HELENA PANTELIOU LIMA VALASSI

**Importância da via do mevalonato nas
neoplasias do córtex adrenal**

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

Programa de Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Chin Jia Lin

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lima-Valassi, Helena Panteliou

Importância da via do mevalonato nas neoplasias do córtex adrenal / Helena
Panteliou Lima Valassi. -- São Paulo, 2010.

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

Orientador: Chin Jia Lin.

Descritores: 1.Córtex supra-renal 2.Neoplasias do córtex supra-renal 3.Carcinoma
adrenocortical 4.Adenoma adrenocortical 5.Colesterol 6.Expressão gênica

USP/FM/DBD-464/10

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

Dedicatória

Aos meus pais, José (in memorian) e Beth.

Aos meus amores:

Alexandre, Íris Cristina e bebê que está a caminho

Agradecimientos

Ao Prof. Dr. Chin Jia Lin pela orientação no desenvolvimento e elaboração desta tese. Sua genialidade foi fundamental desde o início deste trabalho. Agradeço seu apoio em momentos críticos.

A Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça que me recebeu em seu laboratório em 2003, durante meu aprimoramento profissional e, a partir de então, me ofereceu inúmeras oportunidades profissionais. Tenho profunda admiração por sua capacidade intelectual e administrativa, mas principalmente pelo ser humano que é. Deixo aqui registrado meu eterno agradecimento pelo apoio incondicional nos momentos difíceis durante a enfermidade de meu pai. Muito obrigada por tudo!!! Obrigada por ser muito mais do que chefe, mentora, amiga...

Ao Dr. Antônio pelas idéias e sugestões para o desenvolvimento desta tese.

A amiga Luciana Montenegro pelo auxílio nos experimentos, incentivo, mas principalmente pela amizade que foi crescendo durante este período!!!

A Dra. Ana Cláudia, Dra. Cândida e Dra. Estela pelos apontamentos e sugestões durante a qualificação.

Ao Dr. Marcelo Cidade Batista que acreditou em mim desde o aprimoramento. Durante estes anos no laboratório tenho aprendido muito com o sr, meu mentor na prática profissional. Obrigada pela amizade e incentivo constantes!!

A amiga Luciane Bussmann pela amizade, apoio pessoal e profissional irrestritos. Obrigada por tudo!!!

A querida Valéria Samuel Lando pela amizade e apoio, dividindo responsabilidades no laboratório.

As amigas e companheiras de café-da-manhã Márcia Rodrigues (amiga da vida toda, minha irmã), Luciana Leopoldino (Virgulina querida) e Poline (companheira na primeira gestação) pelas alegrias e tristezas divididas nestes anos de convivência.

A todos profissionais, alunos e amigos do LIM/42, em especial: Regina Martin, Mirian Nishi, Milena Abrão, Cecília, Michele, Izabel, Mirian Nakamura, Ana Elisa, Cidinha, Nilda, Ana Farat, Cristiane, Luiza, Márcia Ester, Cássia, Dalvinha, Giselle, Fran, Neide, Ângela, Gislene, Andrea Leal, Tânia, Viviani, Marisa, Beatriz, Tamaya, Luciana, Mariana, Éricka, Rosangele, Rosana, Cristina, Daniela, Danila, Érika, Andresa, Fernanda e Adriana que participaram direta ou indiretamente na execução desta tese e principalmente bons momentos de convívio durante parte ou todos estes anos...

Ao Laboratório de Proteínas do Centro de Estudos do Genoma Humano – IB-USP, em especial a Prof. Dra. Mariz Vainzof, Lydia e Telma que me proporcionaram o primeiro contato com a Biologia Molecular.

A todos da DLC-HCFMUSP que colaboraram para minha formação profissional, as companheiras de aprimoramento Fatima, Mary e Adriana, e aos amigos da DLC, em especial Letícia Neri e Leila Borracha, que tornaram este período mais leve.

A Profa. Dra. Suzane Kioko Ono-Nita que me orientou na elaboração do primeiro trabalho (monografia de aprimoramento), mas principalmente por toda atenção e cuidados com meu pai.

Aos amigos do Hospital Universitário (em especial: Cristiane Fujii, Luciana Amaral, Angélica, Alzira, Cilene e Daniela Crema), aos amigos e professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP (em especial: Luciana Luchesi, Ana Carolina, Celi, Simone e Keli) pela contribuição para minha formação profissional e amizade.

A D. Eliana pela oportunidade de me preparar para o vestibular no melhor cursinho de São Paulo e pela sua amizade desde então.

Agradeço especialmente:

Aos meus pais, Beth e José, que me deram toda a base, apoio, carinho e especialmente amor, essenciais para que eu chegasse até aqui. Não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto amo vocês. Pai, pena que você não está mais aqui...

Ao meu querido e amado Alexandre que, desde os meus 17 anos, está sempre presente em todos os momentos de minha vida, bons ou ruins. Graças ao seu apoio me graduei na principal Universidade do país. Durante o período da pós-graduação me deu dois presentes mais que especiais: a Íris Cristina e o bebê que está a caminho. Vocês três são a razão de minha vida!!! Mais uma vez, não tenho palavras para agradecer e dizer o quanto te amo...

Ao Nicholas, meu irmãozinho preferido, te adoro!!!

Ao Sogrinho e D. Ana por todo carinho durante estes anos de convívio.

A toda minha família e amigos!!!

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

Referências: adaptadas do *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. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

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

Sumário

Listas de abreviaturas

Lista de símbolos

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Abstract

1	Introdução	1
1.1	Neoplasias do córtex da supra-renal	2
1.2	Diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas do córtex da supra-renal	4
1.3	Fisiopatologia dos tumores do córtex da supra-renal	5
1.3.1	Mecanismos gerais da tumorigênese	5
1.3.2	Clonalidade	6
1.3.3	Instabilidade genômica	7
1.3.4	Genes supressores tumorais	8
1.3.5	Fatores de crescimento	10
1.3.6	Fatores de transcrição	12
1.4	Diagnóstico molecular	14
1.5	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR)	16
1.5.1	O colesterol como substrato para esteroidogênese adrenal	18
1.5.2	Aporte de colesterol e biologia de tumores	22
1.5.3	Isoprenóides e a isoprenilação de proteínas	23
1.5.4	Inibição via do mevalonato nas neoplasias humanas	26
2	Objetivos	31
3	Métodos	33
3.1	Casuística	34
3.2	Avaliação da expressão dos genes <i>CYP11A1</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>CYP17A1</i> , <i>CYP21A1</i> , <i>HSD3B1</i> , <i>FDFT1</i> , <i>HMGCR</i> , <i>StAR</i> , <i>TSPO</i> , <i>SCARB1</i> e <i>LDLR</i> em tumores adrenocorticais	37
3.2.1	RNA referência de supra-renais	37
3.2.2	Extração de RNA dos tecidos tumorais	37
3.2.3	Síntese do cDNA	38

3.2.4	PCR em tempo real.....	39
3.3	Avaliação dos efeitos de diferentes inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas em células NCI-H295A	40
3.3.1	Cultura de células	40
3.3.2	Avaliação do efeito da inibição da atividade da HMGCR na via das MAPK's.....	41
3.3.3	Ensaio para determinação da viabilidade celular	43
3.4	Análises estatísticas	45
4	Resultados	48
4.1	Expressão dos genes <i>CYP11A1</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>CYP17A1</i> , <i>CYP21A1</i> , <i>HSD3B1</i> , <i>FDFT1</i> , <i>HMGCR</i> , <i>StAR</i> , <i>TSPO</i> <i>SCARB1</i> e <i>LDLR</i> em tumores adrenocorticais.....	48
4.2	Efeitos de diferentes inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas em células NCI-H295A.....	64
5	Discussão	70
6	Conclusões	77
7	Referências	80

Listas

Lista de abreviaturas

17OHP	17-hidroxi-progesterona
ACA	Adenoma adrenocortical de adulto
ACC	Carcinoma adrenocortical de adulto
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
ACTs	Tumores adrenocorticais
AP	Álcool perílico
BCSC-1	Breast Cancer Suppressor Candidate 1
BFs	Bisfosfonatos
BWS	Síndrome de Beckwith-Wiedemann
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CGH	Hibridização genômica comparativa
CYP11A1	Cytochrome P450, family 11, subfamily A, polypeptide 1
CYP11B1	Cytochrome P450, family 11, subfamily B, polypeptide 1
CYP17A1	Cytochrome P450, family 17, subfamily A, polypeptide 1
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEAS	Sulfato de dehidroepiandrosterona
LD50	Dose letal mediana
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EC	Enzyme Commission number / Número de classificação da enzima
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FCS	Soro fetal bovino
FDTF1	Farnesil difosfato farnesil transferase 1
FGFR4	Receptor do tipo 4 do fator de crescimento de fibroblastos

FTase	Farnesil proteína transferase
GAP	Proteína ativadora de GTPase
GATA4	GATA-binding protein 4 – fator de transcrição
GATA6	GATA-binding protein 6 – fator de transcrição
GDP	Guanina difosfato
GEF	Fator de troca de guanina
GGTase I	Geranilgeranil proteína transferase I
GGTase II	Geranilgeranil proteína transferase II
GTP	Guanina trifosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A
HMGCR	3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase
H-Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
IGF-1	Insulin like growth factor 1
IGF-1R	Insulin like growth factor one receptor
IGF-2	Insulin like growth factor 2
IMM	Membrana mitocondrial interna
LDLR	Receptor de lipoproteína de baixa densidade
LFS	Síndrome de Li-Fraumeni
LOH	Perda de heterozigose
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MEN1	Supressores tumorais
NCI-H295A	Linhagem celular derivada de tumor de córtex adrenal humano
NEM-1	Neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1
N-Ras	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OMIN	Online Mendelian Inheritance in Man

