.			5,5	3,333333333
84.			2,365	3,333333333
85.			4,415	5
86.			1	4,666666667
87.			0	0
88.			0,85	5
89.			0	0
90.			1,35	5
91.			1,5	1,666666667
92.				
93.	4,26	0,544	0	5
94.			2,5	3,333333333
95.				
96.	1,056	0,36	2,2	5
97.			5,5	1,666666667
98.			2,5	5,333333333
99.	16,285	1,579	2,35	5
100.		0,507	4,185	5

Continua

Continuação

Número Paciente	DICER_RNA _m	TARBP2_RNA _m	Escore DICER1_prot	Escore TARBP_prot
101.			4,35	3,333333333
102.			3,5	3,333333333
103.				
104.	21,305		1	5
105.		0,478	5,5	1,666666667
106.	4,844	0,721	0,5	1,666666667
107.	0,783	0,605	0	5
108.			4,35	5
109.				
110.			0,7	6,333333333
111.				
112.			1,7	3,333333333
113.	1,76	0,443	1	3,333333333
114.			0,35	5
115.			1,85	5
116.			3,335	3,333333333
117.	6,159	1,588	4,5	4,333333333
118.			4,85	5
119.			4,035	5
120.	2,334	3,514	5,165	5,666666667
121.	2,856	0,686	4,665	5
122.	1,769	0,263	1,85	5
123.			0,85	5
124.			6	1,666666667
125.	2,979	1,195	2,35	3,333333333
126.			6,515	1,666666667
127.	1,322	0,726	6,5	0
128.			5,335	5
129.			6	5
130.			2,25	5
131.			5,665	5
132.			3,7	5
133.				
134.			2,35	5
135.			4,25	1,666666667
136.			3,165	2,666666667
137.	0,367	0,458	1,5	0
138.	12,424	0,088	1,7	5
139.	0,692	0,061	0	5
140.			0	1,666666667
141.	3,541	0,381	3,585	5
142.			2,665	5
143.			0	0
144.	2,911	0,354	5,35	5
145.			1,335	5,333333333
146.			1	0
147.			4,5	5
148.			2,5	5
149.			4,85	2,666666667
150.			1,25	5

Continua

				Conclusão
Número Paciente	DICER_RNA _m	TARBP2_RNA _m	Escore DICER1_prot	Escore TARBP_prot
151.	23,327		1,685	4,666666667
152.			4,165	5
153.			5,665	3,333333333
154.		0,099	5,335	5
155.			3,335	5
156.			3,335	3,333333333
157.			0,7	5
158.			2,5	5
159.			6,5	5
160.			0,5	3,666666667
161.			5,835	4,333333333
162.	1,322	0,161	3,335	1,666666667
163.	10,144	0,373		3,333333333
164.			0	
165.			4,835	1,666666667
166.			0,75	5
167.				9
168.			0,35	5
169.	2,055	0,706	4,535	5
170.		0,155	4	5
171.				5
172.			1,7	1,666666667
173.	0,754	0,211	4,015	5
174.	10,803	2,768	3,185	5

