ISADORA PONTES CAVALCANTE

**Correlação da expressão de GLUT1, HK1, HK2 e HK3
com alta captação de ^{18}F -FDG em hiperplasia
macronodular adrenal primária**

Dissertação a ser apresentada na Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de: Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2014

Agradecimentos

Agradeço à minha orientadora, Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, que me aceitou como aluna e sempre foi extremamente otimista com a realização deste trabalho.

À Dra. Maria Claudia Nogueira Zerbini, por sua paciência em me ensinar, sua disponibilidade e contribuição imprescindíveis para este trabalho.

Ao Dr. Guilherme Alencar e Beatriz Mariani, por todas as sugestões sempre oportunas durante a realização deste trabalho.

A todos assistentes e colegas de pós-graduação do LIM/42 do HCFMUSP.

À Esmeralda, Sandra, Maria Cristina e Angela, do Laboratório de Imunistoquímica, por toda a dedicação na realização dos experimentos de imunoistoquímica.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro.

A todos os meus amigos, em especial, Maiara, Amanda e Gabriella, pela compreensão, cumplicidade, por todas as palavras de conforto e momentos de descontração.

À minha avó, pelo exemplo de vida, de dedicação e de humildade que levarei para sempre.

Aos meus irmãos e sobrinhos, cujo afeto me deu suporte para não desanimar mesmo nos momentos mais difíceis.

Agradeço especialmente aos meus pais, por nunca me deixarem desistir dos meus sonhos e pelo apoio incondicional em todas as decisões da minha vida.

Sumário

Lista de abreviaturas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Summary

1. Introdução

1.1 Síndrome de Cushing.....	1
1.2 Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária.....	2
1.2.1 Aspectos laboratoriais.....	2
1.2.2 Aspectos anatomopatológicos.....	2
1.2.3 Aspectos moleculares.....	4
1.2.4 Aspectos radiológicos.....	5
1.2.5 Tomografia por emissão de pósitrons.....	5
1.3 Proteínas transportadoras de glicose.....	9
1.4 Hexokinases.....	12
1.5 Expressão dos genes estudados em outras doenças.....	16
1.6 Justificativa.....	17

2. Objetivos.....18

3. Métodos..... 19

3.1 Considerações éticas.....	19
3.2 Pacientes.....	19
3.3 ¹⁸ F-FDG PET/CT.....	19
3.4 PCR quantitativa em Tempo Real.....	20
3.4.1 Extração de RNA.....	20
3.4.2 Síntese de cDNA.....	22

3.4.3 PCR em Tempo Real.....	23
3.5 Imunoistoquímica.....	24
3.5.1 Desparafinização.....	24
3.5.2 Hidratação.....	24
3.5.3 Digestão ou recuperação antigênica.....	25
3.5.4 Bloqueio da peroxidase endógena.....	25
3.5.5 Bloqueio de IgG inespecíficas.....	25
3.5.6 Incubação com os anticorpos.....	25
3.5.7 Montagem das lâminas.....	26
3.5.8 Interpretação dos resultados das reações imunoistoquímicas.....	26
3.6 Análise estatística.....	27
4. Resultados.....	28
4.1 Padrão de captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH.....	28
4.2 Correlação entre a captação de ^{18}F -FDG e o tamanho do maior nódulo nos pacientes com PMAH.....	29
4.3 Correlação entre a expressão gênica do <i>SLC2A1</i> , <i>HK1</i> , <i>HK2</i> , <i>HK3</i> e a captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH.....	29
4.4 Correlação entre a expressão proteica do GLUT1 e HK2 e a captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH.....	32
4.5 Comparação da expressão gênica do <i>SLC2A1</i> e <i>HK2</i> entre pacientes com PMAH, CACs e AACs.....	34
4.6 Comparação da expressão proteica do GLUT1 e HK2 entre pacientes com PMAH, CACs e AACs.....	35
5. Discussão.....	41
6. Conclusões.....	46
7. Cronograma.....	47
8. Referências.....	48

Lista de abreviaturas

AAC	Adenoma adrenocortical
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AIMAH	Hiperplasia adrenal macronodular independente de ACTH
ATP	Adenosina trifosfato
CAC	Carcinoma adrenocortical
CCR	Carcinoma colorretal
cDNA	DNA complementar
CT	do inglês, <i>Threshold cycle</i>
¹⁸ F-FDG	2-[¹⁸ F]fluor-2-deoxi-D-glicose
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotídeo reduzida
FDG-6P	[¹⁸ F] flúor-2-deoxi-D-glicose 6-fosfato
G 6-P	Glicose 6-Fosfato
G 6-Pase	Glicose 6-fosfato-isomerase
GLUTs	Transportadores de glicose
HCC	Carcinoma hepatocelular
HKs	Hexokinases
HSCORE	do inglês, <i>Histochemical Score</i>
HU	Unidades Hounsfield
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotido reduzida
OSEM	Maximização da expectativa do subconjunto organizado
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET	Tomografia por emissão de pósitrons
Pi	Fosfato inorgânico
PMAH	Hiperplasia macronodular adrenal primária
PRKACA	Proteína kinase A dependente de AMPc
RM	Ressonância magnética

RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	Ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	Transcriptase reversa PCR
SC	Síndrome de Cushing
SUV _{máx}	<i>Maximum Standard Uptake Value</i>
TC	Tomografia computadorizada
TNE	Tumor neuroendócrino

Lista de Figuras

Figura 1 – Aspectos macroscópicos de adrenal com PMAH.....	3
Figura 2 – Aspectos microscópicos de adrenal com PMAH	3
Figura 3 – Aspectos radiológicos de paciente com PMAH: RM e TC	5
Figura 4 – PET/CT de paciente com PMAH	6
Figura 5 – Demonstração do papel dos GLUTs e HKs no metabolismo da glicose/ ¹⁸ F-FDG	7
Figura 6 – Diferença entre a captação de ¹⁸ F-FDG em lesões adrenocorticais benignas e malignas	8
Figura 7 - Imagem transaxial de ¹⁸ F-FDG-PET/CT em três pacientes com PMAH, demonstrando massas adrenais bilaterais com captação aumentada de ¹⁸ F-FDG em comparação com o fígado..	9
Figura 8– Representação da estrutura dos GLUTs na membrana celular.....	11
Figura 9 – A fosforilação da glicose, catalisada pela HK.....	13
Figura 10 – Representação da via metabólica da glicose em célula tumoral altamente glicolítica	15
Figura 11– Eletroforese de gel de agarose a 1% representativa dos RNAs extraídos de tecidos de adrenais, demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 18S e 28S dos RNAs ribossomais.....	22
Figura 12 – ¹⁸ F-FDG PET/CT de uma paciente deste estudo com PMAH.....	28
Figura 13 - Relação entre a captação de ¹⁸ F-FDG (SUVmáx) e o tamanho do maior nódulo em pacientes com PMAH.	29
Figura 14– Correlação entre a expressão gênica do <i>SLC2A1</i> e o SUVmáx.....	30
Figura 15 - Correlação entre a expressão gênica do <i>HK1</i> e o SUVmáx	30
Figura 16 - Correlação entre a expressão gênica do <i>HK2</i> e o SUVmáx	31
Figura 17- Correlação entre a expressão gênica do <i>HK3</i> e o SUVmáx	31
Figura 18 – Correlação entre a expressão proteica do GLUT1 (HSCORE) e o SUVmáx nos pacientes com PMAH	33
Figura 19 – Correlação entre a expressão proteica da HK2 (HSCORE) e o SUVmáx nos pacientes com PMAH	33
Figura 20 – Comparação entre as expressões gênicas do <i>SCL2A1</i> em PMAH, AACs e CACs...	34
Figura 21 - Comparação entre as expressões gênicas da <i>HK2</i> em PMAH, AACs e CACs.....	35

Figura 22 – Comparação entre as expressões proteicas do GLUT1 em PMAH, AACs e CACs, a partir do HSCORE.	38
Figura 23 - Comparação entre as expressões proteicas do GLUT1 em PMAH, AACs e CACs, a partir do HSCORE.	38
Figura 24 – Fotos de imunomarcacão do GLUT1 em paciente com PMAH.....	39
Figura 25 – Fotos de imunomarcacão da HK2 em paciente com PMAH.....	39
Figura 26 – Fotos de imunomarcacão do GLUT1 e HK2 em paciente com AAC	40
Figura 27 – Fotos de imunomarcacão do GLUT1 e HK2 em paciente com CAA	40

Lista de tabelas

Tabela 1 – Principais causas da síndrome de Cushing.....	1
Tabela 2 - Anticorpos utilizados para o estudo proteico, e suas respectivas diluições e controles positivos utilizados.....	24
Tabela 3 – Análise da imunomarcção proteica de GLUT1 de localização membranosa (M) e de HK2 nos pacientes com PMAH.	32
Tabela 4 – HSCORE dos pacientes com ACC e CAC, tamanho do nódulo e score de Weiss.....	35
Tabela 5 – Distribuição da expressão proteica nos pacientes com AAC, CAA e PMAH.	37

Resumo

Introdução: Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária (PMAH) é uma causa rara de Síndrome de Cushing (SC), caracterizada por macronódulos funcionantes geralmente acometendo ambas as glândulas adrenais. Recentemente, o exame ^{18}F -FDG PET/CT detectou três pacientes com PMAH apresentando captação aumentada de ^{18}F -FDG. No entanto, ainda não foi elucidado o mecanismo pelo qual a PMAH apresentaria uma alta captação de ^{18}F -FDG.

Objetivos: Os objetivos deste estudo foram investigar se a expressão de GLUT1, HK1, HK2 e/ou HK3 estão relacionados à alta captação de ^{18}F -FDG na PMAH e comparar estas expressões com tecidos adrenais provenientes de pacientes com AAC e CAA. **Métodos:** 12 pacientes com PMAH que realizaram ^{18}F -FDG-PET/CT, previamente à adrenalectomia. A captação de ^{18}F -FDG foi quantificada como *maximum standardized uptake value* (SUVmax). Expressão do RNAm foi investigada através de RT-PCR e a expressão proteica através de técnicas de imunoistoquímica. Expressão gênica e proteica dos pacientes com PMAH foi comparada com 15 pacientes com AAC e 10 pacientes com CAA. As correlações foram realizadas através do teste de coeficiente de correlação de Pearson e as comparações, através do teste *Kruskal-Wallis*, seguido do ajuste de Dunn. Significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$. **Resultados:** Todos os pacientes com PMAH apresentaram alta captação de ^{18}F -FDG, cujo SUVmáx variou de 3.3 a 8.9 e o tamanho do maior nódulo variou de 3.5 a 15cm. Foi observada forte correlação positiva entre o tamanho do maior nódulo e o SUVmáx nos pacientes com PMAH. No entanto, não foi estabelecida correlação entre a expressão de GLUT1, HK1, HK2 e HK3 e o SUVmáx nos pacientes com PMAH. A expressão do *SLC2A1* e *HK2* foi significativamente maior nos pacientes com CAA do que nos pacientes com AAC e PMAH. **Conclusões:** A captação aumentada de ^{18}F -FDG na PMAH não está relacionada ao aumento da expressão de GLUT1, HK1, HK2 e HK3. Estudos futuros serão necessários para elucidar a via glicolítica que é responsável pelo metabolismo da glicose na PMAH.

Descritores: Síndrome de Cushing; glândulas suprarrenais; hiperplasia; tomografia por emissão de pósitrons; fluordesoxiglucose; hexoquinase; proteínas transportadoras de glicose; imuno-histoquímica; reação em cadeia da polimerase em tempo real.