OMM	Membrana mitocondrial externa
P450 _{scc}	Cholesterol side-chain cleavage
PAC	Carcinoma adrenocortical Pediátrico
PAD	Adenoma adrenocortical pediátrico
PBR	Receptor periférico de benzodiazepínico
PBS-T	Phosphate buffer saline com tween
PMSF	Phenylmethanesulfonylfluoride
PVDF	Fluoreto de polivinilideno
Rho	Rho family of GTPases
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
RQ	Quantidade relativa
RT-PCR	Reverse transcriptase PCR
SCARB	Receptor de lipoproteína de alta densidade
SDS - PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio
SF-1	Steroidogenic factor-1
SQS	Esqualeno sintase
StAR	Steroidogenic acute regulatory protein
<i>TP53</i>	Gene supressor tumoral
TSPO	Proteína translocadora de 18 KDa

Lista de Figuras

Figura 1 -	A via do mevalonato e seus diversos ramos.....	18
Figura 2 -	Esteroidogênese	19
Figura 3 -	Modificações pós-traducionais das proteínas Ras.....	25
Figura 4 -	Efeitos prováveis da inibição da via do mevalonato e isoprenilação de proteínas.	27
Figura 5 -	Resultados de expressões relativas obtidas por PCR em tempo real dos genes <i>HMGCR</i> , <i>FDFT1</i> , <i>StAR</i> , <i>TSPO</i> , <i>LDLR</i> e <i>SCARB1</i> no grupo de tumores adrenocorticais adultos.	54
Figura 6 -	Resultados de expressões relativas obtidas por PCR em tempo real dos genes envolvidos na esteroidogênese <i>CYP11A1</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>CYP17A1</i> , <i>CYP21A2</i> e <i>HSD3B1</i> no grupo de tumores adrenocorticais adultos.	55
Figura 7 -	Resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes <i>HMGCR</i> , <i>FDFT1</i> , <i>StAR</i> , <i>TSPO</i> , <i>LDLR</i> e <i>SCARB1</i> no grupo de tumores adrenocorticais adultos.	56
Figura 8 -	Resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes envolvidos na esteroidogênese <i>CYP11A1</i> , <i>CYP11B1</i> , <i>CYP17A1</i> , <i>CYP21A2</i> e <i>HSD3B1</i> no grupo de tumores adrenocorticais pediátrico.	57
Figura 9 -	Análise de componente principal dos tumores adrenocorticais do grupo adulto.....	58
Figura 10 -	Análise cluster dos tumores adrenocorticais do grupo adulto.	59
Figura 11 -	Correlação dos resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes <i>HMGCR</i> e <i>TSPO</i> nos tumores adrenocorticais do grupo adulto.	62
Figura 12 -	Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da <i>HMGCR</i> e da farnesil sintase.	65
Figura 13 -	Fosforilação de ERK1/2 após tratamento por 24 horas com inibidor da <i>HMGCR</i> - lovastatina - em diversas concentrações na linhagem NCI-H295A.	66

Figura 14 -	Representação dos resultados do ensaio de viabilidade celular após inibição da esqualeno sintase.....	67
Figura 15 -	Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da FTase.	68
Figura 16-	Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da GGTase I	66
Figura 17 -	Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da FTase, GGTase I e GGTase II.....	69
Figura 18 -	Esquema representativo do papel da via do mevalonato nas neoplasias adrecorticais.....	76

Lista de Tabelas

Tabela 1 -	Dados clínicos dos pacientes portadores de tumores do córtex adrenal do grupo adulto	35
Tabela 2 -	Dados clínicos dos pacientes portadores de tumores do córtex adrenal do grupo pediátrico.....	36
Tabela 3 -	Ensaio utilizado para análise da expressão gênica	40
Tabela 4 -	Inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas utilizados e suas enzimas alvo.....	44
Tabela 5 -	<i>Status</i> da expressão dos genes estudados nos tumores adrenocorticais.....	51
Tabela 6 -	Análise comparativa da expressão dos genes estudados nos tumores adrenocorticais	53
Tabela 7 -	Matriz de correlação entre a expressão dos diferentes genes no grupo de tumores adrenocorticais adulto	60
Tabela 8 -	Matriz de correlação entre a expressão dos diferentes genes no grupo de tumores adrenocorticais pediátrico.....	63

Resumo

Lima-Valassi, HP Importância da via do mevalonato nas neoplasias do córtex adrenal. São Paulo. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 98 p.

Introdução: A 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A redutase (HMGCR) é a enzima limitante da via do mevalonato. Esta via, que tem como produto final o colesterol, gera inúmeros subprodutos, como os isoprenóides, essenciais para modificação pós-traducional de várias proteínas envolvidas em proliferação e crescimento celular. Em tecidos esteroideogênicos (por exemplo, córtex adrenal), a HMGCR pode desempenhar um papel tanto no controle do crescimento e proliferação celular quanto na esteroideogênese. HMGCR está hiperexpressa em várias formas de neoplasias humanas inclusive em tumores adrenocorticais (ACTs), mas a sua importância na biologia dos ACTs é desconhecida. **Objetivos:** Avaliar o padrão de expressão da *HMGCR* e outros genes que participam na economia de colesterol e esteroideogênese em ACTs adultos e pediátricos; avaliar o efeito do inibidor da HMGCR – lovastatina – na via proliferativa – MAPK; e analisar os efeitos de vários inibidores da via mevalonato na viabilidade de células NCI-H295A. **Casuística e métodos:** Analisamos a expressão do RNAm por PCR em tempo real dos genes *HMGCR*, *FDFT1*, *SCARB1*, *LDLR*, *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1*, em ACTs, incluindo 27 tumores de adultos [17 adenomas (ACA) e 10 carcinomas (ACC)]; 21 tumores de crianças [13 adenomas (PAD) e 8 carcinomas (PAC)]. Um pool comercial de RNA poli A obtido de córtex adrenal normal humano foi utilizado como amostra referência. A fosforilação da proteína ERK 1/2 (efetor final da via MAPK) no extrato intracelular de células NCI-H295A após tratamento com lovastatina foi avaliada através de SDS-PAGE seguido por *immunoblot* com anticorpos específicos. A ação sob a viabilidade celular em células NCI-H295A dos inibidores da via mevalonato foi realizada por análise colorimétrica. **Resultados:** A maioria dos ACTs de adultos apresentou expressão diminuída de *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* e hiperexpressão da *HMGCR*. Neste grupo, a expressão relativa dos genes *StAR*, *TSPO*, *CYP11B1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* foi significativamente menor nos ACCs ($p < 0,02$). O gene *LDLR* não foi diferencialmente expresso na maioria dos ACTs do grupo adulto, enquanto que o gene *SCARB1* e *FDFT1* estavam hipoexpressos nestes tumores, independentemente do comportamento biológico. A análise de agrupamento mostrou que ACCs formam um grupo distinto dos ACAs, com exceção de uma amostra. Com relação aos tumores do grupo pediátrico, não houve diferença na expressão dos genes estudados entre PAD e PAC. A expressão de *HMGCR* e *TSPO* se correlacionou inversamente, enquanto uma significativa correlação positiva entre *StAR*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* foi observada nos ACTs do grupo adulto. O tratamento de células NCI-H295A com lovastatina provocou uma diminuição na fosforilação ERK 1/2. A inibição da HMGCR e isoprenilação de proteínas diminuiu drasticamente a viabilidade das células NCI-H295A, ao contrário do bloqueio específico da síntese de colesterol, que não apresentou efeito sobre a viabilidade celular. **Conclusão:** A hipoexpressão de genes

relacionados à esteroidogênese e, em menor grau, a hiperexpressão da HMGCR caracterizam os ACCs. A hiperexpressão da HMGCR leva a um aumento na isoprenilação de proteínas e não da produção de colesterol, pois os principais genes envolvidos na esteroidogênese estão hipoexpressos e o bloqueio específico da síntese de colesterol não interferiu na viabilidade das células NCI-H295A. A isoprenilação de proteínas (por exemplo, Ras) é um evento crucial para viabilidade das células NCI-H295A e está envolvida na ativação de cascatas de sinalização de proliferação celular. A via mevalonato é um alvo potencial para o tratamento dos tumores adrenocorticais.

Descritores: 1. Córtex supra-renal 2. Neoplasias do córtex supra-renal 3. Carcinoma adrenocortical 4. Adenoma adrenocortical 5. Colesterol 6. Expressão gênica

Summary

Lima-Valassi, HP. *Importance of mevalonate pathway in adrenocortical tumors*. São Paulo. "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2010. 98 p.