Crianças

Número Paciente	Nome	Idade	Diagnóstico	Weiss	Estadiamento	Metástases	Tempo de seguimento (meses)	Tempo de recidiva (meses)
1.	ACP	1,3	Clinicamente benigno	2	1	não	173	
2.	AGS	2,3	Clinicamente benigno	5	1	não	107,1666667	
3.	AES	0,9	Clinicamente benigno	3	2	não	133	
4.	BTMS	2,1	Clinicamente benigno	1	1	não	92	
5.	CESM	2,2	Clinicamente benigno	6	1	não	17,4	
6.	CNS	4,5	Clinicamente maligno	5	2	sim	25	11
7.	CFM	2,2	Clinicamente benigno	4	2	não	188	
8.	CMS	2,5	Clinicamente benigno	6	2	não	1	
9.	DBN	2,1	Clinicamente benigno	1	1	não	181,9	
10.	DSN	2,1	Clinicamente benigno	5	2	não	107	
11.	DEP	1,7	Clinicamente benigno	4	2	não	94	
12.	FRL	0,8	Clinicamente benigno	6	1	não	292,666666	
13.	FJOS	1,3	Clinicamente benigno	7	1	não	171,3	
14.	FESA	13	Clinicamente benigno	1	1	não	0	
15.	GMP	3	Clinicamente benigno	4	1	não	89,3	
16.	GGs	2,6	Clinicamente maligno	7	3	sim	12	5
17.	JFS	2,6	Clinicamente benigno	4	1	não	128,5666667	
18.	JFF	1,7	Clinicamente benigno	6	1	não	123	
19.	JLJ	1,1	Clinicamente benigno	5	1	não	219	
20.	JAD	2,5	Clinicamente benigno	6	2	não	124,7	
21.	JAL	3,3	Clinicamente maligno	5	2	sim	21,3	6,133333
22.	KVMS	0,9	Clinicamente maligno	4	2	sim	78	4
23.	LCSP	1,6	Clinicamente benigno	3	1	não	43,96666667	
24.	MRG (1)	3	Clinicamente benigno	6	1	não	301	
25.	MRG (2)	1,2	Clinicamente benigno	5	1	não	30	
26.	MESO	2,7	Clinicamente benigno	3	1	não	15,7	
27.	MGS	1	Clinicamente benigno	6	2	não	36	
28.	MFP	1	Clinicamente benigno	5	2	não	217	
29.	MMM	9	Clinicamente benigno	2	1	não	117,2	
30.	NLDB	0,5	Clinicamente benigno	6	1	não	274,1333333	
31.	NMM	2	Clinicamente maligno	8	3	sim	27	14
32.	NSM (1)	6	Clinicamente benigno	2	1	não	129	
33.	NSM (2)	3	Clinicamente benigno	10	2	não	129	
34.	NGGS	3,1	Clinicamente maligno	7	2	sim	20	12
35.	REFM	2,5	Clinicamente maligno	7	4	sim	4,4	0
36.	RSD	2	Clinicamente benigno	5	1	não	200	
37.	RAL	6	Clinicamente benigno	5	2	não	217	
38.	RFA (1)	2,6	Clinicamente maligno	5	1	sim	200,9666667	53
39.	RFA (2)	4,9	Clinicamente maligno	7	2	sim	173,1	25
40.	SSM	1	Clinicamente benigno	6	2	não	30,4	
41.	SIR	2,8	Clinicamente benigno	3	1	não	182	
42.	SRBP	2,2	Clinicamente benigno	2	2	não	48	48
43.	VRPO	1,4	Clinicamente benigno	4	2	não	218,9333333	218,93
44.	VTD	2,5	Clinicamente benigno	1	1	não	105,9666667	105,97
45.	VGv	9,4	Clinicamente maligno	7	4	sim	18	
46.	WBF	2,3	Clinicamente benigno	5	1	não	49,933334	49,9

Número Paciente	DICER_RNA	TARBP2_RNA	Escore DICER1_prot	Escore TARBP_prot
1.	3,726	2,131	4,515	5
2.	4,605	0,156	5,5	3,333333333
3.	8,48	0,967	5,25	5
4.	4,105	0,627	5,75	3,333333333
5.	3,248	0,522	5,835	5,333333333
6.	9	9	9	0
7.	2,806	1,04	6	5
8.	9	9	3,335	5,666666667
9.	9	9	5,5	1,666666667
10.	9	2,442	5	5
11.	9	9	4,665	3,333333333
12.	9	9	5,5	0
13.	2,059	0,942	5,835	1,333333333
14.	8,904	1,464	4,165	3,333333333
15.	9	9	4,165	2,5
16.	4,938	0,276	6,365	0
17.	9	9	6	3,333333333
18.	9	9	5,5	5
19.	9	9	5,75	0
20.	4,18	1,358	6	4,666666667
21.	9	9	3,185	5
22.	1,707	0,5	3,335	5
23.	23,745	0,704	5,5	2,5
24.	9	9	2,65	5
25.	4,285	10,415	5,5	5
26.	9	9	3,5	5
27.	9	9	2,835	5,333333333
28.	9	9	3,835	0
29.	1,256	0,026	5	3,333333333
30.	9	9	0,83	3,333333333
31.	11,069	0,842	4	5
32.	3,591	0,833	6	5
33.	9	9	3,335	3,333333333
34.	12,654	4,759	5,185	5
35.	9	9	5,75	3,333333333
36.	9	9	5,5	5
37.	9	9	5,835	5
38.	0,492	0,216	5	5
39.	9	9	4,05	1,666666667
40.	5,02	4,16	3,335	1,666666667
41.	9	0,486	5,5	4,333333333
42.	220,598	0,83	5,835	4,333333333
43.	9	9	3,835	3,333333333
44.	12,167	0,201	3,835	5
45.	1,081	0,403	3	5
46.	9	9	5,5	5

8 REFERÊNCIAS

1. Bertherat J, Mosnier-Pudar H, Bertagna X. Adrenal incidentalomas. *Curr Opin Oncol.* 2002;14(1):58-63.
2. 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 Intern Med.* 2003; 138(5):424-9.
3. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(6):2027-37.
4. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(5):1317-24.
5. Young JL, Jr., Miller RW. Incidence of malignant tumors in U. S. children. *J Pediatr.* 1975; 86(2):254-8.
6. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(7):2027-31.
7. 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 U S A.* 2001; 98(16):9330-5.

8. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, Lucon AM, Mendonça 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.
9. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009; 23(2):273-89.
10. Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2007; 39(6):461-6.
11. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer.* 2007; 14(1):13-28.
12. Berruti A, Baudin E, Gelderblom H, Haak HR, Porpiglia F, Fassnacht M, Pentheroudakis G; ESMO Guidelines Working Group. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012; 23(suppl 7):vii131-vii8.
13. Young W Jr. Conventional imaging in adrenocortical carcinoma: update and perspectives. *Horm Cancer.* 2011; 2(6):341-7.
14. Sahdev A, Reznick RH. Imaging evaluation of the non-functioning indeterminate adrenal mass. *Trends Endocrinol Metab.* 2004; 15(6):271-6.
15. Fassnacht M, Kenn W, Allolio B. Adrenal tumors: how to establish malignancy? *J Endocrinol Invest.* 2004; 27(4):387-99.

16. Ilias I, Sahdev A, Reznek RH, Grossman AB, Pacak K. The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocr Relat Cancer*. 2007; 14(3):587-99.
17. Honigschnabl S, Gallo S, Niederle B, Prager G, Kaserer K, Lechner G, Heinz-Peer G. How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. *Eur J Radiol*. 2002; 41(2):113-22.
18. Metser U, Miller E, Lerman H, Lievshitz G, Avital S, Even-Sapir E. 18F-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. *J Nucl Med*. 2006; 47(1):32-7.
19. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 1984; 8(3):163-9.
20. 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.
21. Johanssen S, Hahner S, Saeger W, Quinkler M, Beuschlein F, Dralle H, Haaf M, Kroiss M, Jurowich C, Langer P, Oelkers W, Spahn M, Willenberg HS, Mäder U, Allolio B, Fassnacht M. Deficits in the management of patients with adrenocortical carcinoma in Germany. *Dtsch Arztebl Int*. 2010; 107(50):885-91.

22. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, Al Ghuzlan A, Patey M, Decaussin M, Doucet L, Gobet F, Hoang C, Mazerolles C, Monges G, Renaudin K, Sturm N, Trouette H, Vacher-Lavenu MC, Viallon V, Baudin E, Bertagna X, Coste J, Libe R. Adrenocortical tumors: improving the practice of the Weiss system through virtual microscopy: a National Program of the French Network INCa-COMETE. *Am J Surg Pathol*. 2012; 36(8):1194-201.
23. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer*. 2011; 2(6):333-40.
24. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, Hammer GD. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. *Endocrinology*. 2002; 143(8):3122-35.
25. Libé R, Borget I, Ronchi CL, Terzolo M, Haff M, Laino F, Kherkhof T, Corsini E, Tabarin A, Chabre O, De la Foucheidière C, Nicoli P, Caron P, Manelli M, Haak H, Beuchlein F, Vetherat J, Berruti A, Fassnacht M, Baudin E. Prognostic Factors of advanced unresctable by stage III and IV ENSAT adrenocortical carcinomas (ACC). *Endocr Abstr*. 2013; 32:OC4.3.
26. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, Madureira G, Domenice S, Albergaria MA, Camargo MH, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol*. 1995; 154(6):2004-9.

27. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol*. 2003; 27(7):867-81.
28. Almeida MQ, Brito VN, Lins TS, Guerra-Junior G, de Castro M, Antonini SR, Arnhold IJ, Mendonça BB, Latronico AC. Long-term treatment of familial male-limited precocious puberty (testotoxicosis) with cyproterone acetate or ketoconazole. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008; 69(1):93-8.
29. 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.
30. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. 2009; 27(7):1108-15.
31. Fenske W, Volker HU, Adam P, Hahner S, Johanssen S, Wortmann S, Schmidt M, Morcos M, Müller-Hermelink HK, Allolio B, Fassnacht M. Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(3):919-28.

32. Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, Lloyd RV, Sandrini R, Silva JB, Epelman S, Shapiro DN, Parham DM. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. *Am J Clin Pathol*. 1994; 101(5):625-9.
33. Keegan CE, Hammer GD. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. *Trends Endocrinol Metab*. 2002; 13(5):200-8.
34. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*. 1978; 120(6):660-5.
35. Macfarlane DA. Cancer of adrenal cortex: the natural history, prognosis and treatment in the study of fifty cases. *Ann R Coll Surg Engl*. 1958; 23(3):155-86.
36. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucskey P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B; German Adrenocortical Carcinoma Registry Group; European Network for the Study of Adrenal Tumors. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer*. 2009; 115(2):243-50.
37. Kirschner LS. Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: a new hope. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(1):14-21.
38. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(7):2650-5.

-
39. Assié G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, Leboulleux S, Travagli JP, Dromain C, Bertagna X, Bertherat J, Schlumberger M, Baudin E. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007; 92(1):148-54.
 40. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol.* 2004; 22(5):838-45.
 41. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol.* 2011; 7(6):323-35.
 42. Brix D, Allolio B, Fenske W, Agha A, Dralle H, Jurowich C, Langer P, Mussack T, Nies C, Riedmiller H, Spahn M, Weismann D, Hahner S, Fassnacht M; German Adrenocortical Carcinoma Registry Group. Laparoscopic versus open adrenalectomy for adrenocortical carcinoma: surgical and oncologic outcome in 152 patients. *Eur Urol.* 2010; 58(4):609-15.
 43. Murphy MM, Witkowski ER, Ng SC, McDade TP, Hill JS, Larkin AC, Whalen GF, Litwin DE, Tseng JF. Trends in adrenalectomy: a recent national review. *Surg Endosc.* 2010; 24(10):2518-26.

-
44. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti . Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 2007; 356(23):2372-80.
 45. Fassnacht M, Hahner S, Polat B, Koschker AC, Kenn W, Flentje M, Allolio B. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006; 91(11):4501-4.
 46. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Della Casa S, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer*. 2005; 12(3):657-66.
 47. Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Oberg K, Eriksson B. Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: a long-term survival and its adjuvant use. *Ann Oncol*. 2000; 11(10):1281-7.
 48. Berruti A, Sperone P, Daffara F, Reimondo G, Papotti M, Dogliotti L, Angeli A, Terzolo M. Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. *Expert Opin Emerg Drugs*. 2008; 13(3):497-509.

49. Fassnacht M KM, Weismann D, Allolio B. New targets and therapeutic approaches for endocrine malignancies. *Pharmacol Ther.* 2009; 123(1):117-41.
50. Quinkler M HS, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, Strasburger C, Allolio B, Fassnacht M.. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(6):2057-62.
51. Wortmann S QM, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, Allolio B, Fassnacht M. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2010; 162(2):349-56.
52. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, Sanders D, Thomas DG, Doherty G, Hammer G. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res.* 2009; 15(2):668-76.
53. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, Louvel A, Luton JP, Le Bouc Y. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82(8):2559-65.
54. 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 Metab.* 2005; 90(3):1819-29.

-
55. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, Sanders D, Aljundi RT, Gauger PG, Thompson NW, Taylor JM, Hanash SM. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol*. 2003; 162(2):521-31.
 56. 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; 65(17):7622-7.
 57. Libe R, Bertherat J. Molecular genetics of adrenocortical tumours, from familial to sporadic diseases. *Eur J Endocrinol*. 2005; 153(4):477-87.
 58. Logiè A, Boulle N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, Le Bouc Y, Gicquel C. Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol*. 1999; 23(1):23-32.
 59. Leighton PA, Saam JR, Ingram RS, Stewart CL, Tilghman SM. An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev*. 1995; 9(17):2079-89.
 60. Choufani S, Shuman C, Weksberg R. Beckwith-Wiedemann syndrome. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2010; 154C(3):343-54.
 61. Velázquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, Höög A, Odeberg J, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Nilsson P, Bäckdahl M. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery*. 2005; 138(6):1087-94.