Summary

Correlation between GLUT1, HK1, HK2 and HK3 expression and high ^{18}F -FDG uptake in primary macronodular adrenal hyperplasia

Introduction: Primary macronodular adrenal hyperplasia (PMAH) is a rare cause of Cushing's syndrome, characterized by functioning adrenal macronodules and increased cortisol production. Recently, integrated ^{18}F -FDG-PET/CT examination revealed an increased ^{18}F -FDG uptake in patients with PMAH. However, it is still unclear the mechanism by which PMAH would present with a high ^{18}F -FDG uptake in PET/CT. **Objectives:** The aim of this study was to investigate whether GLUT1, HK1, HK2 and/or HK3 expression would account for the high ^{18}F -FDG uptake in PMAH and compare these expressions with ACA and ACC adrenal tissue. **Methods:** 12 patients undergoing adrenalectomy for PMAH with previous ^{18}F -FDG-PET/CT. ^{18}F -FDG uptake was quantified as the maximum standardized uptake value (maxSUV). mRNA expression was investigated through quantitative RT-PCR and protein expression was investigated using immunohistochemical studies. PMAH gene and protein expression were compared to 15 patients with ACA and 10 with ACC. Correlations were performed through Pearson's correlation coefficient test and comparisons through *Kruskal-Wallis* test, followed by *Dunn* adjust. Statistical significance was considered when $p < 0.05$. **Results:** All patients with PMAH presented with high ^{18}F -FDG uptake, the range of SUVmax in these patients varied from 3.3 to 8.9 and the nodule sizes varied from 3.5 to 15 cm. There was a strong positive correlation between the nodule size and ^{18}F -FDG uptake. However, no correlation could be established between gene and protein expression of GLUT1, HK1, HK2 and HK3 and ^{18}F -FDG uptake. *SLC2A1* and *HK2* expression was significantly higher in patients with CCA than in patients with AAC and PMAH. **Conclusions:** Increased ^{18}F -FDG uptake in PMAH does not arise from the overexpression of GLUT1, HK1, HK2 or HK3. Further investigation is required to elucidate the glycolytic pathway involved in glucose metabolism in PMAH.

Descriptors: Cushing's syndrome; adrenal glands; hyperplasia; positron emission tomography; fluordesoxyglucose; hexokinase; glucose transporters; immunohistochemistry; real time polymerase chain reaction.

1. Introdução

1.1 Síndrome de Cushing

A Síndrome de Cushing (SC), descrita em 1932 por Harvey Cushing (1), é caracterizada por afecções clínicas causadas por exposição crônica e elevada aos glicocorticoides (2, 3). Podemos classificar a SC endógena em dependente e independente de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH).

Dentre as causas da SC independente de ACTH, as lesões unilaterais (adenomas e carcinomas adrenocorticais) são as mais frequentes e correspondem a 90-95% dos casos. As lesões bilaterais são bem menos comuns e incluem a Hiperplasia Micronodular Pigmentosa Primária (PPNAD) e a Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária (PMAH), representando menos de 2% dos casos de SC independente de ACTH (Tabela 1) (4).

Tabela 1 – Principais causas da síndrome de Cushing. Adaptado de Newell-Price (4).

		Proporção
ACTH-dependente	Doença de Cushing	70%
	Síndrome do ACTH ectópico	10%
	ACTH de origem desconhecida	5%
ACTH-independente	Adenoma suprarrenal	10%
	Carcinoma suprarrenal	5%
	AIMAH	<2%
	PPNAD	<2%
	Síndrome de McCune-Albright	<2%

Recentemente, a publicação de Louiset *et al.* (5) demonstrou uma produção ectópica de ACTH nos nódulos da PMAH com ação autócrina e parácrina desencadeando a cascata da esteroidogênese e culminando com a produção de cortisol, demonstrando que a doença é independente apenas do ACTH hipofisário. Desta forma, o termo *Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia* foi sugerido pelos autores, em contraposição ao mais utilizado anteriormente, *ACTH-Independent Macronodular Adrenal Hyperplasia* (AIMAH). Entretanto, considerando também que a doença pode se apresentar de forma assíncronica, ou seja, com

nódulos unilaterais, foi sugerido o nome *Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia* (PMAH), que abrange todos os casos (6).

1.2 Hiperplasia Macronodular Adrenal Primária

Descrita em 1964 por Kirschner *et al.* (7), a PMAH é uma doença caracterizada pela presença de macronódulos funcionantes geralmente acometendo ambas as glândulas suprarrenais e por produção aumentada, autônoma e sustentada por cortisol. Até recentemente, acreditava-se que a doença se expressava principalmente sob a forma de SC clássica, principalmente em indivíduos acima de 50 anos, porém se tem especulado que a SC subclínica seja a forma mais frequente de manifestação, sendo subdiagnosticada nos indivíduos mais jovens (8). Diferentemente do que se observa em outras causas da SC, não parece existir predominância de acometimento com relação ao gênero, distribuindo-se igualmente entre o sexo feminino e o masculino (9).

1.2.1 Aspectos laboratoriais

Laboratorialmente, a SC decorrente da PMAH apresenta principalmente a ausência de supressão do cortisol após administração de dexametasona (1 mg vo *overnight*), ACTH plasmático no limite inferior do método ou mesmo indetectável (<10 pg/mL) (8, 9). O cortisol urinário de 24 h e o cortisol salivar às 24h estão alterados em torno de 20 % dos pacientes (6).

1.2.2. Aspectos anatomopatológicos

Na grande maioria dos casos a macroscopia é representada pela formação de múltiplos nódulos bilaterais de coloração amarelada devido à alta concentração lipídica, e dimensões variáveis, chegando a atingir vários centímetros (Figura 1). Em comparação a adrenais normais, cujo peso somado de ambas as glândulas varia entre 8 a 12 gramas, as adrenais na PMAH podem

apresentar peso combinado da ordem de 200 gramas. Tem sido observado também que o desenvolvimento nodular pode ser assincrônico, dificultando o diagnóstico destes pacientes.

Figura 1 – PMAH macroscopia: adrenal hiperplasiada com peso total de 96g e presença de 4 macronódulos de coloração amarelada, com tamanho variado.

O exame microscópico revela a presença de nódulos hiperplásicos compostos por células corticais de aspecto heterogêneo, constituídos por células grandes com citoplasma claro e por ilhas de células pequenas com citoplasma compacto (9) (Figura 2). Não é observada atipia nuclear ou necrose e a atividade mitótica geralmente é escassa. Outros aspectos interessantes observados nessa entidade incluem os focos de metaplasia lipomatosa/mielolipomatosa, arranjo pseudoglandular com mucina-símile no lúmen, e extrusão/infiltração da cápsula e tecido adiposo adjacente.

Figura 2 – Foto de lâmina de HE (X100) de paciente com PMAH demonstrando presença de células grandes do córtex suprarrenal com citoplasma claro (rico em gordura), e células pequenas com citoplasma compacto, formando estruturas do tipo cordão pobre em gordura),

caracterizando ilhas de estruturas semelhantes, escassez de figuras mitóticas e ausência de necrose.

1.2.3 Aspectos moleculares

O processo fisiopatológico que culminaria com a PMAH, bem como as eventuais alterações genéticas predisponentes, ainda não foi totalmente elucidado. Uma das principais hipóteses aventadas para o desenvolvimento da doença envolve a participação de receptores hormonais aberrantes ectópicos ou eutópicos do córtex suprarrenal que inapropriadamente ou ilicitamente estimulariam a esteroidogênese e a hiperplasia nodular da glândula. Embora alguns autores defendam a hipótese de que a expressão destes receptores seria um evento inicial e essencial na patogênese da PMAH (10), outros argumentam que a presença dos receptores aberrantes seria provavelmente um epi-fenômeno decorrente da proliferação e desdiferenciação celular (11). Recentemente, foram descritas mutações germinativas inativadoras do *ARMC5*, um gene supressor de tumor (6, 12, 13). Os nódulos adrenais apresentaram diferentes mutações somáticas entre si num mesmo indivíduo e perda da heterozigosidade do alelo normal.

Além disso, Beuschlein *et al.* (2014) (14) descreveram que duplicações germinativas do gene que codifica a proteína kinase A dependente de AMPc (*PRKACA*) resultam em hiperplasia bilateral das adrenais, enquanto que mutações somáticas no *PRKACA* resultam em adenomas unilaterais produtores de cortisol.

A forma esporádica de apresentação da PMAH parece ser a mais frequente. No entanto, se desconhece a real prevalência da forma familiar, pois habitualmente não é realizada uma avaliação dos parentes dos indivíduos portadores da doença (15). Suspeita-se que nas famílias com a forma herdada descritas na literatura, a PMAH apresente um padrão de transmissão autossômico dominante, com penetrância incompleta (6).

1.2.4 Aspectos radiológicos

Em relação aos aspectos de imagem radiológica na PMAH, a tomografia computadorizada (TC) geralmente evidencia nódulos suprarrenais bilaterais com unidades Hounsfield (UH) consideravelmente elevadas (>20) (Figura 3.b). O aumento difuso das glândulas suprarrenais sem a distinção dos nódulos, bem como a assimetria e o assincronismo entre as glândulas suprarrenais também têm sido descritos, embora se desconheça a real prevalência destes achados radiológicos. Já na ressonância magnética (RM), nas sequências ponderadas, as glândulas suprarrenais hiperplasiadas são isointensas em relação aos músculos em T1 e hiperintensas com relação ao fígado em T2 (Figura 3.a), diferentemente da hiperplasia macronodular dependente de ACTH, que se mostra isointensa com em relação ao fígado em T2 (16, 17).

Figura 3 – Paciente de 50 anos com PMAH: **a.** RM em T1 demonstrando intensidade homogênea nas glândulas hiperplasiadas. **b.** TC com contraste demonstrando múltiplos nódulos e hiperplasia em ambas as adrenais (setas) (16).

1.2.5 Tomografia por emissão de pósitrons com 2-[18F]fluor-2-deoxi-D-glicose acoplada à tomografia computadorizada (^{18}F -FDG-PET/CT)

A tomografia por emissão de pósitrons (PET) acoplada à TC é o exame de imagem mais utilizado na oncologia para detectar aumento no metabolismo da glicose em tumores malignos de diferentes linhagens celulares. No entanto, alguns tumores demonstram baixa captação de

glicose, especialmente aqueles bem diferenciados e que apresentam crescimento lento, como tumores neuroendócrinos e carcinomas da tireoide (18, 19).

O marcador mais utilizado no PET é o análogo da glicose, 2-[18F]fluor-2-deoxi-D-glicose (^{18}F -FDG), e sua captação nos tecidos é medida através do *maximum standard uptake value* (SUVmáx), a partir do qual é interpretado o exame (Figura 4).

Figura 4 – PET/CT de paciente com PMAH: adrenais com dimensões aumentadas, apresentando múltiplos nódulos, com captação de ^{18}F -FDG de padrão discretamente heterogêneo e grau discreto, com maior grau de concentração relativa à esquerda (SUVmáx= 3.4).

A ^{18}F -FDG, assim como a glicose, é transportada ativamente para o interior das células por transportadores de glicose (GLUTs) e depois fosforilada pelas hexoquinases (HKs) no citoplasma em uma taxa inversamente proporcional ao consumo de glicose, dando origem à 2-[18F] flúor-2-deoxi-D-glicose 6-fosfato (FDG 6-P), análoga da glicose 6-fosfato (G 6-P). A ^{18}F -FDG é aprisionada metabolicamente no meio intracelular imediatamente após a fosforilação, pois é um substrato pobre para a glicose 6-fosfato-isomerase (G 6-Pase), a qual realizaria o processo inverso da HK (Figura 5). Desta forma, o acúmulo de ^{18}F -FDG no interior das células forma a base do uso deste radiofármaco como um marcador funcional de glicose para interpretações quantitativas de PET scans (20).

Figura 5 – Demonstração do papel dos GLUTs e HKs no metabolismo da glicose/ ^{18}F -FDG: Os GLUTs realizam o transporte da glicose/FDG para o meio intracelular, onde as hexokinases catalisam a fosforilação da glicose/FDG, dando origem à Glicose-6-Fosfato, que pode sofrer ação da G-6-Fosfato-isomerase para ser transportada ao meio extracelular, e à FDG-6-Fosfato, que não é substrato para a G-6-Fosfato-isomerase, ficando retida no interior da célula, caracterizando a captação de ^{18}F -FDG no PET scan.