Introduction: 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGCR) is the rate-limiting enzyme of the mevalonate pathway, which generates isoprenoids for both post-translational modification of several proteins involved in cell growth and proliferation and biosynthesis of cholesterol. Therefore, in steroidogenic tissues (e. g. adrenal cortex), HMGCR may play a role in both growth control and steroidogenesis. *HMGCR* is overexpressed in several forms of human neoplasms including adrenocortical tumors (ACTs), but its importance in the biology of ACTs is unknown. **Objective:** To assess the expression pattern of *HMGCR*, and other genes involved in cholesterol economy and steroidogenesis in pediatric and adult ACTs. To evaluate the impact of a HMGCR inhibitor – lovastatin – on proliferative pathway- MAPK - of NCI-H295A cells; to evaluate the effects of various mevalonate pathway inhibitors in NCI-H295A cells viability. **Methods:** We analyzed *HMGCR*, *FDFT1*, *LDLR*, *SCARB1*, *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* and *HSD3B1* mRNA expression by real-time RT-PCR in ACTs [Adult tumors: 14 adenomas (ACA) and 11 carcinomas (ACC); Pediatric tumors: 13 adenomas (PAD) and 8 carcinomas (PAC)]. A commercial pool of normal human adrenal cortex poly A RNA was used as reference sample. We assess ERK phosphorylation after treatment with lovastatin through SDS-PAGE of intracellular extract followed by immunoblotting with specific antibodies. Action of mevalonate pathway inhibitors on cellular viability was assessed by colorimetric assay. **Results:** Most adult ACTs showed decreased expression of *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* and *HSD3B1* and overexpression of *HMGCR*. In this group, the relative expressions of *TSPO*, *StAR*, *CYP11B1*, *CYP21A1* and *HSD3B1* were significantly lower in the ACCs ($P < 0.02$). *LDLR* was not differentially expressed in most of adults ACTs, while *FDFT1* and *SCARB1* were hypoexpressed in this group, independently of biological behavior. Cluster analysis showed that adult ACCs form a group distinct from adrenocortical adenomas, with exception of one carcinoma sample. Regarding tumors of the pediatric group, no differences in the expression of evaluated genes were found between PAD and PAC. The expression of *HMGCR* and *TSPO* correlated negatively while a significantly positive pairwise correlation among *StAR*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* was observed in adults ACTs. Lovastatin treatment leads a decreased ERK phosphorylation in NCI-H295A cells. Inhibition of HMGCR, farnesyl syntase and protein isoprenylation decreased drastically NCI-H295A viability unlike the specific block of cholesterol biosyntheses that did not have any effect on cell viability. **Conclusion:** The hypoexpression of genes related to steroidogenesis and (to a lesser degree) the overexpression of HMGCR characterizes ACCs. HMGCR overexpression cause an increased isoprenylation of proteins rather than cholesterol production for steroidogenesis or membrane cellular integrity since the key regulators involved in this process were downregulated and specific inhibition of cholesterol did not affect NCI-H295A viability.

Isoprenylation of proteins is a crucial event for NCI-H295A viability and is involved in signaling cascades (e.g. Ras). Mevalonate pathway is a potential target for treatment of adrenocortical tumors

Descriptors: 1. Adrenal cortex neoplasms 2. Adrenocortical carcinoma 3. Adrenocortical adenoma 4. Adrenal córtex 5. Cholesterol 6. Gene expression

1 Introdução

1.1 Neoplasias do córtex da supra-renal

Os tumores do córtex da glândula adrenal são neoplasias comuns em humanos. Sua prevalência aumenta com a idade, podendo atingir até 9% dos indivíduos acima de 50 anos, conforme verificado por estudos de necropsias. Até 6% dos pacientes submetidos a exames radiológicos por motivos não relacionados podem apresentar nódulos adrenais como achado incidental ^(1,2). Embora os tumores do córtex adrenal sejam comuns, carcinoma do córtex adrenal é uma condição rara e agressiva, totalizando 0,05% a 0,2% de todas as doenças malignas. Há predominância no sexo feminino. A distribuição etária do carcinoma do córtex adrenal segue um padrão bimodal com dois picos de incidência: um na infância, antes dos cinco anos, e outro na vida adulta, por volta da quarta e quinta décadas ⁽³⁻⁶⁾. Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil há uma maior incidência do que a descrita na literatura para pacientes com idade inferior a 15 anos ^(7, 8) devido a uma mutação germinativa do gene supressor tumoral TP53 (R337H) que estes pacientes apresentam ^(9,10). As manifestações clínicas dos carcinomas do córtex da supra-renal são decorrentes da hipersecreção hormonal (causando as síndromes de Cushing, virilizante, hiperalдостeronismo primário e feminização), de efeitos compressivos ou efeitos sistêmicos inespecíficos (febre, emagrecimento, comprometimento do estado geral) ⁽⁹⁻

¹²⁾. Apesar da raridade, a doença é letal. A mortalidade em cinco anos está entre 15-47% ⁽¹³⁾. O fator prognóstico mais importante é o estadiamento, conforme proposto por MacFarlane ⁽¹⁴⁾ e modificado por Sullivan, principalmente utilizado nos tumores pediátricos ⁽¹⁵⁾. Nos estadios I (tumor < 5 cm) e II (> 5 cm), o tumor está confinado aos limites da cápsula adrenal. Nos estadios III (invasão de órgãos adjacentes, linfonodos ou veia cava inferior) e IV (metástases à distância), a doença apresenta disseminação para além dos limites da glândula, fato que limita as possibilidades de cura cirúrgica. Os locais mais frequentes de metástases do carcinoma do córtex da supra-renal são fígado, pulmões, ossos e sistema nervoso central ⁽⁶⁾. Infelizmente, cerca de 40%-70% dos pacientes encontram-se nos estádios III e IV ao diagnóstico, embora séries mais recentes tenham mostrado tendência a um diagnóstico em estadios mais precoces, provavelmente pela maior disponibilidade e melhor qualidade técnica dos exames de imagem ^(3,4,6,16). O tratamento cirúrgico é a única modalidade terapêutica que inequivocamente tem um impacto positivo na sobrevida, principalmente em estadios iniciais da doença. Porém, mesmo nos casos onde aparentemente se obtém uma ressecção cirúrgica completa, uma proporção significativa dos casos apresentará recidiva ou metástases ⁽³⁾. Caso a ressecção cirúrgica não seja possível, outras opções terapêuticas incluem o agente adrenolítico mitotane, quimioterapia com agentes convencionais e radioterapia. Estas não parecem afetar a sobrevida de forma significativa e possuem caráter paliativo ⁽¹⁷⁾.

1.2 Diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas do córtex da supra-renal

O diagnóstico definitivo de carcinoma só é estabelecido de maneira inequívoca quando há sinais clínicos ou radiológicos de disseminação da doença – presença de invasão de estruturas adjacentes ou metástases (estádios III e IV de MacFarlane). Nos estádios iniciais, o diagnóstico diferencial entre as neoplasias malignas e as benignas é uma tarefa difícil, uma vez que nessas situações os quadros clínico, radiológico e laboratorial podem ser muito semelhantes. Visto que o tratamento das duas situações pode diferir, é fundamental que o diagnóstico seja preciso mesmo em estádios precoces.

Clinicamente, a presença de síndromes mistas (síndrome de Cushing associada à síndrome virilizante) é sugestiva de malignidade ⁽¹⁸⁾. Este fato, do ponto de vista hormonal, é caracterizado pelo acúmulo de precursores androgênicos da biossíntese do cortisol (sobretudo DHEAS e androstenediona). Isto ocorre devido aos carcinomas apresentarem diversos defeitos nas enzimas relacionadas à esteroidogênese. Classicamente, os pacientes portadores de adenomas não apresentam níveis elevados de precursores (podem apresentar até níveis reduzidos devido à supressão do ACTH hipofisário e atrofia da adrenal contralateral) ⁽¹³⁾.

Atualmente, o diagnóstico de malignidade tem sido realizado por sistemas de classificação que são baseados em dados clínicos e

histológicos ⁽¹⁹⁻²¹⁾. Em geral, estes sistemas apresentam uma acurácia semelhante. Os critérios de Weiss, um dos sistemas de classificação mais aceitos, a malignidade é definida na presença de pelo menos três de nove achados histológicos ⁽²¹⁻²³⁾. Os critérios histopatológicos de Weiss incluem: altas taxas de mitose, mitoses atípicas, aumento nuclear, pequena porcentagem de células claras, necrose, arquitetura difusa do tumor, invasão capsular, invasão sinusoidal e invasão venosa ^(21,23). Os critérios definitivos de malignidade são presença de invasão de tecidos e órgãos adjacentes ou metástases. Embora apresente uma boa acurácia (em prever má evolução), existem algumas limitações: a dependência de um patologista experiente, a não reprodutibilidade entre observadores diferentes ⁽²⁴⁾ e a imprevisibilidade em casos limítrofes (presença de três critérios) ⁽²²⁾. Além disso, o prognóstico em crianças é geralmente melhor e a presença de três ou mais critérios não necessariamente predizem uma má evolução ^(25, 26).