-
62. 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.
 63. Laurell C, Velázquez-Fernandez D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, Höög A, Kjellman M, Lundeberg J, Hamberger B, Larsson C, Nilsson P, Bäckdahl M. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol*. 2009; 161(1):141-52.
 64. Soon PS, Gill AJ, Benn DE, Clarkson A, Robinson BG, McDonald KL, Sidhu SB. Microarray gene expression and immunohistochemistry analyses of adrenocortical tumors identify IGF2 and Ki-67 as useful in differentiating carcinomas from adenomas. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(2):573-83.
 65. Boulle N, Logié A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased Levels of Insulin-Like Growth Factor II (IGF-II) and IGF-Binding Protein-2 Are Associated with Malignancy in Sporadic Adrenocortical Tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998; 83(5):1713-20.
 66. Gudmundsson KO, Thorsteinsson L, Sigurjonsson OE, Keller JR, Olafsson K, Egeland T, Gudmundsson S, Rafnar T. Gene expression analysis of hematopoietic progenitor cells identifies Dlg7 as a potential stem cell gene. *Stem Cells*. 2007; 25(6):1498-506.

-
67. Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzuco TL, Mariani BM, Brito LP, Gonçalves TC, Alencar GA, Lima Lde O, Faria AM, Bourdeau I, Lucon AM, Freire DS, Latronico AC, Mendonça BB, Lacroix A, Lerario AM. Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients. *Eur J Endocrinol*. 2012; 166(1):61-7.
 68. Li FP, Fraumeni JF, Jr., Mulvihill JJ, Blattner WA, Dreyfus MG, Tucker MA, Miller RW. A cancer family syndrome in twenty-four kindreds. *Cancer Res*. 1988; 48(18):5358-62.
 69. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *Oncologist*. 2008; 13(5):548-61.
 70. Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, Jullian E, Beck-Peccoz P, Bertagna X, Gicquel C, Bertherat J. Somatic TP53 Mutations Are Relatively Rare among Adrenocortical Cancers with the Frequent 17p13 Loss of Heterozygosity. *Clin Cancer Res*. 2007; 13(3):844-50.
 71. Wodarz A, Nusse R. Mechanisms of Wnt Signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1998; 14(1):59-88.
 72. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000; 14(15):1837-51.
 73. Iorio MV, Croce CM. microRNA involvement in human cancer. *Carcinogenesis*. 2012, 2012;33(6):1126-33.
 74. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*. 2009; 136(4):586-91.

-
75. Liu C, Li Y, Semenov M, Han C, Baeg GH, Tan Y, Zhang Z, Lin X, He X. Control of beta-catenin phosphorylation/degradation by a dual-kinase mechanism. *Cell*. 2002; 108(6):837-47.
76. Kikuchi A. Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci*. 2003; 94(3):225-9.
77. Gaujoux S, Grabar S, Fassnacht M, Ragazzon B, Launay P, Libé R, Chokri I, Audebourg A, Royer B, Sbiera S, Vacher-Lavenu MC, Dousset B, Bertagna X, Allolio B, Bertherat J, Tissier F. β -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2011, 2011; 17(2):328-36.
78. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, Omeiri H, Rodriguez S, Perlemoine K, René-Corail F, Elarouci N, Sbiera S, Kroiss M, Allolio B, Waldmann J, Quinkler M, Mannelli M, Mantero F, Papatthomas T, De Krijger R, Tabarin A, Kerlan V, Baudin E, Tissier F, Dousset B, Groussin L, Amar L, Clauser E, Bertagna X, Ragazzon B, Beuschlein F, Libé R, de Reyniès A, Bertherat J. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*. 2014; 46(6):607-12.
79. Hao HX, Xie Y, Zhang Y, Charlat O, Oster E, Avello M, Lei H, Mickanin C, Liu D, Ruffner H, Mao X, Ma Q, Zamponi R, Bouwmeester T, Finan PM, Kirschner MW, Porter JA, Serluca FC, Cong F. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nature*. 2012; 485(7397):195-200.

-
80. Santarpia L, Nicoloso M, Calin GA. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocr Relat Cancer*. 2010; 17(1):F51-75.
 81. Bahubeshi A, Tischkowitz M, Foulkes WD. miRNA processing and human cancer: DICER1 cuts the mustard. *Science translational medicine. Sci Transl Med*. 2011; 3(111):111ps46.
 82. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet*. 2008; 9:102-14.
 83. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, Alcorn H, Li MZ, Mills AA, Elledge SJ, Anderson KV, Hannon GJ. Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet*. 2003; 35(3):215-7.
 84. Fukagawa T, Nogami M, Yoshikawa M, Ikeno M, Okazaki T, Takami Y, Nakayama T, Oshimura M. Dicer is essential for formation of the heterochromatin structure in vertebrate cells. *Nat Cell Biol*. 2004; 6(8):784-91.
 85. Heravi-Moussavi A, Anglesio MS, Cheng SW, Senz J, Yang W, Prentice L, Fejes AP, Chow C, Tone A, Kalloger SE, Hamel N, Roth A, Ha G, Wan AN, Maines-Bandiera S, Salamanca C, Pasini B, Clarke BA, Lee AF, Lee CH, Zhao C, Young RH, Aparicio SA, Sorensen PH, Woo MM, Boyd N, Jones SJ, Hirst M, Marra MA, Gilks B, Shah SP, Foulkes WD, Morin GB, Huntsman DG. Recurrent somatic DICER1 mutations in nonepithelial ovarian cancers. *N Engl J Med*. 2012; 366(3):234-42.