Em 2006, Metser *et al.* (21), realizaram um estudo com o objetivo de diferenciar lesões adrenais benignas e malignas a partir do padrão quantitativo da captação de ^{18}F -FDG no PET/CT. Foi observado que não houve diferença significativa na captação entre adenomas ricos e pobres em lipídios. Um ponto de corte de $\text{SUV} = 3.1$ (Figura 6) foi estimado para diferenciar adenomas adrenocorticais (AAC) de carcinomas adrenocorticais (CAC) com uma sensibilidade de 98.5%, especificidade de 92%, valor preditivo positivo de 89.3%, e valor preditivo negativo de 98.9%. Observou-se também que, associando a interpretação da TC aos critérios sugestivos de adenoma no PET ($\text{SUV} \leq 3.1$ com qualquer HU; $\text{SUV} > 3.1$ e lesões com $\text{UH} < 10$), a sensibilidade aumentou para 100%, a especificidade para 98%, o valor preditivo positivo para 97% e o valor preditivo negativo para 100%. Por outro lado, em 2008, foi proposta a utilização da razão entre $\text{SUV}_{\text{máx}}$ da lesão e $\text{SUV}_{\text{máx}}$ do fígado para a diferenciação das lesões adrenais,

com um ponto de corte no valor de 1.8 para aumentar a sensibilidade e a especificidade, atingido até 100% de ambas (22), e em 2009, de 1,45 (23).

Figura 6 – SUV de AACs (B) e CACs (M), com o ponto de corte sugerido (SUV = 3.1) e o maior SUV (6.5) de uma lesão benigna observada no estudo (21).

A observação da imagem com atividade metabólica do tecido tumoral fornece informações mais específicas sobre a extensão da doença do que imagens apenas morfológicas ou anatômicas. As informações adicionais sobre o metabolismo das células neoplásicas podem ser usadas para inferir maior agressividade do seu comportamento auxiliando o clínico no planejamento do tratamento da doença (20). A via bioquímica e o mecanismo pelo qual ocorre o acúmulo de ^{18}F -FDG já foram estudados extensivamente *in vitro* e *in vivo*. O transporte da glicose através da membrana celular por GLUTs e a fosforilação intracelular por HKs foram identificados como vitais para o subsequente acúmulo. A captação de ^{18}F -FDG em tecidos, no entanto, não é específica para tumores e já foi descrita em tecido inflamatório e não neoplásico, porém pouco se sabe sobre o mecanismo celular de captação (19, 24, 25).

Recentemente foram descritos três pacientes não relacionados do sexo feminino com PMAH apresentando captação aumentada de ^{18}F -FDG ($\text{SUV}_{\text{máx}} > 3,1$; Figura 7) (26).

Entretanto, ainda não foi esclarecido o mecanismo pelo qual a PMAH apresentaria uma captação intensa de ^{18}F -FDG no PET/CT.

Figura 7 - Imagem transaxial de ^{18}F -FDG-PET/CT em três pacientes com PMAH, demonstrando massas adrenais bilaterais com captação aumentada de ^{18}F -FDG em comparação com o fígado. O SUVmáx está elevado em todas as massas adrenais, alcançando níveis normalmente encontrados em tumores malignos e metástases (26).

1.3. Proteínas transportadoras de glicose (GLUTs)

A glicose é uma molécula polar, insolúvel na membrana plasmática, e o seu transporte é realizado através de difusão facilitada, portanto a favor do seu gradiente de concentração, e dependente de proteínas transportadoras de glicose (GLUTs) presentes na superfície das células. Os GLUTs existem em duas conformações: com o sítio de ligação de glicose exposto para superfície externa da membrana plasmática e com o sítio de ligação exposto para superfície interna. Estes transportadores, através de mudanças na sua conformação (ativando e inativando seus sítios de ligação extracelular e citoplasmático), são capazes de realizar o fluxo bidirecional de glicose e, de fato, é o gradiente do substrato que determina a direção intra ou extracelular do

transporte. A família dos GLUTs é classificada em três grupos: classes I, na qual se encontra o GLUT1, classe II e classe III (27).

O GLUT1 é codificado pelo gene *SCL2A1*, localizado no cromossomo 1p35-31.3, e é composto por 492 resíduos de aminoácidos. O principal substrato para o transporte mediado pelo GLUT1 é a glicose, porém também pode transportar manose e galactose. É expresso em muitos tipos de células, principalmente em eritrócitos, no cérebro e na barreira hematopoiética (28). A proteína codificada pelo gene *SLC2A1* já foi observada em imunomarcações de localização citoplasmática, onde o GLUT1 fica armazenado em vesículas, e localização membranosa (29), no entanto, sua função biológica é provavelmente relacionada à localização membranosa. Situações de hipóxia e isquemia podem induzir a translocação de GLUTs existentes em vesículas do citoplasma para a membrana e, diante de exposição prolongada à hipóxia, pode ocorrer aumento na síntese de RNAm de GLUT1 (30).

Com base na sequência de aminoácidos foi proposto um modelo estrutural dos GLUTs na membrana celular. Existem 12 domínios hidrofóbicos α -helicoidais, sugerindo que a proteína atravessa 12 vezes a membrana, com os domínios NH₂- e COOH- localizados no citoplasma das células (Figura 8) (31, 32). Há um alto grau de homologia entre as hélices transmembrana dos GLUTs, enquanto que as terminações NH₂- e COOH- são variáveis. Os membros das classes I e II possuem um grande anel extracelular entre os domínios transmembrana 1 e 2, que contém um único sítio de N-glicosilação. A glicosilação do GLUT1 neste sítio tem se mostrado como um fator de aumento na eficiência do transporte da glicose (33, 34).

Figura 8– Representação da estrutura dos GLUTs na membrana celular. Os domínios transmembrana estão enumerados de 1 a 12 (32).

Em 2009, Fenske *et al.* (35), realizaram um estudo sobre a expressão proteica de GLUT1, através de técnicas de imunoistoquímica, em pacientes com carcinoma adrenocortical, onde 33.5% das amostras apresentaram marcação do GLUT1, dos quais 10.6%, apresentaram intensa imunomarcação. Na análise do seguimento dos pacientes, foi observada uma forte correlação entre a expressão do GLUT 1 e a sobrevida, demonstrando um forte potencial de associação de prognóstico com a expressão proteica de GLUT1 em pacientes com carcinoma adrenocortical. Em pacientes sem expressão de GLUT1, a média de sobrevida livre de doença foi de 41.9 meses,

em comparação com a média de 22.2 meses em pacientes que apresentaram maior expressão do GLUT 1.

1.4. HEXOKINASES

Quatro isoformas de HKs foram descritas, HK 1, 2, 3 e 4, sendo esta última também denominada glicoquinase. As isoformas 1-3 são moléculas que surgiram da duplicação e fusão de um gene *HK* ancestral de 50 kDa. Estas isoenzimas apresentam repetições de sequências internas, e os domínios N- e C- terminal apresentam sequências de extensa similaridade entre si e com outros membros da família das hexoquinases (36, 37). O gene *HK1* está localizado no cromossomo 10q22 (38), *HK2* no cromossomo 2p13.1 (39), enquanto que o *HK3* está no cromossomo 5q35.2 (40). As HKs 1-3 apresentam massa molecular de 100 kDa, sendo que a HK 2 apresenta ambos os domínios N- e C-terminal cataliticamente ativos, enquanto que as HKs 1 e 3 apresentam apenas o domínio C-terminal ativo (41-43). As isoformas 1 e 2 estão localizadas no citoplasma celular, mais precisamente na membrana mitocondrial, enquanto que a HK 3 encontra-se em um compartimento perinuclear, no entanto, o motivo pelo qual isto ocorre ainda não foi esclarecido (44).

A primeira reação no metabolismo da glicose é a sua fosforilação ($\text{Glicose} + \text{Mg.ATP} \rightarrow \text{G 6-P} + \text{Mg.ADP}$), catalisada pelas HKs, resultando na formação da G 6-P. As vias metabólicas subsequentes à fosforilação variam de acordo com o tipo celular e as diferentes condições fisiológicas (Figura 9), como a via da glicólise para geração de energia (ATP); via da pentose fosfato, para geração de NADPH e outros precursores de reações anabólicas; ou via de conversão em glicogênio, reserva de carboidratos. A expressão seletiva das isoformas, diferindo nas propriedades catalíticas e regulatórias, assim como sua localização, podem ser fatores importantes para determinar qual a via a ser seguida do metabolismo glicolítico (44).

Figura 9 – A fosforilação da glicose, catalisada pela HK, é o passo inicial de várias vias do metabolismo da glicose (44).

A G 6-P é considerada um fator regulatório em potencial, por ser um inibidor alostérico da HK. Quando a utilização da G 6-P pela via glicolítica diminui, sua concentração aumenta e a HK fica momentaneamente inibida, restringindo a fosforilação da glicose e, portanto, ajustando a captação do açúcar pelo tecido à sua utilização (32). O transporte transmembrana mediado por transportadores específicos é considerado um dos mecanismos mais importantes para aumentar o fluxo de glicose para o interior das células. Além disso, concentrações elevadas de HK aliadas a concentrações baixas de G 6-P demonstraram acelerar a fosforilação, o que resulta em um consumo aumentado de glicose (24). As três isoformas de HK são inibidas pela G 6-P, porém a inibição de HK 1 é antagonizada pelo fosfato inorgânico (Pi), presente no citoplasma (45), enquanto que nas HKs 2 e 3 o Pi causa aumento na inibição (37).

A HK 1 é expressa particularmente no cérebro, em tecidos conhecidos por depender do metabolismo glicolítico da glicose para suportar altas taxas de gasto de energia (46), e está associada a funções primariamente catalíticas, levando a glicose ao metabolismo glicolítico para geração de ATP. Já a expressão da HK 2 é mais comum em tecidos dependentes de insulina, como músculo esquelético e tecido adiposo, sugerindo que deve estar associada à via anabólica

do metabolismo da glicose, provendo G 6-P para síntese de glicogênio durante a recuperação da contração muscular (37). Já a HK 3, por ser similar à HK 2 diante da G 6-P e Pi, deve estar associada também às vias de anabolismo, porém isto ainda não foi esclarecido (44).

A fosforilação oxidativa é o processo no qual é formado ATP, como resultado de uma série de transferência de elétrons de NADH ou FADH₂, provenientes da glicólise, reduzindo O₂ a H₂O. Este processo, que ocorre na mitocôndria, é a principal fonte de energia nos organismos aeróbicos. Ao contrário de células normais, que dependem primariamente da fosforilação oxidativa mitocondrial para gerar a energia necessária para os processos celulares, a maior parte das células malignas utilizam a glicólise aeróbica. Em 1924, Warburg O. descreveu pela primeira vez que células cancerígenas metabolizam glicose em ácido láctico, mesmo na presença de altas concentrações de oxigênio, fenômeno denominado “*Efeito Warburg*” (47). Além da geração de energia, a glicólise disponibiliza carbonos que atuam como precursores para a síntese de ácidos nucléicos, fosfolipídios e colesterol, moléculas importantes para a proliferação celular e síntese de nucleotídeos (48). Geralmente, os tecidos normais transformam a glicose em piruvato (glicólise), utilizando ATP produzido previamente pela fosforilação oxidativa na mitocôndria. No entanto, células malignas utilizam a glicose para produzir ácido láctico, mesmo na presença de oxigênio (49). Um estudo realizado por Bustamante *et al.* (1977) (50) demonstrou que a HK presente em tumores está localizada na membrana externa da mitocôndria, permitindo que esta escape de uma inibição em potencial da G 6-P, e permitindo que esta tenha acesso ao ATP recém produzido (Figura 10).

Segundo Nakashima *et al.* (1986) (51), a HK2 está estrategicamente localizada em uma proteína de canal ânion-dependente (porina) na membrana mitocondrial, tem acesso preferencial ao ATP gerado pela mitocôndria e “proteção” contra a inibição pela G 6-P, permitindo altas taxas de glicólise e biossíntese para a proliferação das células tumorais. Por estes motivos, esta isoforma é predominantemente hiperexpressa na maioria dos tipos de câncer, aumentando sua

capacidade de metabolizar a glicose, um fenótipo utilizado clinicamente para detectar células tumorais através de PET (52).

Figura 10 – Representação da via metabólica da glicose em célula tumoral altamente glicolítica: a glicose é transportada para o citoplasma por transportadores de glicose e depois é fosforilada pela HK2 acoplada à membrana da mitocôndria. A G 6-P resultante pode seguir por dois caminhos: via pentose-fosfato para biossíntese ou via da glicólise para produção de ácido pirúvico, que em grande parte é transformado em ácido láctico, que por sua vez é transportado para o exterior da célula por transportadores de lactato, caracterizando o “Efeito Warburg” (49).