1.3 Fisiopatologias dos tumores do córtex da supra-renal

1.3.1 Mecanismos gerais da tumorigênese

A tumorigênese é o resultado de uma série de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo. Esses eventos conferem às células neoplásicas habilidades que as tornam capazes de se desvencilhar de mecanismos antitumorais inatos do organismo ⁽²⁷⁾. As células que passam por esse “processo evolutivo” são capazes de realizar expansão clonal

dando origem aos tumores. Estas células adquirem as seguintes habilidades: auto-suficiência de sinais proliferativos, insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, escape dos mecanismos pró-apoptóticos, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade de invasão e disseminação à distância – metástases ⁽²⁷⁾. É necessário um contexto de instabilidade genômica, fenômeno que torna possível o acúmulo das mutações necessárias para que as habilidades sejam adquiridas. Um ponto interessante é que uma vez que uma mesma habilidade pode ser gerada por um repertório de eventos totalmente diversos e uma vez que uma nova habilidade seja adquirida, pouco importa quais foram as alterações iniciais desencadeantes do processo ⁽²⁷⁾. O grande divisor de águas (que diferencia uma neoplasia maligna de uma benigna) é a capacidade de invasão e metástases. Cerca de 90% das mortes relacionadas aos tumores sólidos são causadas pelas metástases ⁽²⁸⁾. Em pacientes portadores de carcinoma da supra-renal, a presença de metástases é o fator que mais afeta negativamente o prognóstico ⁽⁴⁾. Apesar de sua grande importância clínica, os mecanismos moleculares envolvidos no processo de disseminação metastática são relativamente pouco estudados, se comparados a outros eventos na cascata da tumorigênese, onde grandes avanços foram obtidos nas últimas décadas ^(29,30).

1.3.2 Clonalidade

Estudos de clonalidade mostraram que os carcinomas adrenocorticais são monoclonais ⁽³¹⁾, sugerindo um evento genético intrínseco como

iniciador do processo de tumorigênese, e não uma expansão policlonal causada por fatores estimuladores. Por outro lado, cerca de 50% dos adenomas adrenocorticais são policlonais ⁽³²⁾.

1.3.3 Instabilidade genômica

Desde os primeiros estudos anatomopatológicos é conhecido que os carcinomas adrenocorticais apresentam diversas alterações morfológicas nucleares, como múltiplas figuras de mitoses atípicas e anisocariose. Estudos de citologia de fluxo e citogenética confirmam que os carcinomas apresentam alto grau de aneuploidia ⁽³³⁾. Os mecanismos moleculares que causam estas alterações são pouco conhecidos, mas envolvem alterações em dezenas de genes ⁽³³⁾. Estudos de hibridização genômica comparativa (CGH) identificaram alguns desses eventos genéticos nos carcinomas da supra-renal. Perdas frequentes foram identificadas nos cromossomos 1p, 2q, 11q, 17p, 22p, 22q e ganhos nos cromossomos 2, 4, 5 e 19. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de alterações cromossômicas e o tamanho tumoral, consistente com a hipótese de que as alterações genéticas se acumulam com a progressão da doença ⁽³⁴⁻³⁷⁾. Em tumores pediátricos, observaram-se ganhos frequentes na região 9q34 ^(38, 39). Pontos de perdas ou ganhos cromossômicos são prováveis *loci* de genes supressores tumorais e oncogenes, respectivamente. Particularmente, as regiões 17p e 11q abrigam os supressores tumorais TP53 e MEN1 respectivamente, como será visto adiante. Perda de heterozigose (LOH)

nestas regiões são eventos frequentemente encontrados em carcinomas do córtex da supra-renal ⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

1.3.4 Genes supressores tumorais

O TP53 é um supressor tumoral que participa de processos de bloqueio do ciclo celular em resposta a estímulos genotóxicos e é capaz desencadear apoptose frente a lesões graves do genoma celular. Mutações somáticas deste gene estão presentes em cerca de 50% dos cânceres humanos ⁽⁴³⁾. Algumas séries demonstraram mutações somáticas do TP53 em 25%-82% dos casos de neoplasias do córtex da supra-renal ⁽⁴⁴⁻⁴⁷⁾. Contudo, um estudo mostrou uma discrepância entre a presença de mutações somáticas do TP53 e LOH na região 17p13, sugerindo a presença de outro(s) supressor(es) tumoral(is) no local ⁽⁴⁸⁾. Mutações germinativas do TP53 causam a síndrome de Li-Fraumeni (LFS - OMIM #151623). Dentro do espectro das neoplasias malignas que fazem parte da LFS, encontra-se o carcinoma do córtex da supra-renal, que acomete cerca de 4% dos portadores ⁽⁴⁹⁾. Mutações germinativas do TP53 são também frequentemente associadas a tumores do córtex adrenal pediátricos. Dados americanos e europeus indicam que 50-80% das crianças com diagnóstico de tumores da supra-renal (não pertencentes a famílias portadoras de LFS) são portadoras de mutações germinativas do TP53 ^(50,51). Nas regiões sudeste e sul do Brasil foi identificada uma mutação específica do TP53 (R337H) em 70-90% dos casos de tumores adrenocorticais pediátricos ^(9,10). Em condições “fisiológicas” esta mutação pouco interfere com a estabilidade da proteína

p53. Porém, em pH próximo a 8.0, há um desestabilização significativa da estrutura quaternária em relação à proteína selvagem ⁽⁵²⁾. Após o nascimento, a zona fetal da glândula supra-renal (que no terceiro trimestre da gestação corresponde a aproximadamente 90% da massa da glândula) involui rapidamente por apoptose ⁽⁵³⁾. Durante esse processo, ocorrem variações extremas de pH capazes de comprometer a função do p53 mutante ⁽⁵⁴⁾. Com isso, foi hipotetizado que os tumores pediátricos sejam derivados da zona fetal, em decorrência de um processo de apoptose defeituoso. Isso explicaria o fato do primeiro pico de incidência dos tumores da supra-renal ocorrer nos primeiros anos de vida. De fato, existem algumas semelhanças entre a atividade esteroideogênica e os perfis globais de expressão gênica entre os tumores pediátricos e a glândula supra-renal fetal ^(55,56).

As neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1 (NEM-1 - OMIN#13100) é uma síndrome de herança autossômica dominante, caracterizada pela associação de hiperparatireoidismo primário, tumores hipofisários e do pâncreas. Outras manifestações incluem tumores carcinóides brônquicos e hiperplasia adrenal em até 40% dos casos ⁽⁵⁷⁾, a maior parte das vezes adenomas assintomáticos, embora haja descrição de casos de carcinoma. A síndrome é causada por mutações germinativas em heterozigose do gene *MEN1*. Mutações somáticas deste gene foram descritas em tumores esporádicos da paratireóide, pâncreas e hipófise. Porém, em tumores da supra-renal esporádicos malignos e benignos, foi encontrada apenas uma mutação em 30 casos estudados, embora LOH do *locus* 11q13 tenha sido

observada em 90% dos carcinomas e 20% dos adenomas ⁽⁵⁸⁾. Contudo, sabe-se que perdas no cromossomo 11 geralmente envolvem todo o seu braço longo, sugerindo a presença de outro(s) supressor(es) tumoral(is) na região. Um provável candidato foi recentemente identificado por nosso grupo em um estudo de *differential display* ⁽⁵⁹⁾. Trata-se do gene *BCSC-1*, um supressor tumoral situado na região 11q23-q24 e recentemente descrito. Cerca de 80% das linhagens celulares de diversas neoplasias estudadas mostram LOH da região e perda da expressão deste gene ⁽⁶⁰⁾. Dados relativos à expressão do *BCSC-1* em neoplasias do córtex da supra-renal de pacientes adultos mostram uma menor expressão nos carcinomas, em relação aos adenomas, apontando um possível papel deste gene na fisiopatologia dos tumores da supra-renal.

1.3.5 Fatores de crescimento

O fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF2*) foi relacionado ao processo de tumorigênese adrenal, após a elucidação do mecanismo fisiopatológico da síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS – OMIM #130650). A BWS é um distúrbio do crescimento somático caracterizado por macroglossia, organomegalia, anomalias no desenvolvimento e tumores embrionários (destacam-se o tumor de Wilms, o neuroblastoma e o hepatoblastoma e o carcinoma do córtex da supra-renal). O mecanismo molecular causador são anomalias estruturais (genéticas e epigenéticas) na região 11p15, levando a uma alteração de *imprinting* que resulta em expressão bialélica do *IGF2* e silenciamento de dois genes envolvidos no

controle do ciclo celular: o *H19* e o *p57kip2*. Em carcinomas adrenocorticais esporádicos, foi demonstrada hiperexpressão de *IGF2* em cerca de 90% dos casos ⁽⁶¹⁾. O principal defeito molecular que leva à hiperexpressão do *IGF2* nos tumores esporádicos é a isodissomia paterna do locus 11p15 (deleção do alelo materno e duplicação do paterno, detectada por LOH deste locus). Menos frequentemente tem sido demonstrado o *imprinting* anômalo do alelo materno ⁽⁶²⁾. Recentemente, estudos independentes de expressão global por *microarray* em tumores do córtex da supra-renal validaram estes dados, demonstrando que o *IGF2* é um dos transcritos hiperexpressos mais abundantes nos carcinomas ^(56,63-67). Os efeitos tróficos do IGF2 nos tumores adrenocorticais são mediados pelo receptor tipo 1 de IGF (IGFR1). Expressão aumentada deste receptor também foi demonstrada ^(61,68).

O receptor do tipo 4 ao fator de crescimento de fibroblastos (FGFR4) é um receptor do tipo tirosina-quinase. Estudos recentes mostraram aumento da expressão deste receptor em neoplasias do córtex da Córte adrenal de pacientes adultos e pediátricos ^(56,67). É sabido que o *Basic fibroblast growth factor* (bFGF), um potente mitógeno e fator angiogênico para a glândula supra-renal fetal é capaz de ativar o FGFR4 ⁽⁵³⁾. Um dos mecanismos descritos de hiperexpressão deste receptor é através da amplificação gênica. Os estudos de CGH realizados em carcinomas do córtex da supra-renal mostraram a existência de ganhos frequentes no cromossomo 5, tanto em adultos quanto em crianças. Um estudo realizado por nosso grupo confirmou o aumento da expressão desse gene, onde, em pacientes adultos, os níveis de expressão do FGFR4 pelos carcinomas

foram significativamente superiores aos dos adenomas (Brito LP, 2007- apresentado no ENDO 2007).