-
86. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99(24):15524-9.
 87. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435(7043):834-8.
 88. Cho WC. MicroRNAs: potential biomarkers for cancer diagnosis, prognosis and targets for therapy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010; 42(8):1273-81.
 89. Gaur A, Jewell DA, Liang Y, Ridzon D, Moore JH, Chen C, Ambros VR, Israel MA. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 2007; 67(6):2456-68.
 90. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(11):857-66.
 91. Iorio MV, Croce CM. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol*. 2009; 27(34):5848-56.
 92. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *N Engl J Med*. 2005; 353(17):1768-71.

-
93. Özata DM, Caramuta S, Velázquez-Fernandez D, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2011, 2011;18(6):643-55.
94. Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanesi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res*. 2010; 70(8):3140-9.
95. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer*. 2011; 117(8):1630-9.
96. Bertherat J, Bertagna X. Pathogenesis of adrenocortical cancer. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009; 23(2):261-71.
97. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7684-92.
98. Tömböl Z, Szabó PM, Molnar V, Wiener Z, Tölgyesi G, Horányi J, Riesz P, Reismann P, Patócs A, Likó I, Gaillard RC, Falus A, Rácz K, Igaz P. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2009; 16(3):895-906.

-
99. Yang Y, Liu L, Zhang Y, Guan H, Wu J, Zhu X, Yuan J, Li M. MiR-503 targets PI3K p85 and IKK- β and suppresses progression of non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2014; 135(7):1531-42.
 100. Caramuta S, Lee L, Ozata DM, Akçakaya P, Xie H, Höög A, Zedenius J, Bäckdahl M, Larsson C, Lui WO.. Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2013; 20(4):551-64.
 101. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, Peralta-Del Valle MH, Figueiredo BC, Zambetti GP, Lalli E. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2010; 70(11):4666-75.
 102. Zhang L, Huang J, Yang N, Greshock J, Megraw MS, Giannakakis A, Liang S, Naylor TL, Barchetti A, Ward MR, Yao G, Medina A, O'brien-Jenkins A, Katsaros D, Hatzigeorgiou A, Gimotty PA, Weber BL, Coukos G. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; 103(24):9136-41.
 103. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin YC, Fredrickson T, Landgraf P, Ramachandra S, Huppi K, Toro JR, Zenger VE, Metcalf RA, Marti GE. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 2007; 109(12):5079-86.

-
104. Merritt WM, Lin YG, Han LY, Kamat AA, Spannuth WA, Schmandt R, Urbauer D, Pennacchio LA, Cheng JF, Nick AM, Deavers MT, Mourad-Zeidan A, Wang H, Mueller P, Lenburg ME, Gray JW, Mok S, Birrer MJ, Lopez-Berestein G, Coleman RL, Bar-Eli M, Sood AK. Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359(25):2641-50.
105. Nakamura T, Canaani E, Croce CM. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104(26):10980-5.
106. Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev*. 2006; 20(16):2202-7.
107. Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*. 2005; 96(2):111-5.
108. Hu Z, Chen J, Tian T, Zhou X, Gu H, Xu L, Zeng Y, Miao R, Jin G, Ma H, Chen Y, Shen H. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*. 2008; 118(7):2600-8.
109. Wang HW, Noland C, Siridechadilok B, Taylor DW, Ma E, Felderer K, Doudna JA, Nogales E. Structural insights into RNA processing by the human RISC-loading complex. *Nat Struct Mol Biol*. 2009; 16(11):1148-53.