Ainda não foram descritas na literatura associações entre doenças adrenocorticais e as expressões gênica e proteica das HKs.

1.5 Expressão de GLUT1, HK1, HK2 e HK3 em outras doenças

Brown & Wahl (1993) (53) observaram imunomarcagem positiva de GLUT1 na membrana celular e citoplasma em pacientes com câncer de mama primário e metastático. Este mesmo grupo realizou um estudo onde foi encontrada forte correlação entre a captação de ^{18}F -FDG e a hiperexpressão proteica de GLUT1 na mesma doença (53, 54). Kurata *et al.* (1999) (55) observaram que a expressão de GLUT1 em tumores pulmonares primários é maior do que em tecido pulmonar normal. Comparando a expressão proteica de todos os GLUTs em câncer de pulmão não pequenas células, foi observada uma expressão de GLUT1 significativamente maior do que a dos outros GLUTs, bem como uma associação entre a hiperexpressão de GLUT1 e a captação aumentada de ^{18}F -FDG nesta mesma doença (56, 57).

Gu *et al.* (2006) (58) observaram uma correlação entre a hiperexpressão de GLUT1, tamanho do tumor e profundidade da invasão tumoral com a captação de ^{18}F -FDG em pacientes com câncer colorretal. Neste estudo foi observado um acúmulo de FDG nas partes intermediária e central das lesões, paralelamente com uma maior expressão de GLUT1. Em situações de expansão de massa tumoral, que geralmente é caracterizada por disponibilidade limitada de oxigênio e alto consumo de glicose, fatores induzidos por hipóxia são ativados para que as células tumorais sobrevivam (59). Baseando-se nestes resultados, foi formulada a seguinte hipótese: à medida que o tumor cresce, invadindo os tecidos, as áreas intermediárias e centrais do tumor, que contêm mais células tumorais viáveis, passam a ficar hipóxicas. Esta condição estimula a expressão proteica de GLUT1 e induz a captação de FDG.

Em 2004, Yen *et al.* (60), realizaram duas medições de SUV (40 minutos e 3 horas após a injeção do radiofármaco) em pacientes com câncer cervical. Foi observada uma significativa hiperexpressão proteica de GLUT1, assim como uma forte correlação entre a expressão de GLUT1 e ambos os SUVs dos pacientes. Em tumores recorrentes ou persistentes, foi observada uma significativa associação entre o tamanho do tumor, a expressão de GLUT1 e o primeiro

SUV medido. Posteriormente, foram examinados pacientes com câncer colorretal utilizando PET. Dos 37 participantes do estudo, 35 apresentaram captação aumentada de ^{18}F -FDG, e os níveis de expressão de mRNA observados do *SLC2A1* e *HK2* nos tecidos cancerígenos foram significativamente mais altos que do na mucosa normal (61). Já Nakajo *et al.* (2012) (62) encontraram uma associação entre a captação aumentada de ^{18}F -FDG com a expressão aumentada do GLUT1 e HK2 em tumores epiteliais tímicos. Dos 11 tumores analisados no estudo, o SUV_{máx} e as expressões proteicas do GLUT1 e HK2 foram significativamente mais altos no grupo de alto risco em comparação ao grupo de baixo risco, sugerindo que o grau de captação da ^{18}F -FDG nestes tecidos está intimamente ligado à expressão destas proteínas no tumor.

Binderup *et al.* (2013) (63) conduziram um estudo importante comparando a expressão gênica de *SLC2A1*, *HK1* e *HK2* em tumores neuroendócrinos (TNEs) e carcinomas colorretais (CCRs), utilizando a captação de ^{18}F -FDG na PET. Foram observadas hiperexpressões do *SLC2A1* em 38% e 86%, do *HK1* em 41% e 71%, e do *HK2* em 50% e 64% em TNEs e CCRs, respectivamente. As expressões gênicas resultantes confirmaram uma atividade metabólica mais baixa nos TNEs em relação aos CCRs, concordando com a menor captação de ^{18}F -FDG demonstrada pelos TNEs, quando comparada aos CCRs. Ainda neste estudo foi encontrada correlação positiva entre o padrão de captação de ^{18}F -FDG e a expressão de *SLC2A1*.

1.6 Justificativa

Para melhor compreender os mecanismos pelo quais a captação de ^{18}F -FDG está aumentada nos pacientes com PMAH, doença adrenal benigna, é importante investigar se há correlação entre a expressão dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3*, e de suas respectivas proteínas com o SUV_{máx} na PMAH.

2. Objetivos

- 1) Analisar a expressão dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3* através de qRT-PCR, bem como de suas respectivas proteínas através de imunoistoquímica, em pacientes com PMAH que realizaram ^{18}F -FDG PET/CT para avaliar se há correlação entre as expressões e o SUV_{máx}.
- 2) Comparar as expressões gênicas e proteicas de *SLC2A1* e *HK2* entre as adrenais com PMAH, adenomas e carcinomas adrenocorticais.

3. Métodos

3.1. Considerações Éticas

Este projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e aprovado (Protocolo de Pesquisa CAPPesq n° 9955). Os pacientes foram selecionados do Ambulatório de Suprarrenal, com o diagnóstico clínico e histológico de PMAH, e estão em acompanhamento no Serviço de Endocrinologia e Metabologia do HCFMUSP.

3.2 Pacientes

Para o primeiro objetivo deste estudo foram selecionados 12 indivíduos diagnosticados com PMAH que realizaram ^{18}F -FDG PET/CT, utilizando como controle um *pool* de adrenais normais.

Para o segundo objetivo proposto neste trabalho foram analisados 12 pacientes com PMAH, 15 com AAC e 10 com CAC. O critério de Weiss foi utilizado para estabelecer o diagnóstico de CACs (Weiss ≥ 3) e AACs (Weiss < 3) (64).

3.3 ^{18}F -FDG PET/CT

Os exames foram realizados na Medicina Nuclear do Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo em São Paulo/SP, conforme protocolo descrito na literatura e adotado pelo hospital (65).

A preparação dos pacientes para o exame foi feita a partir de uma dieta pobre em carboidratos no dia anterior à realização do exame. No dia do exame, após um período de 6 horas de jejum, a glicemia dos pacientes foi avaliada e o exame realizado, caso o valor da glicose < 150 mg/dL. O radiotraçador ^{18}F -FDG foi administrado por via intravenosa, através da punção da veia antecubital, nas doses 0,15-0,2 mCi/kg, sendo que a dose menor foi utilizada nos pacientes com menos de 70 kg e a maior nos pacientes com o peso acima deste valor.

Primeiro, foi realizada a TC com cortes axiais de 3,8 mm de espessura e em seguida, os mesmos seguimentos foram avaliados pela PET. As imagens foram realizadas após 60 e 120 minutos da injeção do radiotraçador, e obtidas desde a base do crânio até o terço superior da coxa, utilizando-se um aparelho *GE Discovery ST PET/CT Hybrid Scanner (General Electric Healthcare, Waukesha, WI, EUA)*. A fusão das imagens da TC e PET foram analisadas, utilizando-se o algoritmo de maximização de expectativa do subconjunto organizado (algoritmo de OSEM). Foram calculados os valores de padrão de captação máxima (SUV_{máx}) das suprarrenais.

As imagens foram interpretadas por médicos especialistas em medicina nuclear utilizando os dados clínicos disponíveis. Para a análise semiquantitativa da captação do ¹⁸F-FDG as regiões de interesse (ROI) foram definidas manualmente em tomografias transaxiais. As ROI foram colocadas sobre as lesões utilizando um método semiautomático que abrangem todos os pixels que apresentavam captação em cada corte. O SUV_{máx} foi utilizado para a análise quantitativa da captação de ¹⁸F-FDG das lesões:

$$\text{SUV} = \frac{C \text{ (kBq/mL)}}{\text{DI (kBq)/ peso corporal (kg)}}$$

Onde C representa a concentração de atividade do tecido mensurado pelo PET e DI representa a dose injetada.

3.4 RT-PCR quantitativa em tempo real

3.4.1 Extração de RNA

O RNA foi extraído a partir de amostras de tecido adrenal congeladas em nitrogênio líquido. Inicialmente as amostras foram pulverizadas no aparelho *Mikro-Dismembrator U (B. Braun Biotech International, Melsungen, Hesse, Germany)*. Foi utilizada uma solução de fenol e isotiocianato de guanidina denominada *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*. Ao tecido já pulverizado foi adicionado 1 mL de *TRIzol® Reagent (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)*. Após homogeneização por pipetagem, a mistura foi

transferida para um microtubo estéril de 1,5 mL e incubada em temperatura ambiente por um período de 5 minutos. Uma vez concluída a incubação, foram adicionados 200 µL de clorofórmio à solução, a qual, foi, em seguida, agitada vigorosamente em *Vortex Genie® 2T* (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*) por 15 segundos, depois foi novamente incubada em temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugada em 12000 RPM por 15 minutos a 4°C.

Posteriormente, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo microtubo estéril de 1,5 mL e o RNA precipitado com 500 µL de álcool isopropílico. A mistura foi deixada em repouso durante 10 minutos em temperatura ambiente e centrifugada nas mesmas condições citadas anteriormente, no entanto, por 10 minutos. O sobrenadante foi removido e ao *pellet* de RNA foi acrescido 1 mL de etanol 75% para lavagem. Após nova homogeneização em *Vortex Genie® 2T* (*Scientific Industries, Inc., Bohemia, NY, USA*) e centrifugação a 10000 RPM a 4°C por 5 minutos, o *pellet* de RNA foi solubilizado em água livre de RNAses e incubado a 65°C durante 10 minutos.

A concentração de RNA de cada amostra foi determinada por espectrofotômetro *NanoDrop® ND-1000* (*NanoDrop Technologies (Wilmington, DE, USA)*) pela absorbância das preparações a 260 nanômetros (nm), utilizando como valor padrão uma unidade de densidade óptica que equivale a 50 µg/mL de RNA. Além disso, o grau de pureza foi avaliado pela relação 260/280 nm, que deve ser superior a 1,8 para ácidos nucleicos e a integridade do RNA, por eletroforese em gel de agarose 1,0%, a fim de analisar a presença das bandas (18S e 28S ribossomais; Figura 11). As amostras foram conservadas em freezer -80°C até o momento do uso.

Figura 11– Eletroforese de gel de agarose a 1% representativa dos RNAs extraídos de tecidos de adrenais, demonstrando a integridade do material analisado. As setas indicam as subunidades 18S e 28S dos RNAs ribossomais.

3.4.2 Síntese de cDNA (DNA complementar)

A síntese de cDNA foi realizada a partir concentração de RNA total de cada amostra, calculada na etapa anterior, com um volume final de 25 μL (RNA + H_2O). As reações foram executadas com a utilização do estojo comercial *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), conforme recomendado pelo fabricante e demonstrado abaixo:

10X <i>Random Primers</i>	5,0 μL
dNTPs Mix	2,0 μL
RT <i>Buffer</i>	5,0 μL
MultiScribe® Reverse Transcriptase	2, 5 μL
<u>H_2O</u>	<u>10, 5 μL</u>
Volume final (Kit + RNA + H_2O)	50 μL

A mistura elaborada foi homogeneizada por pipetagem em um tubo estéril e incubada no termociclador nas seguintes condições: 10 minutos a 25°C, 120 minutos a 37°C e, finalmente, por 5 minutos a 85°C.

3.4.3 PCR em tempo real

As reações foram preparadas a partir de cDNA com utilização dos componentes comerciais *TaqMan® Gene Expression Assay* e *TaqMan® Gene Expression Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) e adaptadas a partir de recomendações do fabricante:

cDNA (100 ng/μL)	1,0 μL
<i>TaqMan® Gene Expression Master Mix</i>	12,5 μL
<i>TaqMan® Gene Expression Assay</i>	1,25 μL
<u>H₂O</u>	<u>10,0 μL</u>
Volume final para cada ensaio	25 μL

As condições de termociclagem foram 95°C/10 minutos, seguido de 40 ciclos de 95°C/15 segundos e 60°C/ 10 minutos. A amplificação dos genes alvo, *SLC2A1* (Hs00892679_g1), *HK1*(Hs 00175976_m1), *HK2* (Hs00606086_m1) e *HK3* (Hs 01092839_m1), foi normalizada pelas condições de amplificação de dois genes endógenos, *ACTB* (Hs99999903_m1) e *GUS* (Hs99999908_m1), previamente padronizados no laboratório por sua estabilidade de expressão de RNAm.