1.3.6 Fatores de transcrição

Os fatores de transcrição da família GATA são proteínas relacionadas à organogênese, proliferação e diferenciação celular e apoptose em diferentes tecidos. Existem 6 representantes desta classe sendo que os fatores GATA 1, 2 e 3 predominam no tecido hematopoiético, enquanto os fatores GATA 4, 5 e 6 são expressos em pulmões, fígado, trato gastrointestinal, hipotálamo, gônadas, supra-renais e pituitária ^(69,70). Nas supra-renais de ratos e de humanos, há expressão do GATA4 principalmente no período fetal, enquanto o GATA6 é expresso tanto no período fetal e na vida adulta ⁽⁷¹⁾. Em um modelo murino que desenvolve espontaneamente tumores do córtex da supra-renal, há abundante expressão do GATA4 no tecido tumoral, acompanhada por baixos níveis do GATA6 ⁽⁷²⁾. Um estudo avaliou a expressão dos fatores de transcrição GATA4 e GATA6 em tumores malignos do córtex adrenal humano e benignos ⁽⁷³⁾. Porém, diferentemente do que ocorre no modelo animal, tanto as supra-renais normais estudadas, quanto a linhagem de células tumorais e os tumores, apresentaram expressão de GATA6 positiva. Expressão de GATA4 também foi detectada nas glândulas normais e em células NCI-H295A. Tanto os tumores malignos quanto os benignos expressaram GATA4, mas os primeiros apresentaram níveis de expressão significativamente mais elevados. Houve também uma menor expressão do

GATA6 pelos tumores malignos, comparados aos benignos e adrenais normais ⁽⁷³⁾. Um estudo posterior avaliou a expressão do GATA6 em tumores do córtex da supra-renal benignos e malignos através de imunohistoquímica e northern blot, correlacionando a expressão deste fator com o *sterodogenic factor-1* (SF-1), *CYP17* e p21 ⁽⁷²⁾. Em geral, foram encontrados níveis inferiores de expressão do GATA6 pelos carcinomas (exceto os tumores virilizantes, que expressavam os níveis mais elevados dentre os tumores malignos). Houve uma relação inversa entre o *score* de Weiss e o nível de expressão do GATA6, bem como uma relação direta entre seus níveis de expressão e os do *CYP17*, sugerindo a importância do fator na manutenção da diferenciação celular. Foi notada também relação direta entre o nível de expressão de SF-1 e o do GATA6, mostrando a inter-relação entre as duas proteínas, conforme previamente sugerido na literatura ⁽⁷²⁾. Os fatores de transcrição da família GATA, portanto, além de apresentarem papel importante no desenvolvimento e na regulação da proliferação e diferenciação celular da adrenal adulta, parecem também estar envolvidos no processo de tumorigênese da supra-renal, afetando principalmente os processos de diferenciação celular e apoptose.

Estudos de CGH independentes em tumores pediátricos mostraram ampliações frequentes na região 9q34, sugerindo a presença de um suposto oncogene ^(38,39). Um candidato, o oncogene *ABL1*, foi demonstrado não estar amplificado ⁽⁷⁴⁾. O gene *NR5A1* encontra-se na região 9q33.3 e codifica a proteína *sterodogenic factor-1* (SF-1), membro da superfamília dos receptores nucleares e que apresenta papel fundamental durante o processo

de organogênese da supra-renal, além de participar do controle da expressão de enzimas da esteroidogênese ⁽⁷⁵⁾. Foi demonstrado que o gene encontra-se amplificado em tumores pediátricos ⁽⁸⁴⁾. Além disso, os níveis de expressão da proteína são significativamente superiores aos da supra-renal normal ⁽⁷⁶⁾. Um estudo posterior demonstrou papel proliferativo e anti-apoptótico em um modelo experimental de hiperexpressão deste gene em células NCI-H295R ⁽⁷⁷⁾.

1.4 Diagnóstico molecular

O papel de algumas das alterações descritas anteriormente como marcadores prognósticos foi avaliado recentemente em casuísticas de tumores adrenocorticais em diferentes estadios. Tanto *loss of heterozygosity* (LOH) das regiões 17p13 e 11p15 quanto hiperexpressão de IGF2 estiveram associados a um maior risco de recorrência após a ressecção cirúrgica completa de tumores em estadios iniciais ⁽⁷⁸⁾. Contudo, um estudo demonstrou que nos carcinomas adrenocorticais metastáticos, a presença de LOH nas regiões 17p13 e 11p15, bem como a hiperexpressão de *IGF2*, não estão associadas a uma pior sobrevida ⁽⁷⁹⁾. Isto parece sugerir que apesar destas alterações terem um papel estabelecido nas etapas iniciais da tumorigênese, onde conferem às células neoplásicas mecanismos para escape dos mecanismos de controle do ciclo celular e auto-suficiência de

fatores proliferativos, seu papel nas etapas posteriores da progressão da doença é secundário. Um estudo avaliando a expressão dos genes *DGL7*, *PINK1* e *BUB1B* demonstrou poder em discriminar tumores benignos e malignos além de diferenciar dois subgrupos dentre os carcinomas com diferentes prognósticos ⁽⁸⁰⁾. Entretanto mais estudos são necessários para uso rotineiro destes marcadores na avaliação dos pacientes com tumores adrenocorticais.

De fato, foram estudados diversos marcadores imuno-histoquímicos e moleculares, mas até o momento, nenhum deles substituiu os parâmetros anátomo-patológicos. Ainda assim a avaliação anátomo-patológica é incapaz de fornecer qualquer pista a respeito do comportamento biológico de aproximadamente 30% dos tumores localizados do córtex adrenal ⁽⁷⁸⁾. Por esta razão a busca de marcadores (imunohistoquímicos, genéticos ou moleculares) que permitam um diagnóstico mais confiável do comportamento biológico dos tumores adrenocorticais tem sido um objetivo perseguido por muitos pesquisadores.

Na busca por novos marcadores moleculares, Gouveia *et al* encontraram hiperexpressão do RNAm do gene da enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR) nas células da linhagem NCI-H295A (linhagem celular derivada de tumor de córtex adrenal humano) e um espécime de carcinoma de córtex adrenal ⁽⁵⁹⁾. Diversos tumores hiperexpressam a *HMGCR*, indicando a importância da via do mevalonato na tumorigênese em geral, entretanto seu papel no comportamento biológico

dos tumores adrenocorticais é desconhecido e será alvo de nossa investigação.

1.5 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCR)

As células podem obter colesterol de fonte extracelular, mas também podem sintetizar colesterol *de novo* através da via do mevalonato. A enzima HMGCR participa da via do mevalonato ou também denominada via de biossíntese do colesterol ^(81,82). O colesterol, produto final da via do mevalonato, é o esteroide predominante da membrana celular e é importante na sinalização celular e regulação do crescimento de células eucarióticas ^(83,84). O controle desta via ocorre numa fase inicial do processo. A síntese do colesterol tem como matéria prima de partida uma molécula de acetil-coenzima A e envolve mais de 20 reações enzimáticas (Figura 1). As primeiras duas etapas compreendem reações de condensação levando à formação da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMG-CoA). A etapa limitante desta via é catalisada pela HMGCR, que transforma a HMG-CoA em mevalonato de forma irreversível (Figura 1). O mevalonato sofre então uma série de transformações até dar origem ao esqualeno. Este produto é o intermediário estratégico para a síntese de colesterol e sua geração é catalisada pela farnesil difosfato farnesil transferase 1 (FDFT1), ou também denominada esqualeno sintase (SQS). A partir deste ponto o esqualeno

sofre uma série de ciclizações até ser transformado em colesterol. Assim, a geração de esqualeno é o ponto a partir do qual a via de mevalonato está irreversivelmente comprometida com a síntese de colesterol ^(85,86). Além de colesterol, a via de mevalonato gera uma série de subprodutos que participam de diversos processos celulares fundamentais como, por exemplo, sinalização da proliferação celular ⁽⁸⁷⁾. A atividade da *HMGCR* é controlada pela modificação covalente induzida pela retroalimentação do colesterol e produtos intermediários desta via ^(88,89). O produto final desta via é o colesterol que é essencial para integridade e fluidez da membrana celular. Além da função estrutural, o colesterol é matéria-prima de outras moléculas que tem efeito biológico como os hormônios esteróides ⁽⁸⁴⁾. No córtex adrenal – um exemplo típico de tecido esteroideogênico – a expressão da *HMGCR* é induzida pelo ACTH, sugerindo que um dos destinos do colesterol sintetizado endogenamente nesses tecidos são as vias de esteroideogênese ⁽⁹⁰⁾.

Figura 1 - A via do mevalonato e seus diversos ramos

1.5.1 O colesterol como substrato para esteroidogênese adrenal

Assim como o tecido normal a partir do qual se originaram, as neoplasias do córtex supra-renal são capazes de sintetizar hormônios esteróides. No córtex adrenal são sintetizados os esteróides envolvidos no metabolismo de glicose (glicocorticóides: cortisol e corticosterona), no metabolismo de sódio e potássio (mineralocorticóides: aldosterona e deoxicorticosterona) bem como os esteróides sexuais (principalmente os andrógenos) (Figura 2). As neoplasias do córtex adrenal podem produzir

predominantemente uma ou mais classes de esteróides e produzir síndromes hormonais clinicamente detectáveis (Síndrome de Cushing, virilização, feminização, ou excesso de mineralocorticoide). O tumor de córtex adrenal também pode se apresentar como não funcionante quando ele não produz esteróides em quantidade suficiente para causar efeitos biológicos ou produzir apenas intermediários de vias de esteroidogênese desprovidos de ação biológica apreciável.