-
110. Macrae IJ, Zhou K, Li F, Repic A, Brooks AN, Cande WZ, Adams PD, Doudna JA. Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science*. 2006; 311(5758):195-8.
 111. Pampalakis G, Diamandis EP, Katsaros D, Sotiropoulou G. Down-regulation of dicer expression in ovarian cancer tissues. *Clin Biochem*. 2010; 43(3):324-7.
 112. Sand M, Gambichler T, Skrygan M, Sand D, Scola N, Altmeyer P, ?Bechara FG. Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and dicer in epithelial skin cancer. *Cancer Invest*. 2010; 28(6):649-53.
 113. Dedes KJ, Natrajan R, Lambros MB, Geyer FC, Lopez-Garcia MA, Savage K, Jones RL, Reis-Filho JS. Down-regulation of the miRNA master regulators Drosha and Dicer is associated with specific subgroups of breast cancer. *Eur J Cancer*. 2011; 47(1):138-50.
 114. Krill KT, Gurdziel K, Heaton JH, Simon DP, Hammer GD. Dicer deficiency reveals microRNAs predicted to control gene expression in the developing adrenal cortex. *Mol Endocrinol*. 2013; 27(5):754-68.
 115. Hill DA, Ivanovich J, Priest JR, Gurnett CA, Dehner LP, Desruisseau D, Jarzembowski JA, Wikenheiser-Brokamp KA, Suarez BK, Whelan AJ, Williams G, Bracamontes D, Messinger Y, Goodfellow PJ. DICER1 mutations in familial pleuropulmonary blastoma. *Science*. 2009; 325(5943):965.
 116. Boman F, Hill DA, Williams GM, Chauvenet A, Fournet JC, Soglio DB, Messinger Y, Priest JR. Familial association of pleuropulmonary blastoma with cystic nephroma and other renal tumors: a report from the International Pleuropulmonary Blastoma Registry. *J Pediatr*. 2006; 149(6):850-4.

-
117. Cross SF, Arbuckle S, Priest JR, Marshall G, Charles A, Dalla Pozza L. Familial pleuropulmonary blastoma in Australia. *Pediatr Blood Cancer*. 2010; 55(7):1417-9.
118. Priest JR, Williams GM, Hill DA, Dehner LP, Jaffe A. Pulmonary cysts in early childhood and the risk of malignancy. *Pediatr Pulmonol*. 2009; 44(1):14-30.
119. Martello G, Rosato A, Ferrari F, Manfrin A, Cordenonsi M, Dupont S, Enzo E, Guzzardo V, Rondina M, Spruce T, Parenti AR, Daidone MG, Bicciato S, Piccolo S. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. *Cell*. 2010; 141(7):1195-207.
120. Forbes SA, Bindal N, Bamford S, Cole C, Kok CY, Beare D, Jia M, Shepherd R, Leung K, Menzies A, Teague JW, Campbell PJ, Stratton MR, et al. COSMIC: mining complete cancer genomes in the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:D945-950.
121. Melo SA, Ropero S, Moutinho C, Aaltonen LA, Yamamoto H, Calin GA, Rossi S, Fernandez AF, Carneiro F, Oliveira C, Ferreira B, Liu CG, Villanueva A, Capella G, Schwartz S Jr, Shiekhhattar R, Esteller M. A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*. 2009; 41(3):365-70.
122. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, Zerbini MC, Liberman B, Carlos Gomes G, Kirschner MA. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*. 2000; 88(4):711-36.

-
123. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001; 25(4):402-8.
124. Zhang J, Zhang XH, Wang CX, Liu B, Fan XS, Wen JJ, Shi QI, Zhou XJ. Dysregulation of microRNA biosynthesis enzyme Dicer plays an important role in gastric cancer progression. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014; 7(4):1702-7.
125. Faggad A, Kasajima A, Weichert W, Stenzinger A, Elwali NE, Dietel M, Denkert C. Down-regulation of the microRNA processing enzyme Dicer is a prognostic factor in human colorectal cancer. *Histopathology*. 2012 ; 61(4):552-61.
126. Shu GS, Yang ZL, Liu DC. Immunohistochemical study of Dicer and Drosha expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Pathol Res Pract*. 2012; 208(7):392-7.
127. Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R. Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*. 2006; 169(5):1812-20.
128. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev*. 2014; 35:282-326.
129. Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol*. 2011; 351(1):52-7.

130. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, Lerario AM, Maciel CC, Mattos GE, Jorge AA, Mendonça 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.
131. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006; 103(7):2257-61.
132. Guo Y, Chen Z, Zhang L, Zhou F, Shi S, Feng X, Li B, Meng X, Ma X, Luo M, Shao K, Li N, Qiu B, Mitchelson K, Cheng J, He J. Distinctive microRNA profiles relating to patient survival in esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer Res.* 2008; 68(1):26-33.
133. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics.* 2009:837514.
134. Cheng AM, Byrom MW, Shelton J, Ford LP. Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(4):1290-7.
135. Geng L, Sun B, Gao B, Wang Z, Quan C, Wei F, Fang XD. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. *Int J Mol Sci.* 2014; 15(5):8458-72.

136. Yu D, Zhou H, Xun Q, Xu X, Ling J, Hu Y. microRNA-103 regulates the growth and invasion of endometrial cancer cells through the downregulation of tissue inhibitor of metalloproteinase 3. *Oncol Lett.* 2012; 3(6):1221-6.
137. Chendrimada TP, Gregory RI, Kumaraswamy E, Norman J, Cooch N, Nishikura K, Shiekhattar R. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* 2005; 436:740-4.
138. Haase AD, Jaskiewicz L, Zhang H, Laine S, Sack R, Gatignol A, Filipowicz W. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep.* 2005; 6:961-967.

APÊNDICE

Apêndice A - Submissão para a Revista Oncotarget

4/26/2015

Oncotarget

Oncotarget

MANUSCRIPT HOME

AUTHOR INSTRUCTIONS

REVIEWER INSTRUCTIONS

LOGOUT

JOURNAL HOME

Detailed Status Information

Manuscript #

Current Revision #

Submission Date

Current Stage

Title

Manuscript Type

Corresponding Author

Contributing Authors

004574

0

2015-04-25 23:53:12

Initial QC

Low DICER1 expression is associated with poor clinical outcome in adrenocortical carcinoma

Research Paper

Madson Almeida (University of Sao Paulo Medical School)

Gabriela Sousa , Tamyá Ribeiro , Andre Faria , Beatriz Mariani , Antonio Lerario , Maria Claudia Zerbini , Ibero Soares , Alda Wakamatsu , Venancio Alves , Berenice Mendonca , Maria Candida Fragoso , Ana Claudia Latronico

Abstract

DICER1 and its cofactor TARBP2 are key components of the miRNA processing machinery. Low DICER1 expression was associated with poor outcome in several cancers. Recently, hot-spot DICER1 mutations were found in ovarian tumors, and TARBP2 truncating mutations in tumor cell lines with microsatellite instability. In this study, we assessed DICER1 e TRBP protein expression in 151 adult adrenocortical tumors (77 adenomas and 74 carcinomas). Expression of DICER1 and TARBP2 gene was assessed in a subgroup of 61 tumors. Additionally, we investigated mutations in metal biding sites located at the RNase IIIb domain of DICER1 and in the exon 5 of TARBP2 in 61 tumors. A strong DICER1 expression was demonstrated in 32% of adenomas and in 51% of carcinomas (p= 0.028). Similarly, DICER1 gene overexpression was more frequent in carcinomas (60%) than in adenomas (23%, p= 0.006). But, among adrenocortical carcinomas, a weak DICER1 expression was significantly more frequent in metastatic than in non-metastatic adrenocortical carcinomas (66% vs. 31%; p= 0.002). Additionally, a weak DICER1 expression was significantly correlated with a reduced overall (p= 0.004) and disease-free (p= 0.005) survival. In the multivariate analysis, a weak DICER1 expression (p= 0.048) remained as independent predictors of recurrence. Regarding TARBP2 gene, its protein and gene expression did not correlate with histopathological and clinical parameters. No variant was identified in hot spot areas of DICER1 and TARBP2. In conclusion, a weak DICER1 protein expression was associated with reduced disease-free and overall survival and was a predictor of recurrence in adrenocortical carcinomas.

Keywords

Conflict of Interest

DICER1, TARBP2, microRNA, recurrence, adrenocortical carcinoma

No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.

Stage	Start Date
Initial QC	2015-04-26 00:55:02
Manuscript Submission	2015-04-25 23:53:12

MANUSCRIPT HOME

CITATION FORMATTING

REVIEWER INSTRUCTIONS

HELP FOR AUTHORS

LOGOUT

eJournalPress

Licensed under Patent #US 7,620,555B1

http://oncotarget.msubmit.net/cgi-bin/main.plex?form_type=status_details&j_id=470&ms_id=5447&ms_rev_no=0&ms_id_key=ftdPnOCdPurGZZz2OSPSIQh... 1/1