Como calibrador, foi utilizado um *pool* de amostras de tecidos de adrenais normais (*Clontech, Palo Alto, CA, USA*). A análise dos dados de quantificação relativa foi realizada a partir dos valores de CT (“*threshold cycle*”), isto é, os valores quantitativos foram obtidos pelos valores de CT e o cálculo matemático $2^{-2\Delta\Delta CT}$ (66) foi utilizado para determinar a expressão gênica, onde ΔCT representa a diferença de expressão entre o gene alvo e a média geométrica de dois genes endógenos e o $\Delta\Delta CT$ corresponde à diferença entre o ΔCT de uma amostra de paciente e o ΔCT do calibrador. A hiperexpressão, isto é, a expressão mais elevada do que o *pool* de adrenais normais, de um gene foi definida por um valor de expressão maior ou igual a 2, já a hipoexpressão, por um valor de expressão menor ou igual a 0.5.

3.5 Imunoistoquímica

O estudo da expressão proteica dos genes alvo foi realizado a partir da técnica de imunoistoquímica, com anticorpos e diluições específicas para cada proteína analisada (Tabela 2):

Tabela 2 - Anticorpos utilizados para o estudo proteico, e suas respectivas diluições e controles positivos utilizados.

Anticorpo	Proteína marcada	Clone/espécie	Fonte	Diluição	Controle positivo
Anti-GLUT1	Glucose transporter 1, localização membranosa	Monoclonal mouse SPM498	ABCam	1:400	Epiderme
Anti-HK1	Hexokinase 1, localização citoplasmática	Monoclonal mouse 3 ^a 10	ABCam	1:1600	Tecido renal
Anti-HK2	Hexokinase 2, localização citoplasmática	Monoclonal mouse 3D3	ABCam	1:1000	Músculo esquelético
Anti-HK3	Hexokinase 3, localização citoplasmática	Monoclonal Mouse 4F5	ABCam	1:1600	Tecido de baço humano

Foram realizadas reações de padronização para determinar as melhores diluições para cada anticorpo, com o objetivo de otimizar as reações. As principais etapas para realização do estudo de expressão proteica estão descritas a seguir:

3.5.1 Desparafinização

Foram montados conjuntos de lâminas silanizadas contendo os cortes de tecido de aproximadamente 3 µm de espessura em suporte adequado. As lâminas foram colocadas em xilol quente, em estufa entre 60° C – 65° C, durante 15 a 20 minutos e passadas rapidamente em 3 banhos de xilol frio.

3.5.2 Hidratação

As lâminas foram colocadas em dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95% e um banho de álcool 70%. Depois foram lavadas em água corrente e, em seguida, água ultra pura.

3.5.3 Digestão ou recuperação antigênica

A digestão ou recuperação dos antígenos foi feita por alta temperatura, onde são colocadas as lâminas em solução de citrato 10 mM (pH 6.0) na panela de pressão (Pascal) por 1 minuto a 125°C.

3.5.4 Bloqueio da peroxidase endógena:

As lâminas foram banhadas em água oxigenada de 10 volumes (3%), por quatro vezes de 5 minutos, em seguida, lavadas em água corrente e por último, um banho de água ultra pura (três vezes com PBS ou TBS, por 3 minutos).

3.5.5 Bloqueio de IGg inespecíficas

Foram realizados banhos de caseína 2,5% por 5 minutos, para bloqueio de reações inespecíficas.

3.5.6 Incubação com os anticorpos

Os anticorpos primários foram diluídos em BSA, previamente titulado: GLUT1 (AB40084, *Abcam Inc. Cambridge MA*, diluição 1:400), HK1 (AB104835, *Abcam Inc. Cambridge MA*, diluição 1:1600) HK2 (AB104836, *Abcam Inc. Cambridge MA*, diluição 1:1000) e HK3 (AB115751, *Abcam Inc. Cambridge MA*, diluição 1:1600). Foram secadas as lâminas ao redor dos cortes e colocadas em câmara úmida. Os anticorpos diluídos foram pipetados sobre os cortes, utilizando-se uma micropipeta. Em seguida, as lâminas foram novamente encubadas em câmara úmida em geladeira *overnight* (18 – 20 horas). Posteriormente, foram feitas três lavagens com PBS ou TBS por 3 minutos e incubadas as lâminas em câmara úmida com polímero Novolink Max Polymer (*Novocastra Leica Biosystem Newcaslte Ltd, Newcastle, UK*, RE7280-K), deixando 30 segundos a 37°C cada etapa (Pós-primário e Polímero). Foram feitas novamente três lavagens com PBS ou TBS por 3 minutos, colocadas as lâminas em solução de cromógeno (70 mg de DAB p/ 100 ml de tris-HCL c/ 30 microlitros de Água Oxigenada 30 V), esperada a revelação por cinco minutos. Foram lavadas as lâminas em água corrente por 10 minutos e

contra coradas em Hematoxilina de Harris, por 1 minuto e lavadas novamente em água corrente por 5 minutos.

3.5.7 Montagem das lâminas

As lâminas foram posicionadas em um suporte para desidratar em banho de álcool 70%, por aproximadamente 1 minuto, depois passaram por um banho de álcool 95%, por 1 minuto, três banhos de álcool absoluto, por aproximadamente 1 minuto cada banho. Em seguida, foram diafanizadas em três banhos de xilol, por aproximadamente 1 minuto cada. Por último, as lâminas foram montadas com lamínula e resina sintética.

3.5.8 Interpretação dos resultados das reações imunoistoquímicas – análise de reatividade

Os resultados foram interpretados por um único patologista com experiência na análise em tecidos adrenais. No estudo da proteína GLUT1 foram interpretadas as marcações membranosas, enquanto que na HK1, HK2 e HK3 foram interpretadas as marcações citoplasmáticas. Para cada amostra comprovada como adequada para avaliação, foram analisadas:

- i) Positividade da reação: A extensão/quantidade da reação em uma determinada amostra tecidual foi caracterizada de forma semiquantitativa, como negativa ou positiva (de 1 a 100%, em intervalos de 25%), resultando em 5 categorias: **0** (ausência de imunomarcção); **1** (1-25% de células positivas); **2** (26-50% de células positivas); **3** (51-75% de células positivas); **4** (76-100% de células positivas);
- ii) Intensidade da reação: caracterizada em 3 categorias: **0** (ausência/negativo); **1** (fraca); **2** (forte/intensa);
- iii) Cálculo do *score* da reação: baseado em modelo de avaliação semiquantitativa, denominado *Histochemical score* (**HSCORE**) (67), O valor obtido desse *score* representa o produto da extensão da positividade (0-4) pela intensidade da reação (0-2) sendo que, neste estudo, pode variar de **0** (ausência de reatividade/expressão) até **8** (maior reatividade).

- iv) Dentro dos HSCORE calculados, foram feitas as seguintes categorias de marcação:
0 (negativo); **1-2** (fraca); **3-4** (intermediária); **5-8** (forte).

Para este estudo, apenas as marcações para GLUT1 e HK2 foram consideradas de qualidade suficiente para análise. Com relação à análise da expressão proteica do GLUT1, foram considerados positivos apenas os casos com imunomarcação membranosa, associada ou não à citoplasmática, enquanto que na HK2 foi analisada a expressão proteica citoplasmática.

3.6 Análise estatística

Os dados foram compilados em planilhas de cálculos e analisados a partir do programa *Bioestat2007, versão 5.3* (Instituto Mamirauá, Tefé, Brasil). Os dados foram expressos em média, mediana, percentis 25 e 75 e valores mínimos e máximos. As medianas das variáveis contínuas foram comparadas pelo teste não paramétrico *Kruskal-Wallis* seguida pelo ajuste de Dunn. As correlações deste estudo foram analisadas pelo Coeficiente de Correlação de Pearson. Significância estatística foi considerada quando $p < 0.05$.

4. Resultados

4.1 Padrão de captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH

Todos os pacientes com PMAH apresentaram captação aumentada de ^{18}F -FDG na PET/CT. O padrão de captação SUVmax observado entre os pacientes com PMAH variou de 3.3 a 8.9 (Figura 12).

Figura 12 – ^{18}F -FDG PET/CT de uma paciente deste estudo com PMAH: adrenal esquerda multinodular, cujo maior nódulo media 14 cm, com respectivo SUVmáx: 8,9 e nódulo único na adrenal direita (SUVmax 7,1).

4.2 Correlação entre a captação de ^{18}F -FDG e o tamanho do maior nódulo nos pacientes com PMAH

O tamanho do maior nódulo dos pacientes com PMAH deste estudo variou de 3.5 a 15 cm em seu maior eixo. A Figura 13 demonstra a forte correlação encontrada entre o tamanho do nódulo em pacientes com PMAH através da correlação de Pearson ($p < 0.05$), onde o SUVmáx

mais elevado foi de 8.9, relativo a um nódulo cujo maior eixo media 14 cm e o SUVmáx mais baixo foi de 3.4, relativo a um nódulo cujo maior eixo media 5.7 cm.

Figura 13 - Relação entre a captação de ^{18}F -FDG (SUVmáx) e o tamanho do maior nódulo em pacientes com PMAH.

4.3 Correlação entre a expressão gênica do *SLC2A1*, *HK1*, *HK2*, *HK3* e a captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH

O padrão de captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH não apresentou correlação entre o SUVmáx e a expressão de *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3* ($p > 0.05$; Figuras 14, 15, 16 e 17).

Figura 14– Correlação entre a expressão gênica do *SLC2A1* e o SUVmáx ($r = -0.0107$; $p = 0.9751$).

Figura 15 - Correlação entre a expressão gênica do *HK1* e o SUVmáx ($r = 0.3430$; $p = 0.3017$).

Figura 16 - Correlação entre a expressão gênica do *HK2* e o SUVmáx ($r = -0.1275$; $p = 0.7087$).

Figura 17- Correlação entre a expressão gênica do *HK3* e o SUVmáx ($r = 0.2496$; $p = 0.4591$).

4.4 Correlação entre a expressão proteica de GLUT1 e HK2 e a captação de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH

O HSCORE calculado para cada proteína dos pacientes analisados está inserido na Tabela

3.

Tabela 3 – Análise da imunomarcção proteica de GLUT1 de localização membranosa (M) e de HK2 nos pacientes com PMAH.

Grupo	Tamanho do maior nódulo (cm)	SUVmáx	GLUT1			HK2		
			Intensidade M	Células marcadas (%) M	HSCORE M	Intensidade	Células marcadas (%)	HSCORE
PMAH1	3,5	3,3	1	1	1	1	3	2
PMAH2	3,5	3,5	1	1	1	1	2	2
PMAH3	4,3	5,1	1	1	1	1	1	1
PMAH4	4,5	4,2	0	0	0	1	2	2
PMAH5	5,7	3,4	0	0	0	0	0	0
PMAH6	7,0	5,2	0	0	0	0	0	0
PMAH7	7,0	5,2	2	2	4	1	4	4
PMAH8	7,5	5,6	0	0	0	0	0	0
PMAH9	9,0	5,5	0	0	0	1	1	1
PMAH10	14,0	3,9	0	0	0	1	3	3
PMAH11	14,0	8,9	2	1	2	0	0	0
PMAH12	15,0	7,1	1	1	1	1	2	2

Não foi encontrada correlação significativa entre o SUVmáx e a expressão proteica de GLUT1 e HK2 nos pacientes com PMAH ($p>0.05$; Figuras 18 e 19).

Figura 18 – Correlação entre a expressão proteica de GLUT1 (HSCORE) e o SUVmáx nos pacientes com PMAH ($r=0.3911$ e $p=0.2097$).