Figura 2 - Esteroidogênese

Como já dito acima, o colesterol é o substrato para esteroidogênese. As fontes de colesterol na adrenal incluem a síntese endógena (via do mevalonato), a captação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) através de seu receptor LDLR e a captação de lipoproteínas de alta densidade HDL

através do receptor SCARB1 ⁽⁹¹⁾. A principal fonte de colesterol para esteroidogênese em humanos é proveniente do LDL ⁽⁹¹⁾. O ACTH provoca um aumento da expressão do LDLR, consequentemente estimula a captação de LDL ⁽⁹¹⁾.

A síntese de esteróides se inicia com a clivagem da cadeia lateral do colesterol pela atividade 20,22 desmolase do P450scc (codificado por *CYP11A1*) e resulta na produção da pregnenolona. Esta reação é a etapa limitante da esteroidogênese e ocorre na membrana mitocondrial interna (IMM). Por isso, além da clivagem da cadeia lateral do colesterol, um processo crítico para a síntese de esteróides é a translocação do colesterol da membrana mitocondrial externa (OMM) para IMM para tornar disponível o colesterol para esteroidogênese. O colesterol é armazenado em vacúolos citoplasmáticos e transportado para a OMM. A translocação do colesterol da OMM para IMM é promovida pela proteína StAR (proteína reguladora aguda da esteroidogênese, codificada por *STAR*) e pela sua parceira, a proteína translocadora de 18 KDa (TSPO), também denominada receptor periférico de benzodiazepínico (PBR). A síntese da proteína StAR é aumentada em minutos após estímulo do ACTH ou pelo aumento do cálcio intracelular. A pregnenolona é um precursor comum para todos os outros esteróides e pode sofrer ação de várias enzimas ⁽⁹¹⁾. Este composto é convertido em progesterona pela 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta(5)-delta(4) isomerase (3 β -HSD) tipo II no citoplasma. A progesterona é então hidroxilada em 17-hidroxi-progesterona (17OHP) através da ação do P450c17 (codificado por *CYP17A1*). A 17-hidroxilação é uma etapa

necessária para a síntese de glicocorticóides. O P450c17 também apresenta atividade 17,20-liase, essencial na produção dos andrógenos adrenais, deidroepiandrosterona (DHEA) e androstenediona (Figura 2) ⁽⁹¹⁾. A secreção da androstenediona adrenal é dependente da conversão de DHEA pela 3 β -HSD. Esta enzima também converte 17-hidroxipregnenolona em 17OHP, mas a pregnenolona é o substrato preferido. A 21-hidroxilação da progesterona nas zonas glomerulosa e fasciculada e da 17OHP na zona fasciculada é feita pela ação da 21-hidroxilase (*CYP21A1*) produzindo deoxicorticosterona (DOC) e 11-deoxicortisol, respectivamente. A etapa final da biossíntese de cortisol ocorre na mitocôndria. O 11-deoxicortisol é convertido em cortisol pela ação da Esteróide 11- β -hydroxylase. (codificada por *CYP11B1*). Na zona glomerulosa, a 11- β -hydroxylase também converte DOC em corticosterona. Os três últimos passos para a síntese da aldosterona são processados pela enzima aldosterona sintase (codificada por *CYP11B2*) ⁽⁹¹⁾. A expressão gênica das enzimas responsáveis pela esteroidogênese apresenta-se reduzida nos carcinomas adrenais quando comparadas aos adenomas. Um estudo, através da análise de *microarray*, demonstrou que a expressão reduzida de cinco genes associados à esteroidogênese (*STAR*, *CYP11A*, *CYP11B1*, *HSD3B1*, *CYP17A1* e *CYP21A2*) é indicador de mau prognóstico nos carcinomas de córtex adrenal ⁽⁶⁷⁾. Vale lembrar que 3 β -HSD tipo I (codificada por *HSD3B1*) não participa da esteroidogênese adrenal, seu papel principal é na conversão de pregnenolona a progesterona na placenta e também é expressa na pele e mamas ⁽⁹²⁾.

1.5.2 Aporte de colesterol e biologia de tumores

Visto que o colesterol é um componente fundamental da membrana celular, é de se esperar que o aporte de colesterol às células tenha relação direta com a proliferação celular. De fato, vários estudos demonstram que há relação entre a velocidade de replicação e a síntese de colesterol. Por exemplo, tecidos de alta taxa de replicação, como o epitélio intestinal, apresentam um aumento da síntese de colesterol e da atividade da enzima HMGCR ⁽⁹³⁾. A quantidade de colesterol e formas esterificadas é regulada por um mecanismo complexo de um grupo de estruturas e reações onde o equilíbrio está alterado em diversas condições patológicas, principalmente no desenvolvimento tumoral. Células malignas apresentam alta demanda de colesterol e vários estudos demonstram que células tumorais captam lipoproteínas ricas em colesterol mais eficientemente que os tecidos normais ^(83,93). Evidências sugerem que tanto em lesões pré-malignas como em malignas há perda do controle por retroalimentação da atividade da HMGCR, além das seguintes alterações: maior acúmulo dos intermediários da via do mevalonato envolvidos na regulação do crescimento e morte celular, aumento das concentrações intracelulares de colesterol livre e ésteres em consequência do aumento dos receptores de LDL (LDLR), aumento da atividade da HMGCR e aumento da captura de HDL pelo seu receptor (SCARB1) ⁽⁸³⁾. Alterações no conteúdo de colesterol da membrana afetam diversas funções, incluindo a atividade de diversas enzimas associadas às balsas de lipídeos. Balsas de lipídeos (*lipid rafts*) são microdomínios de membrana ricos em colesterol e glicosfingolipídeos com

função de coordenar as plataformas sinalizadoras nas células ^(86,94,95). Muitas vezes abrigam enzimas intracelulares, principalmente quinases. Estas balsas de lipídeos formam sítios críticos onde os componentes de uma via de sinalização são arranjados de forma a regular processos como movimento celular, transporte intracelular e transdução de sinal. Transdução de sinais para proliferação migração e sobrevivência celular ocorre tipicamente através de balsas lipídicas ^(86,95).

1.5.3 Isoprenóides e a isoprenilação de proteínas

Isoprenóides são moléculas hidrofóbicas, derivadas de unidades do alceno isopreno, intermediárias da via de biossíntese do mevalonato que são essenciais na fisiologia celular por facilitar as interações proteína-proteína e proteína-membrana celular ⁽⁹⁶⁾. Elas são utilizadas na modificação pós-tradução de proteínas. As proteínas que sofrem isoprenilação representam de 0,5 a 2,0% de todas as proteínas de células mamíferas. Há uma ampla diversidade estrutural e funcional de proteínas isopreniladas. Exemplos de proteínas isopreniladas incluem: Ras, Rho, Rab, subunidade γ de proteínas G heterodiméricas, lamininas nucleares, proteínas centroméricas e diversas proteínas envolvidas em transdução de sinal ⁽⁹⁶⁾. A isoprenilação de proteínas ocorre através da adição de dois tipos de isoprenóides: pirofostato de farnesil e pirofostato de geranilgeranil. O sinal de isoprenilação de proteínas corresponde a uma pequena sequência de aminoácidos localizada na porção carboxi-terminal das proteínas que sofrem esta modificação ⁽⁹⁷⁾. Existem pelo menos três enzimas que catalisam a reação de isoprenilação

de proteínas: a farnesil proteína transferase (FTase), a geranilgeranil proteína transferase I (GGTase I) e a geranilgeranil proteína transferase II (GGTase II). A sequência CAAX^{*} na porção carboxi-terminal de uma proteína é reconhecida pela enzima FTase que incorpora o pirofosfato de farnesila (isoprenoíde de 15 carbonos) ao resíduo de cisteína. Como exemplo proteínas farnesiladas, a família das proteínas Ras e lamininas nucleares. Se o aminoácido X na porção carboxi-terminal do *box* CAAX for leucina ou isoleucina será incorporado o pirofosfato de geranilgeranila (isoprenoíde de 20 carbonos) catalisado pela enzima GGTase I, como por exemplo as proteínas Rac, RhoA, Rap1 e subunidade γ de proteínas G (Figura 3) ^(98,99). Se a proteína apresentar na porção carboxi-terminal a sequência CC, CXC ou CCXX[†], a proteína será isoprenilada pela enzima GGTase II, por exemplo as proteínas Rab ^(100,101). Após a incorporação de um isoprenoíde, uma endopeptidase cliva os três aminoácidos finais e finalmente ao resíduo cisteína isoprenilado é adicionado um ou mais grupos metil pela enzima isoprenilcisteína carboxi metil transferase (ICMT) (Figura 3). Algumas proteínas como, por exemplo, H-Ras e N-Ras sofrem adicionalmente a palmitoilação (Figura 3) ⁽¹⁰²⁾. A palmitoilação aumenta afinidade das proteínas H-Ras e N-Ras pela membrana plasmática contribuindo para atividade biológica destas proteínas ⁽¹⁰³⁾.

^{*} C um resíduo cisteína A um aminoácido alifático e X uma serina, metionina, alanina ou glutamina

[†] C: cisteína e X: um aminoácido qualquer

Figura 3 - Modificações pós-traducionais das proteínas Ras: **1**-Síntese Ras; **2**-Ras é reconhecido pela Ftase e farnesilado; **3**-Ras farnesilado se dirige ao retículo endoplasmático onde são clivados 3 aminoácidos carboxi-terminais; **4**-Carboximetilação da cisteína farnesilada; **5**-H e N-Ras são palmitoilados no complexo de Golgi; **6**-Translocação do H- e N-Ras para membrana plasmática; **7**-K-Ras não sofre palmitoilção e ancora-se a membrana plasmática através do grupo farnesil e interações eletrostáticas ⁽⁹⁷⁾

O grupo de proteínas isopreniladas de maior interesse é a de pequenas proteínas G. São proteínas G monoméricas com massa molecular de 20 a 40 KDa também conhecidas como pequenas GTPases. Proteínas Ras e Rho são pequenas GTPases que são inativas quando associadas ao GDP. O controle deste mecanismo ocorre através do ciclo GDP-GTP que é regulado pela atividade oposta de GEF's (fatores de troca de guanina) que catalisam a troca de GDP para GTP e GAPs (proteínas ativadoras de GTPase) que aumentam a razão de hidrólise de GTP/GDP + fosfato (PO₄). Ras e Rho interagem com uma série de proteínas afetando a atividade e ou localização destas, influenciando vias de sinalização posteriores que contribuem para o desenvolvimento e progressão do câncer ^(89,102). A isoprenilação é essencial para a localização correta destas proteínas.

Demonstrou-se recentemente que estas proteínas estão localizadas nas balsas de lipídeos (*lipid rafts*) ⁽¹⁰⁴⁾. A localização destas proteínas é crítica para sua função em vias de sinalização intracelular, sendo que, na ausência da isoprenilação há bloqueio ou mudança em eventos sinalizadores que inibem a proliferação celular e à ativação das caspases induzindo a apoptose ⁽¹⁰³⁾. Frente aos dados expostos podemos inferir que a atividade da via do mevalonato pode modular o crescimento e proliferação celulares.

1.5.4. Inibição via do mevalonato nas neoplasias humanas

Vários estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que diversos inibidores de via do mevalonato e isoprenilação de proteínas apresentam atividade antitumoral ^(87,105-110). Vários autores sugerem que a depleção de isoprenóides intermediários da via do mevalonato inibiria a proliferação celular e induziram a apoptose (Figura 4) ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾. Em diversos sistemas experimentais, inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas têm demonstrado resultados promissores ^(110,114).

Os inibidores da HMGCR são capazes de promover a apoptose e a diferenciação celular em muitos tipos de tumores malignos, ações independentes da redução lipídica ⁽¹¹⁵⁻¹¹⁸⁾. Estudos recentes demonstram que as estatinas (por exemplo, pravastatina, lovastatina, sinvastatina) reduzem a isoprenilação de proteínas, como por exemplo, as proteínas Ras inibindo a proliferação celular; e as proteínas Rho ocasionando a desorganização do citoesqueleto e indução do sistema fibrinolítico ⁽¹¹²⁾. As

estatinas demonstraram exercer potentes efeitos antitumorais em diversos modelos ⁽¹¹⁹⁾. Estudos com culturas celulares indicam que as estatinas podem inibir crescimento de células tumorais, induzir apoptose e inibir a migração celular ⁽¹²⁰⁻¹²²⁾. Em estudos com animais verificou-se que estes agentes têm a capacidade de retardar o crescimento tumoral, angiogênese e metástases ^(120,122,123). Em geral, as estatinas também exibem seletividade para células tumorais sobre as células normais, atributo essencial para uma boa terapia ^(121,124). A sua capacidade sinérgica a agentes quimioterápicos convencionais também foi demonstrada ⁽¹²⁵⁾.

Figura 4 - Efeitos prováveis da inibição da via do mevalonato e isoprenilação de proteínas. *Modificado de Wong et AL, 2002*
⁽¹¹³⁾

Os bisfosfonatos (BFs) são análogos do pirofosfato endógeno, no qual um átomo de carbono substitui o átomo central de oxigênio ⁽¹²⁶⁾. Os BFs aminados, mais novos e potentes - pamidronato, ibandronato, alendronato e zoledronato -, induzem apoptose nos osteoclastos, inibindo enzimas da via do mevalonato (farnesil sintase) e prevenindo a prenilação ⁽¹²⁷⁾. Vários estudos demonstraram que os BFs também possuem efeito em outras células além dos osteoclastos, incluindo células tumorais ⁽¹²⁸⁾. Já existe uma quantidade considerável de evidências *in vitro* e *in vivo* demonstrando que os BFs possuem efeito antitumoral em diferentes tipos de neoplasias e o mecanismo de ação destas drogas é diverso e inclui: inibição da proliferação celular, indução de apoptose, inibição da adesão e da invasividade celular, inibição da angiogênese e efeitos na secreção de fatores de crescimento e citocinas pelo micro-ambiente tumoral ⁽¹²⁷⁾. Fassnacht *et al.* demonstraram efeito antiproliferativo de forma concentração dependente do pamidronato em células adrenocorticais (NCI-H295) ⁽¹²⁹⁾. Em 2009 foi relatado o uso de zoledronato em uma paciente com carcinoma adrenocortical metastático que resultou em remissão completa em 6 anos de acompanhamento ⁽¹³⁰⁾.

A FTase e a GGTase I são de grande interesse como um potencial alvo terapêutico. Diferentes classes de inibidores FTase e de GGTase I que bloqueiam a isoprenilação de proteínas foram identificadas por inibir o crescimento de células tumorais ⁽¹³¹⁾. Os inibidores da FTase têm sido bem tolerados em estudos animais e não produzem os efeitos citotóxicos generalizados em tecidos normais, que são uma grande limitação da maioria dos agentes quimioterápicos convencionais ⁽¹³¹⁾. Há em andamento estudos

pré-clínicos com diversos inibidores FTase para determinar a viabilidade da dose e índice terapêutico, além de estudos de fase II e III também em andamento ^(107,108,131).

Uma alternativa que vem sendo pesquisada para o tratamento de tumores sólidos é a utilização do álcool perílico (AP). O AP, também chamado p-meta-1,7-dieno-6-ol ou 4-isopropenilciclo-hexenecarbinol, é um monoterpene isolado dos óleos essenciais de menta, cerejas e sementes de aipo, dentre outras plantas. Estudos em animais mostram que o AP é um agente quimioterápico eficaz na regressão de tumores de mama, pâncreas, fígado e próstata, e agente quimiopreventivo nos tumores de cólon, melanomas e neuroblastomas ⁽¹³²⁾. A inibição da transdução de sinal através da membrana pelo AP resulta da não ancoragem da proteína Ras através da inibição da isoprenilação. O AP está sendo utilizado em ensaios clínicos fases I e II em diversos tipos de tumores ⁽¹³²⁾.

Em vista dos resultados obtidos pelo nosso grupo em relação à hiperexpressão de *HMGCR* em células NCI-H295A e em um carcinoma de córtex adrenal decidimos explorar o significado biológico deste achado dentro do contexto da biologia dos tumores adrenocorticais. Uma alta atividade de *HMGCR* é um fenômeno esperado para os tumores adrenocorticais devido à atividade esteroidogênica do tecido de origem, entretanto a possível participação da via de mevalonato na promoção da proliferação celular em neoplasias adrenocorticais não foi examinada na literatura. Considerando os resultados promissores dos inibidores da via de mevalonato e da isoprenilação de proteínas no tratamento de neoplasias

malignas o foco do nosso estudo se concentrou na possibilidade da inibição da HMGCR e das enzimas responsáveis pela isoprenilação de proteínas de interferir na proliferação e na viabilidade de células do carcinoma de córtex adrenal.

2 Objetivos

Nosso trabalho buscará definir o papel da via do mevalonato nos tumores adrecorticais, para tanto:

- Analisar a expressão dos genes: *HMGCR*; reguladores e enzimas participantes da esteroidogênese: *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1*, *HSD3B1*, *StAR*, *TSPO*; enzima que converge a via do mevalonato para produção de colesterol: *FDFT1* e envolvidos na captação de colesterol: *SCARB1* e *LDLR* em amostras de tumores do córtex adrenal benignos e malignos;
- Avaliar a interferência na via proliferativa após tratamento com inibidores da *HMGCR*;
- Avaliar os efeitos de diversos inibidores da via do mevalonato na viabilidade celular de células NCI-H295A.

3 Métodos

3.1 Casuística

O protocolo de estudo foi submetido e aprovado pelo comitê de ética da instituição. Consentimentos, por escrito, foram obtidos de todos os pacientes ou responsáveis antes que os procedimentos de pesquisas fossem iniciados.