Figura 19 – Correlação entre a expressão proteica de HK2 (HSCORE) e o SUVmáx nos pacientes com PMAH ($r=0.0053$ e $p=0.9870$).

4.5 Comparação das expressões gênicas de *SLC2A1* e *HK2* entre pacientes com PMAH, CACs e AACs

Adicionalmente aos experimentos propostos inicialmente neste estudo, foi realizada uma comparação entre as expressões gênica e proteica de GLUT1 e HK2 entre pacientes com PMAH (doença não neoplásica), AACs (neoplasia benigna) e CACs (neoplasia maligna), doenças adrenocorticais que diferem no padrão de captação de ^{18}F -FDG (21).

Com relação à expressão do gene *SLC2A1*, não foi identificada diferença significativa entre PMAH e AACs ($p > 0.05$). Porém, foi encontrada diferença significativa entre a expressão dos CACs quando comparada aos pacientes com PMAH ($p < 0.05$) e com AACs ($p < 0.05$) (Figura 20).

Figura 20 – Comparação entre as expressões gênicas do *SCL2A1* em PMAH, AACs e CACs.

Em se tratando do gene *HK2*, os pacientes com PMAH e AACs apresentaram expressões gênicas similares ($p > 0.05$). Porém uma diferença significativa foi encontrada entre a expressão nos CACs quando comparada com PMAH ($p < 0.05$) e com AACs ($p < 0.05$) (Figura 21).

Figura 21 - Comparação entre as expressões gênicas da *HK2* em PMAH, AACs e CACs.

4.6 Comparação da expressão proteica de GLUT1 e HK2 entre pacientes com PMAH, CACs e AACs

A tabela 4 representa os pacientes com AACs e CACs, tamanho do nódulo, score de Weiss proveniente do exame anatomopatológico e HSCORE.

Tabela 4 – HSCORE dos pacientes com ACC e CAC, tamanho do nódulo e score de Weiss.

Grupo	Tamanho do nódulo (cm)	Weiss	GLUT1			HK2		
			Intensidade M	Células marcadas (%) M	HSCORE M	Intensidade	Células marcadas (%)	HSCORE
AAC1	3.9	2	1	1	1	0	0	0
AAC2	8.5	1	0	0	0	0	0	0
AAC3	5.7	0	1	4	4	0	0	0
AAC4	7.0	1	1	4	4	0	0	0
AAC5	3.2	0	0	0	0	0	0	0
AAC6	3.4	0	0	0	0	0	0	0
AAC7	5.0	1	0	0	0	1	1	1
AAC8	4.4	1	0	0	0	0	0	0
AAC9	5.0	0	1	2	2	0	0	0

AAC10	6.0	0	1	1	1	1	1	1
AAC11	5.5	0	0	0	0	0	0	0
AAC12	3.5	1	2	1	2	0	0	0
AAC13	4.4	0	0	0	0	0	0	0
AAC14	-	1	0	0	0	1	3	3
CAC1	13.5	5	2	2	4	2	3	6
CAC2	16	8	2	4	8	1	3	3
CAC3	6.0	5	2	4	8	2	4	8
CAC4	6.0	5	1	1	1	2	4	8
CAC5	17	9	2	4	8	2	4	8
CAC6	6.5	-	1	1	1	1	4	4
CAC7	5.0	7	1	1	1	1	4	4
CAC8	4.5	3	0	0	0	1	2	2
CAC9	19	8	0	0	0	1	2	2

Na análise de GLUT1, o HSCORE encontrado na PMAH variou entre 0 e 4. Com relação à HK2, também variou de 0 a 4. Na análise de GLUT1, 50% dos pacientes apresentaram expressão positiva, dentre os quais, 66.66% apresentaram imunomarcção fraca (HSCORE entre 1 e 2) e 16.66%, intermediária (HSCORE entre 3-4). Os demais não apresentaram expressão significativa de GLUT1 (Figura 20). Já na análise de HK2, 66.66% apresentou expressão positiva, dentre os quais, 37.5% apresentaram imunomarcção baixa e 25%, intermediária. Os demais pacientes não apresentaram expressão de HK2.

Na análise da expressão proteica do GLUT1 e da HK2, o HSCORE encontrado nos pacientes com AAC variou entre 0 e 4. Na análise da expressão proteica do GLUT1, 42.85% dos pacientes apresentaram expressão positiva, dentre os quais, 66.66% apresentaram imunomarcção fraca (HSCORE entre 1-2) e 33.33%, intermediária (HSCORE entre 3-4). O restante não apresentou expressão significativa de GLUT1. Já na análise de HK2, apenas 21,42% apresentou expressão positiva. Destes, 66.66% apresentaram imunomarcção fraca e 33.33%, intermediária. Os demais não apresentaram expressão de HK2.

Nos pacientes com CAC, o HSCORE variou de 0 a 8 para GLUT1 e de 2 a 8 para HK2. Na análise de GLUT1, 77,77% apresentaram imunomarcção positiva (apenas 2 pacientes não

expressaram GLUT1). Dentre estes, 42.85% apresentaram imunomarcacão fraca, 14.28%, intermediária e 42.85%, forte (*HSCORE* 5-8). Com relação  HK2, todos os pacientes com CAC apresentaram imunomarcacão positiva, sendo que 22.22% apresentaram marcação fraca, 33.33%, intermediária e 44.44%, forte.

A tabela 5 apresenta sucintamente a distribução da expressão proteica de GLUT1 e HK2 nos pacientes com AAC, CAA e PMAH.

Tabela 5 – Distribuo da expressão proteica nos pacientes com AAC, CAA e PMAH.

Doença HSCORE	GLUT1			HK2		
	AAC (n=15)	PMAH (n=12)	CCA (n=10)	AAC (n=15)	PMAH (n=12)	CAA (n=10)
Negativo (0)	57.15%	50%	22.23%	78.58%	33.34%	0
Fraco (1-2)	66.66%	66.66%	42.85%	66.66%	37.5%	22.22%
Intermediário (3-4)	33.33%	16.66%	14.28%	33.33%	25%	33.33%
Forte (5-8)	0	0	42.85%	0	0	44.44%

Ao comparar as expressões proteicas, representadas pelo HSCORE, do GLUT1 não foram encontradas diferenças significativas entre nenhuma das doenças estudadas ($p>0.05$; Figura 22). No entanto, analisando o HSCORE da HK2, foi encontrada uma diferença significativa entre todas as três doenças analisadas ($p<0.05$; Figura 23).

Figura 22 – Comparação entre as expressões proteicas de GLUT1 em PMAH, AACs e CACs, a partir do HSCORE.

Figura 23 - Comparação entre as expressões proteicas de GLUT1 em PMAH, AACs e CACs, a partir do HSCORE.

Nas figuras a seguir é possível visualizar a imunomarcagem do GLUT1 e HK2 em tecidos de adrenais de pacientes com PMAH (Figuras 24 e 25), AAC (Figura 26) e CAA (Figura 27).

Figura 24 - Imunomarcaco de GLUT1 em paciente com PMAH **a.** Foto de imunomarcacão negativa, com um controle interno de hemácias marcadas positivamente (X100); **b.** Foto de imunomarcacão positiva (X200), GLUT1 em localizao membranosa (HSCORE = 4, intermediário).

Figura 25 – Imunomarcaco de HK2 em paciente com PMAH: **a.** Foto de imunomarcacão negativa (X200); **b.** Foto de imunomarcacão positiva (X100) de HK2 (HSCORE = 3, intermediário).

Figura 26 – Imunomarcaco em paciente com AAC: **a.** Foto de imunomarcaco parcialmente positiva de GLUT1(X200) em localizao membranosa e citoplasmtica (HSCORE = 2, fraco); **b.** Foto de imunomarcaco positiva de HK2 (X200) em localizao citoplasmtica (HSCORE = 2, fraco).

Figura 27 – Imunomarcaco em paciente com CAA: **a.** Foto de imunomarcaco positiva de GLUT1(X200) em localizao membranosa (HSCORE = 8, forte); **b.** Foto de imunomarcaco positiva de HK2 (X200, forte).

5. Discussão

No presente estudo analisamos o padrão de expressão dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3*, e de suas respectivas proteínas em pacientes com PMAH, com o objetivo de investigar uma possível correlação entre via do metabolismo glicolítico e a captação aumentada de ^{18}F -FDG no exame PET/CT nos pacientes analisados.

Em estudos anteriores foi sugerido o ponto de corte de SUV_{máx} 3.1 para diferenciar tumores adrenocorticais benignos e malignos (21, 23) com sensibilidade e especificidade de 98.5 e 92%, respectivamente. Semelhantemente ao comportamento de lesões adrenocorticais malignas, o SUV_{máx} observado entre os pacientes com PMAH neste estudo foram >3.1, demonstrado que a captação de ^{18}F -FDG nestes pacientes encontra-se aumentada, como previamente descrito pelo nosso grupo (26) em três pacientes com PMAH (SC subclínica) do sexo feminino, não relacionadas entre si.

Shimizu *et al.* (68) descreveram um caso de SC subclínica causada por AAC com SUV_{máx} = 4.8, os autores especularam que o SUV_{máx} aumentado foi devido a atividade secretora hormonal do tumor. Curiosamente, em 3 dos 4 pacientes com AAC que realizaram ^{18}F -FDG analisados neste estudo (dados não apresentados) também foi observada uma captação aumentada de ^{18}F -FDG, acima de 3.1 (21). A suspeita de uma lesão maligna adrenal frente a uma alta captação SUV_{máx} deve ser considerada com cautela e analisada em conjunto com as características clínicas, laboratoriais e radiológicas.

Neste estudo, 2 pacientes com CAA realizaram PET/CT (dados não apresentados), apresentaram captação aumentada de ^{18}F -FDG e hiperexpressão do GLUT1 e HK2. Apesar da captação de ^{18}F -FDG estar envolvida com o metabolismo glicolítico e todos os pacientes com PMAH no presente estudo apresentarem SUV_{máx} semelhante a tumores adrenocorticais malignos ($\geq 3,1$) (21), não foi observada hiperexpressão dos genes *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3*, quando comparados ao *pool* de adrenais normais ($p > 0.05$) nos pacientes com PMAH.

Contrariamente à nossa hipótese inicial, a expressão destes genes envolvidos no metabolismo da glicose não refletiu a captação aumentada de ^{18}F -FDG nos pacientes com PMAH.

Além disso, ainda que todos os pacientes com PMAH tenham apresentando altas taxas de glicólise, isto é, apresentaram captação aumentada de ^{18}F -FDG no PET/CT, estudos anteriores demonstraram que os mecanismos envolvidos na captação de glicose e no metabolismo glicolítico parecem ser diferentes em cada doença (69-71). Pacientes com carcinoma hepatocelular (HCC) apresentaram alta captação de ^{18}F -FDG associada com expressão baixa ou negativa de GLUT1 e HK2 (69). Os mecanismos exatos não foram completamente avaliados, no entanto, outros estudos revelaram que o crescimento de HCCs é glutamino-dependente (70) e que os ácidos graxos, e não a glicose, são a principal fonte de energia de células malignas no HCC (71). Neste mesmo estudo foram propostas vias alternativas como responsáveis pela captação aumentada de ^{18}F -FDG, como a via pentose fosfato. Isto poderia explicar a baixa expressão proteica de GLUT1 e HK2 associadas a um alto SUV_{máx} em pacientes com HCC, corroborando com os resultados observados neste trabalho.

No presente estudo não foi encontrada hiperexpressão do *SLC2A1* e *HK2* nos pacientes com PMAH, quando comparados com o *pool* de adrenais normais ($p>0.05$). Ainda que estes sejam os genes mais estudados na regulação da captação de ^{18}F -FDG, já foram descritos mais de 11 subtipos de facilitadores de transporte de glicose humanos (72). Uma via que pode estar envolvida na captação de ^{18}F -FDG é a relacionada ao *SLC2A2*, que é seletivamente expresso no fígado, nas células β pancreáticas, nas absortivas renais e também nas células epiteliais do intestino (73). Interessantemente, *SLC2A1* e *SLC2A2* parecem estar intimamente ligados, pois já foi descrita uma transformação do GLUT1 em GLUT2 descrita durante o desenvolvimento do fígado em ratos (74). Além disto, foram observadas hipoexpressão e hiperexpressão de GLUT1 e GLUT2, respectivamente, ambas correlacionadas com captação de ^{18}F -FDG em pacientes com HCC (75).

Já foi demonstrado que a produção de G6P, molécula resultante da fosforilação da glicose, depende mais da atividade fosforilante da enzima HK2 do que da sua expressão proteica, e que as HKs são inibidas por altas concentrações intracelulares de G6-P (76). Foi observado também (77) que a baixa atividade de G-6-Pase em neoplasias malignas causa aumento na retenção de FDG, por impedir a desfosforilação de FDG-6-P para FDG.

O FDG pode ser um substrato para P-gp, um transportador de membrana plasmática dependente de ATP, que é responsável por resistência inata ou adquirida a drogas em células tumorais devido a uma característica que permite o efluxo de drogas (78), ou seja, o P-gp pode atuar como uma bomba de efluxo para reduzir o acúmulo de FDG (75). Isto poderia explicar uma baixa captação de ^{18}F -FDG associada a hiperexpressão de *SLC2A1* e *HK2*.

De acordo com estudo anterior (79), a expressão proteica de GLUT1 e atividade de HKs são fortemente influenciadas pelo ciclo de progressão celular e por taxas de proliferação, isto é, quanto mais altas as taxas de proliferação celular, maior a captação de FDG.

A PMAH é uma doença adrenal benigna, com evolução insidiosa, cujo aspecto anatomopatológico apresenta baixas taxas mitóticas (9). Sabe-se que na PMAH existe uma variabilidade de expressão das enzimas esteroidogênicas em células grandes ou citoplasma claro e células pequenas ou citoplasma compacto. Além disso, existe uma ineficiência da esteroidogênese. Portanto, acredita-se que o hipercortisolismo característico desta patologia só ocorre devido ao aumento no número de células, e não por um aumento da atividade de cada célula individualmente (11). Desta forma, o aumento na captação de ^{18}F -FDG relacionado com hipoexpressão dos genes estudados pode ser explicado pelo aumento no número de células da glândula adrenal hiperplásica, porém não pelo aumento da atividade glicolítica de cada célula. Foi observado que nos pacientes com CAC e altas taxas mitóticas de proliferação celular (64), a expressão de *SLC2A1* e *HK2* foi significativamente maior do que nos pacientes com PMAH e nos AAC ($p < 0.05$).

No presente estudo, a expressão proteica de GLUT1 foi observada tanto no citoplasma celular quanto na membrana plasmática, onde parece exercer suas funções (29). Thomas *et al.* (80) observaram que a administração de dexametasona causou a redistribuição de GLUT1 da membrana plasmática para microssomas intracelulares, resultando em uma diminuição de 21% da concentração de GLUT1 na membrana plasmática. Especulamos que o cortisol endógeno dos pacientes com PMAH também leve a uma redistribuição da expressão do GLUT1.

Neste estudo, foi observada uma discordância entre as expressões gênica e proteica de *SLC2A1*, isto é, apenas na primeira foi encontrada diferença significativa entre os pacientes com CAC, quando comparados com ACC e PMAH ($p < 0.05$). A análise da expressão proteica não identificou nenhuma diferença significativa entre as expressões das três doenças estudadas ($p > 0.05$). Esta discordância pode ser devido à expressão proteica de localização citoplasmática do GLUT1, que não foi analisada na imunoistoquímica. Deve-se ressaltar também que há limitações nas técnicas de imunoistoquímica, por ser uma análise semiquantitativa da expressão.

Os genes *HK1* e *HK3* são pouco explorados na literatura, portanto neste trabalho nós tivemos dificuldade para compará-los com outros estudos. No entanto, Binderup *et al.* (2013) (63) observaram hiperexpressões do *SLC2A1* em 38% e 86%, do *HK1* em 41% e 71%, e do *HK2* em 50% e 64% em tumores neuroendócrinos (TNEs) e carcinomas colorretais (CCRs), respectivamente. As expressões gênicas resultantes confirmaram uma atividade metabólica mais baixa nos TNEs em relação aos CCRs, concordando com a menor captação de ^{18}F -FDG demonstrada pelos TNEs, quando comparada aos CCRs. Diferentemente, no presente estudo não observamos correlação entre SUV_{máx} e a expressão gênica de *SLC2A1*, *HK1* e *HK2* nos pacientes com PMAH.

A hiperexpressão gênica e proteica de GLUT1 e HK2 está relacionada a diferentes subtipos de tumores malignos, sendo o aumento da expressão do GLUT1 fator prognóstico para tumores adrenocorticais (35). No presente estudo, 77.77% dos pacientes com CAC apresentaram

imunomarcção positiva para GLUT1, dos quais 42.85% com HSCORE forte. Todos os pacientes com CAC apresentaram imunomarcção positiva para HK2, sendo que 44.4% apresentou HSCORE forte, enquanto que nenhum paciente com PMAH e AAC apresentou este resultado.

Recentemente, van Berkel *et al* (81) observaram forte correlação entre a captação de ^{18}F -FDG em feocromocitomas e paragangliomas com mutação no gene *SDH* e a expressão da HK2 e HK3, porém não com a expressão de GLUT1. A expressão do GLUT1 foi considerada tanto em localização membranosa quanto citoplasmática, diferentemente do presente estudo. A correlação da expressão das hexokinases com o SUV é possivelmente relacionada ao fato de que a mutação descrita no *SDH* está associada a fatores de hipóxia, característica que difere os feocromocitomas e paragangliomas da PMAH.

Desta forma, apesar de todos os pacientes com PMAH terem apresentado $\text{SUV}_{\text{máx}} > 3.1$, a via pela qual a ^{18}F -FDG é captada não está correlacionada com a expressão de *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3*. Estudos futuros serão necessários para identificar as vias reguladoras do metabolismo da glicose que estão envolvidas na PMAH.

6. Conclusões

- Nos pacientes com PMAH analisados neste estudo foi encontrada alta captação de ^{18}F -FDG no exame de PET/CT, similar a dos pacientes com CCA ($\text{SUV}_{\text{máx}} \geq 3.1$)
- Foi encontrada uma forte correlação entre o tamanho do maior nódulo e o padrão de captação de ^{18}F -FDG em pacientes com PMAH.
- Não foi observada correlação significativa entre o padrão de captação de ^{18}F -FDG e a expressão gênica de *SLC2A1*, *HK1*, *HK2* e *HK3* em pacientes com PMAH.
- Não foi observada correlação significativa entre o padrão de captação de ^{18}F -FDG e a expressão proteica de GLUT1, HK1, HK2 e HK3 em pacientes com PMAH.
- Foi observada diferença significativa da expressão gênica do *SLC2A1* e *HK2* entre os pacientes com CAC analisados neste e os pacientes com AAC e PMAH.

7. Cronograma

	09/12- 10/12	11/12- 02/13	03/13- 05/13	06/13- 05/14	06/13- 05/14	06/14- 09/14
Revisão bibliográfica	X					
Treinamento no LIM42	X					
Coleta de amostras de pacientes		X	X	X		
Aprendizado das técnicas de biologia molecular		X				
Créditos da pós-graduação			X	X		
Aplicação das técnicas de biologia molecular			X	X	X	
Padronização dos anticorpos e aplicação das técnicas de imunohistoquímica			X	X	X	
Análise estatística					X	
Qualificação e submissão do manuscrito						X
Defesa da dissertação						X

8. Referências

1. Cushing H. The basophil adenomas of the pituitary body and their clinical manifestations (pituitary basophilism). 1932. *Obes Res.* 1994;2(5):486-508.
2. Arnaldi G, Angeli A, Atkinson AB, Bertagna X, Cavagnini F, Chrousos GP, et al. Diagnosis and complications of Cushing's syndrome: a consensus statement. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(12):5593-602.
3. Christopoulos S, Bourdeau I, Lacroix A. Clinical and subclinical ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia and aberrant hormone receptors. *Horm Res.* 2005;64(3):119-31.
4. Newell-Price J. Cushing's syndrome. *Clin Med.* 2008;8(2):204-8.
5. Louiset E, Duparc C, Young J, Renouf S, Tetsi Nomigni M, Boutelet I, et al. Intraadrenal corticotropin in bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2115-25.
6. Alencar GA, Lerario AM, Nishi MY, Mariani BM, Almeida MQ, Tremblay J, et al. ARMC5 Mutations are a Frequent Cause of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;jc20134237.
7. KIRSCHNER MA, POWELL RD, LIPSETT MB. CUSHING'S SYNDROME: NODULAR CORTICAL HYPERPLASIA OF ADRENAL GLANDS WITH CLINICAL AND PATHOLOGICAL FEATURES SUGGESTING ADRENOCORTICAL TUMOR. *J Clin Endocrinol Metab.* 1964;24:947-55.
8. Lacroix A. ACTH-independent macronodular adrenal hyperplasia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):245-59.
9. Antonini SR, Fragoso MC, Lacroix A. [Clinical and molecular aspects of the ACTH-independent bilateral macronodular adrenal hyperplasia]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2004;48(5):620-36.
10. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. *Endocr Rev.* 2001;22(1):75-110.
11. Bourdeau I, Stratakis CA. Cyclic AMP-dependent signaling aberrations in macronodular adrenal disease. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;968:240-55.
12. Assié G, Libé R, Espiard S, Rizk-Rabin M, Guimier A, Luscap W, et al. ARMC5 mutations in macronodular adrenal hyperplasia with Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 2013;369(22):2105-14.

13. Faucz FR, Zilbermint M, Lodish MB, Szarek E, Trivellin G, Sinaii N, et al. Macronodular Adrenal Hyperplasia due to Mutations in an Armadillo Repeat Containing 5 (ARMC5) Gene: A Clinical and Genetic Investigation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014;jc20134280.
14. Beuschlein F, Fassnacht M, Assié G, Calebiro D, Stratakis CA, Osswald A, et al. Constitutive activation of PKA catalytic subunit in adrenal Cushing's syndrome. *N Engl J Med.* 2014;370(11):1019-28.
15. Findlay JC, Sheeler LR, Engeland WC, Aron DC. Familial adrenocorticotropin-independent Cushing's syndrome with bilateral macronodular adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76(1):189-91.
16. Rockall AG, Babar SA, Sohaib SA, Isidori AM, Diaz-Cano S, Monson JP, et al. CT and MR imaging of the adrenal glands in ACTH-independent cushing syndrome. *Radiographics.* 2004;24(2):435-52.
17. Doppman JL, Nieman LK, Travis WD, Miller DL, Cutler GB, Chrousos GP, et al. CT and MR imaging of massive macronodular adrenocortical disease: a rare cause of autonomous primary adrenal hypercortisolism. *J Comput Assist Tomogr.* 1991;15(5):773-9.
18. Dudczak R, Traub-Weidinger T. PET and PET/CT in endocrine tumours. *Eur J Radiol.* 2010;73(3):481-93.
19. Barakat MT, Meeran K, Bloom SR. Neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(1):1-18.
20. Ong LC, Jin Y, Song IC, Yu S, Zhang K, Chow PK. 2-[18F]-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake in human tumor cells is related to the expression of GLUT-1 and hexokinase II. *Acta Radiol.* 2008;49(10):1145-53.
21. 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.
22. Tessonnier L, Sebag F, Palazzo FF, Colavolpe C, De Micco C, Mancini J, et al. Does 18F-FDG PET/CT add diagnostic accuracy in incidentally identified non-secreting adrenal tumours? *Eur J Nucl Med Mol Imaging.* 2008;35(11):2018-25.
23. Groussin L, Bonardel G, Silvéra S, Tissier F, Coste J, Abiven G, et al. 18F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography for the diagnosis of adrenocortical tumors: a prospective study in 77 operated patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(5):1713-22.
24. Mamede M, Higashi T, Kitaichi M, Ishizu K, Ishimori T, Nakamoto Y, et al. [18F]FDG uptake and PCNA, Glut-1, and Hexokinase-II expressions in cancers and inflammatory lesions of the lung. *Neoplasia.* 2005;7(4):369-79.

25. Bakheet SM, Saleem M, Powe J, Al-Amro A, Larsson SG, Mahassin Z. F-18 fluorodeoxyglucose chest uptake in lung inflammation and infection. *Clin Nucl Med*. 2000;25(4):273-8.
26. Alencar GA, Fragoso MC, Yamaga LY, Lerario AM, Mendonca BB. (18)F-FDG-PET/CT imaging of ACTH-independent macronodular adrenocortical hyperplasia (AIMAH) demonstrating increased (18)F-FDG uptake. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(11):3300-1.
27. Avril N. GLUT1 expression in tissue and (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med*. 2004;45(6):930-2.
28. Mueckler M, Thorens B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. *Mol Aspects Med*. 2013;34(2-3):121-38.
29. Airley R, Loncaster J, Davidson S, Bromley M, Roberts S, Patterson A, et al. Glucose transporter glut-1 expression correlates with tumor hypoxia and predicts metastasis-free survival in advanced carcinoma of the cervix. *Clin Cancer Res*. 2001;7(4):928-34.
30. Zhang JZ, Behrooz A, Ismail-Beigi F. Regulation of glucose transport by hypoxia. *Am J Kidney Dis*. 1999;34(1):189-202.
31. Joost HG, Thorens B. The extended GLUT-family of sugar/polyol transport facilitators: nomenclature, sequence characteristics, and potential function of its novel members (review). *Mol Membr Biol*. 2001;18(4):247-56.
32. Macheda ML, Rogers S, Best JD. Molecular and cellular regulation of glucose transporter (GLUT) proteins in cancer. *J Cell Physiol*. 2005;202(3):654-62.
33. Mueckler M, Caruso C, Baldwin SA, Panico M, Blench I, Morris HR, et al. Sequence and structure of a human glucose transporter. *Science*. 1985;229(4717):941-5.
34. Asano T, Katagiri H, Takata K, Lin JL, Ishihara H, Inukai K, et al. The role of N-glycosylation of GLUT1 for glucose transport activity. *J Biol Chem*. 1991;266(36):24632-6.
35. Fenske W, Völker HU, Adam P, Hahner S, Johanssen S, Wortmann S, et al. Glucose transporter GLUT1 expression is an stage-independent predictor of clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(3):919-28.
36. Bork P, Sander C, Valencia A. Convergent evolution of similar enzymatic function on different protein folds: the hexokinase, ribokinase, and galactokinase families of sugar kinases. *Protein Sci*. 1993;2(1):31-40.
37. Wilson JE. Hexokinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 1995;126:65-198.
38. Gelb BD, Worley KC, Griffin LD, Adams V, Chinault AC, McCabe ER. Characterization of human genomic yeast artificial chromosome inserts containing hexokinase 1 coding information on chromosome 10. *Biochem Med Metab Biol*. 1992;47(3):265-9.

39. Lehto M, Xiang K, Stoffel M, Espinosa R, Groop LC, Le Beau MM, et al. Human hexokinase II: localization of the polymorphic gene to chromosome 2. *Diabetologia*. 1993;36(12):1299-302.
40. Colosimo A, Calabrese G, Gennarelli M, Ruzzo AM, Sangiuolo F, Magnani M, et al. Assignment of the hexokinase type 3 gene (HK3) to human chromosome band 5q35.3 by somatic cell hybrids and in situ hybridization. *Cytogenet Cell Genet*. 1996;74(3):187-8.
41. White TK, Wilson JE. Isolation and characterization of the discrete N- and C-terminal halves of rat brain hexokinase: retention of full catalytic activity in the isolated C-terminal half. *Arch Biochem Biophys*. 1989;274(2):375-93.
42. Baijal M, Wilson JE. Functional consequences of mutation of highly conserved serine residues, found at equivalent positions in the N- and C-terminal domains of mammalian hexokinases. *Arch Biochem Biophys*. 1992;298(1):271-8.
43. Tsai HJ, Wilson JE. Functional organization of mammalian hexokinases: characterization of chimeric hexokinases constructed from the N- and C-terminal domains of the rat type I and type II isozymes. *Arch Biochem Biophys*. 1995;316(1):206-14.
44. Wilson JE. Isozymes of mammalian hexokinase: structure, subcellular localization and metabolic function. *J Exp Biol*. 2003;206(Pt 12):2049-57.
45. Radojković J, Ureta T. Hexokinase isoenzymes from the Novikoff hepatoma. Purification, kinetic and structural characterization, with emphasis on hexokinase C. *Biochem J*. 1987;242(3):895-903.
46. Saraiva LM, Seixas da Silva GS, Galina A, da-Silva WS, Klein WL, Ferreira ST, et al. Amyloid- β triggers the release of neuronal hexokinase 1 from mitochondria. *PLoS One*. 2010;5(12):e15230.
47. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science*. 1956;123(3191):309-14.
48. Pedersen PL. Warburg, me and Hexokinase 2: Multiple discoveries of key molecular events underlying one of cancers' most common phenotypes, the "Warburg Effect", i.e., elevated glycolysis in the presence of oxygen. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39(3):211-22.
49. Mathupala SP, Ko YH, Pedersen PL. Hexokinase-2 bound to mitochondria: cancer's stygian link to the "Warburg Effect" and a pivotal target for effective therapy. *Semin Cancer Biol*. 2009;19(1):17-24.
50. Bustamante E, Pedersen PL. High aerobic glycolysis of rat hepatoma cells in culture: role of mitochondrial hexokinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(9):3735-9.

51. Nakashima RA, Mangan PS, Colombini M, Pedersen PL. Hexokinase receptor complex in hepatoma mitochondria: evidence from N,N'-dicyclohexylcarbodiimide-labeling studies for the involvement of the pore-forming protein VDAC. *Biochemistry*. 1986;25(5):1015-21.
52. Holder WD, White RL, Zuger JH, Easton EJ, Greene FL. Effectiveness of positron emission tomography for the detection of melanoma metastases. *Ann Surg*. 1998;227(5):764-9; discussion 9-71.
53. Brown RS, Wahl RL. Overexpression of Glut-1 glucose transporter in human breast cancer. An immunohistochemical study. *Cancer*. 1993;72(10):2979-85.
54. Brown RS, Goodman TM, Zasadny KR, Greenson JK, Wahl RL. Expression of hexokinase II and Glut-1 in untreated human breast cancer. *Nucl Med Biol*. 2002;29(4):443-53.
55. Kurata T, Oguri T, Isobe T, Ishioka S, Yamakido M. Differential expression of facilitative glucose transporter (GLUT) genes in primary lung cancers and their liver metastases. *Jpn J Cancer Res*. 1999;90(11):1238-43.
56. Brown RS, Leung JY, Kison PV, Zasadny KR, Flint A, Wahl RL. Glucose transporters and FDG uptake in untreated primary human non-small cell lung cancer. *J Nucl Med*. 1999;40(4):556-65.
57. Higashi K, Ueda Y, Sakurai A, Mingwang X, Xu L, Murakami M, et al. Correlation of Glut-1 glucose transporter expression with [(18)F]FDG uptake in non-small cell lung cancer. *Eur J Nucl Med*. 2000;27(12):1778-85.
58. Gu J, Yamamoto H, Fukunaga H, Danno K, Takemasa I, Ikeda M, et al. Correlation of GLUT-1 overexpression, tumor size, and depth of invasion with 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake by positron emission tomography in colorectal cancer. *Dig Dis Sci*. 2006;51(12):2198-205.
59. Burke B, Giannoudis A, Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, et al. Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1233-43.
60. Yen TC, See LC, Lai CH, Yah-Huei CW, Ng KK, Ma SY, et al. 18F-FDG uptake in squamous cell carcinoma of the cervix is correlated with glucose transporter 1 expression. *J Nucl Med*. 2004;45(1):22-9.
61. Izuishi K, Yamamoto Y, Sano T, Takebayashi R, Nishiyama Y, Mori H, et al. Molecular mechanism underlying the detection of colorectal cancer by 18F-2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography. *J Gastrointest Surg*. 2012;16(2):394-400.
62. Nakajo M, Kajiya Y, Tani A, Yoneda S, Shirahama H, Higashi M. ¹⁸F-FDG PET for grading malignancy in thymic epithelial tumors: significant differences in ¹⁸F-FDG uptake and

expression of glucose transporter-1 and hexokinase II between low and high-risk tumors: preliminary study. *Eur J Radiol.* 2012;81(1):146-51.

63. Binderup T, Knigge U, Loft A, Federspiel B, Kjaer A. 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography predicts survival of patients with neuroendocrine tumors. *Clin Cancer Res.* 2010;16(3):978-85.

64. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984;8(3):163-9.

65. Boland GW, Blake MA, Holalkere NS, Hahn PF. PET/CT for the characterization of adrenal masses in patients with cancer: qualitative versus quantitative accuracy in 150 consecutive patients. *AJR Am J Roentgenol.* 2009;192(4):956-62.

66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C_T$) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.

67. McCarty KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J. Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med.* 1985;109(8):716-21.

68. Shimizu A, Oriuchi N, Tsushima Y, Higuchi T, Aoki J, Endo K. High [18F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) uptake of adrenocortical adenoma showing subclinical Cushing's syndrome. *Ann Nucl Med.* 2003;17(5):403-6.

69. Lee JD, Yang WI, Park YN, Kim KS, Choi JS, Yun M, et al. Different glucose uptake and glycolytic mechanisms between hepatocellular carcinoma and intrahepatic mass-forming cholangiocarcinoma with increased (18)F-FDG uptake. *J Nucl Med.* 2005;46(10):1753-9.

70. Wong MS, Raab RM, Rigoutsos I, Stephanopoulos GN, Kelleher JK. Metabolic and transcriptional patterns accompanying glutamine depletion and repletion in mouse hepatoma cells: a model for physiological regulatory networks. *Physiol Genomics.* 2004;16(2):247-55.

71. Hansson PK, Asztély AK, Clapham JC, Schreyer SA. Glucose and fatty acid metabolism in McA-RH7777 hepatoma cells vs. rat primary hepatocytes: responsiveness to nutrient availability. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1684(1-3):54-62.

72. Scheepers A, Joost HG, Schürmann A. The glucose transporter families SGLT and GLUT: molecular basis of normal and aberrant function. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2004;28(5):364-71.

73. Thorens B. Molecular and cellular physiology of GLUT-2, a high-K_m facilitated diffusion glucose transporter. *Int Rev Cytol.* 1992;137:209-38.

74. Wang C, Brennan WA. Rat skeletal muscle, liver and brain have different fetal and adult forms of the glucose transporter. *Biochim Biophys Acta.* 1988;946(1):11-8.

75. Seo S, Hatano E, Higashi T, Nakajima A, Nakamoto Y, Tada M, et al. P-glycoprotein expression affects 18F-fluorodeoxyglucose accumulation in hepatocellular carcinoma in vivo and in vitro. *Int J Oncol.* 2009;34(5):1303-12.
76. Aloj L, Caracó C, Jagoda E, Eckelman WC, Neumann RD. Glut-1 and hexokinase expression: relationship with 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose uptake in A431 and T47D cells in culture. *Cancer Res.* 1999;59(18):4709-14.
77. Nelson CA, Wang JQ, Leav I, Crane PD. The interaction among glucose transport, hexokinase, and glucose-6-phosphatase with respect to 3H-2-deoxyglucose retention in murine tumor models. *Nucl Med Biol.* 1996;23(4):533-41.
78. Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med.* 1987;316(22):1388-93.
79. Yamada K, Brink I, Bissé E, Epting T, Engelhardt R. Factors influencing [F-18] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose (F-18 FDG) uptake in melanoma cells: the role of proliferation rate, viability, glucose transporter expression and hexokinase activity. *J Dermatol.* 2005;32(5):316-34.
80. Thomas DM, Rogers SD, Ng KW, Best JD. Dexamethasone modulates insulin receptor expression and subcellular distribution of the glucose transporter GLUT 1 in UMR 106-01, a clonal osteogenic sarcoma cell line. *J Mol Endocrinol.* 1996;17(1):7-17.
81. van Berkel A, Rao JU, Kusters B, Demir T, Visser E, Mensenkamp AR, et al. Correlation Between In Vivo 18F-FDG PET and Immunohistochemical Markers of Glucose Uptake and Metabolism in Pheochromocytoma and Paraganglioma. *J Nucl Med.* 2014.