Quarenta e seis pacientes portadores de neoplasias do córtex da córtex adrenal [25 adultos e 21 crianças (pacientes com idade inferior a 18 anos)] foram submetidos ao tratamento cirúrgico e acompanhados no ambulatório da Disciplina de Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. As características clínicas dos pacientes encontram-se nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Dados clínicos dos pacientes portadores de tumores do córtex adrenal do grupo adulto

Paciente	Idade ao diagnóstico	Sexo	Síndrome Clínica*	Tamanho (cm)	Estádio§	Pontuação de Weiss	Diagnóstico
AB1	18	F	C	3,2	1	2	Adenoma
AB2	24	F	C	3,0	1	2	Adenoma
AB3	26	F	C	5,5	2	1	Adenoma
AB4	27	M	C	2,5	2	1	Adenoma
AB5	27	F	C	3,7	1	0	Adenoma
AB6	35	F	C	3,0	1	1	Adenoma
AB7	37	F	C	4,5	1	1	Adenoma
AB8	37	F	NF	3,5	1	0	Adenoma
AB9	39	F	C	2,5	1	1	Adenoma
AB10	40	F	NF	5,5	1	0	Adenoma
AB11	41	F	NF	1,8	1	0	Adenoma
AB12	45	F	NF	4,0	1	0	Adenoma
AB13	48	F	NF	5,0	1	0	Adenoma
AB14	50	F	V	4,5	1	2	Adenoma
AM1	19	F	V/C	13,0	3	8	Carcinoma
AM2	22	F	V	13,0	4	7	Carcinoma
AM3	23	F	V/C	14,0	3	6	Carcinoma
AM4	29	M	C	19,0	4	8	Carcinoma
AM5	29	F	V	20,0	2	4	Carcinoma
AM6	29	M	V/C	12,0	4	4	Carcinoma
AM7	30	M	IN	11,0	3	4	Carcinoma
AM8	33	M	NF	9,0	3	5	Carcinoma
AM9	45	F	C/V	10,0	3	7	Carcinoma
AM10	49	F	V/C	15,5	2	4	Carcinoma
AM11	66	F	NF	6,0	2	4	Carcinoma

* V: Virilização; C: Síndrome de Cushing; V/C: síndrome mista (virilização+Cushing); F: Feminização; IN: "incidentaloma"

§ Estadiamento de acordo com a classificação de MacFarlane modificada por Sullivan

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes portadores de tumores do córtex adrenal do grupo pediátrico

Paciente	Idade ao diagnóstico	Sexo	Síndrome Clínica*	Tamanho (cm)	Estádio§	Pontuação de Weiss	Diagnóstico
CB1	0.9	F	V/C	6,0	2	3	Adenoma
CB2	1.4	M	V/C	5,0	1	1	Adenoma
CB3	1.6	F	V	5,0	1	1	Adenoma
CB4	1.7	F	V	3,0	1	0	Adenoma
CB5	1.9	F	V	5,0	1	2	Adenoma
CB6	2.1	F	V	4,0	1	4	Adenoma
CB7	2.1	M	V	6,0	2	8	Adenoma
CB8	2.2	M	V	6,5	2	4	Adenoma
CB9	2.2	F	V/C	7,0	2	2	Adenoma
CB10	2.3	F	V	3,8	1	5	Adenoma
CB11	2.5	F	V	5,2	2	7	Adenoma
CB12	2.5	F	V	3,0	1	1	Adenoma
CB13	2.8	F	V	5,0	2	3	Adenoma
CM1	0.9	F	V	8,5	3	5	Carcinoma
CM2	2.6	M	V	6,0	3	7	Carcinoma
CM3	4.9	M	V	8,5	3	6	Carcinoma
CM4	6.0	F	V/C	7,0	2	7	Carcinoma
CM5	9.0	F	C/V	6,0	4	7	Carcinoma
CM6	15.0	F	V/C	20,0	4	7	Carcinoma
CM7	17.0	M	C/F	9,0	3	5	Carcinoma
CM8	17.0	F	V	15,0	2	4	Carcinoma

* V: Virilização; C: Síndrome de Cushing; V/C: síndrome mista (virilização+Cushing); F: Feminização; IN: "incidentaloma"

§ Estadiamento de acordo com a classificação de MacFarlane modificada por Sullivan

3.2 Avaliação da expressão dos genes *HMGCR*, *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1*, *HSD3B1*, *FDFT1*, *LDLR* e *SCARB1* em tumores adrenocorticais

3.2.1 RNA referência de supra-renais

Como referência para comparações de expressão gênica nos experimentos de PCR em tempo real, foi utilizado um pool comercial de RNA de glândulas do córtex adrenal de indivíduos normais. Este pool consiste em uma preparação comercial de RNA poli A (Clontech, Palo Alto, CA) proveniente de 62 indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 15 e 61 anos de idade. O pool é fornecido em suspensão alcoólica e, para o uso, uma alíquota deste preparado foi submetida à centrifugação para sedimentação do RNA precipitado. O “pellet” obtido foi lavado com etanol 75% e ressuspendido em água livre de RNase.

3.2.2 Extração de RNA dos tecidos tumorais

Todos os reagentes e soluções utilizados eram desprovidos de RNase. A atividade de RNase da água utilizada para o preparo das soluções foi eliminada pelo tratamento com dietilpirocarbonato (DEPC) na proporção final de 0,1% (v/v). Além disso, outros cuidados para se evitar a exposição à RNase foram tomados: tratamento da vidraria com calor seco (200°C por 4 horas), uso de luvas para manipulação do instrumental, emprego de preparado comercial apropriado (RNaseZap, Ambion, Austin TX) na limpeza

das cubas de eletroforese e do instrumental utilizado na homogeneização dos tecidos.

Amostras de tecido obtidas durante cirurgia foram coletadas em criotubos, congeladas e armazenados imediatamente em nitrogênio líquido sob condições estéreis até o momento de seu processamento. Para extração do RNA estas amostras foram trituradas em TRIZOL™ (Invitrogen, Carlsbad CA), na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido com auxílio de homogeneizador elétrico rotativo (Biospec Products, Bartlesville, OK). Os procedimentos subsequentes foram realizados conforme instrução fornecida pelo fabricante. A concentração e o grau de pureza do RNA foram estimados a partir da leitura da densidade ótica (DO) em espectrofotômetro. Considerou-se como satisfatória a relação 260nm/280nm na faixa de 1,8 a 2,0, medida em TE. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. Foram consideradas íntegras aquelas amostras que apresentaram as bandas ribossomais 18S e 28S intactas à visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídio. As amostras de RNA em solução aquosa foram conservadas a -80°C até o momento da utilização.

3.2.3 Síntese do cDNA

Cinco microgramas de RNA total foram reversamente transcritos utilizando-se *High-capacity cDNA Archive kit* (Applied Biosystems, Forster

City, CA, EUA) e oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) randômicos segundo instruções do fabricante do produto.

3.2.4 PCR em tempo real

A expressão do mRNA dos genes de interesse foi mensurado por RT-PCR em tempo real com o uso de ensaio *TaqMan* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA), oligonucleotídeos e sondas específicas para cada gene, e realizado no equipamento ABI 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A quantificação de cada um dos genes alvo (*StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1*, *HSD3B1*, *HMGCR*, *FDFT1*, *SCARB1* e *LDLR*) de cada amostra foi realizada em triplicata. Como controles endógenos foram utilizados os genes β -actina (*ACTB*), β -glucoronidase (*GUSB*) e ciclofilina (*PPIA*). A Tabela 3 apresenta os genes avaliados e a identificação de cada um dos ensaios. Para o ensaio ser utilizado a eficiência de amplificação foi maior que 90%. A quantificação relativa foi feita através do método *threshold cycle*, normalizado pela média geométrica da expressão dos três genes endógenos, pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$ conforme descrito por Livak ⁽¹³³⁾ em cada amostra estudada.

Tabela 3 - Ensaios utilizados para análise da expressão gênica

Gene	Identificação do ensaio (Applied Biosystems)
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1
<i>GUSB</i>	Hs00939627_m1
<i>PPIA</i>	Hs99999904_m1
<i>HMGCR</i>	Hs00168352_m1
<i>StAR</i>	Hs00264912_m1
<i>TSPO</i>	Hs00559362_m1
<i>CYP11A1</i>	Hs00167984_m1
<i>CYP11B1</i>	Hs01596404_m1
<i>CYP17A1</i>	Hs00164375_m1
<i>CYP21A1</i>	Hs00365734_m1
<i>HSD3B1</i>	Hs00426435_m1
<i>FDFT1</i>	Hs00926054_m1
<i>SCARB1</i>	Hs00194092_m1
<i>LDLR</i>	Hs00181192_m1

3.3 Avaliação dos efeitos de diferentes inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas em células NCI-H295A

3.3.1 Cultura de células

As células NCI-H295A, derivadas de tumor de córtex da supra-renal humana, foram utilizadas nos experimentos para averiguação do impacto da inibição de enzimas de vias de mevalonato por esta ser uma linhagem celular estabelecida e bem caracterizada e pela disponibilidade ilimitada de material. As células NCI-H295A são uma subpopulação aderente das células

NCI-H295⁽¹³⁴⁾ – uma linhagem estabelecida a partir de implantes peritoniais de um carcinoma do córtex adrenal humano, capaz de sintetizar vários esteróides^(135, 136). As células NCI-H295A foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino, insulina, transferrina, selênio e antibióticos a 37°C / 5%CO₂.

3.3.2 Avaliação do efeito da inibição da atividade da HMGCR na via das MAPK's

Para determinar se a inibição da atividade da HMGCR interfere na ativação de vias proliferativas, avaliamos o efeito do tratamento com lovastatina na fosforilação de ERK 1/2, que é o efetor final da via das MAPK's e é ativada por fosforilação em resíduos serina e treonina. Células NCI-H295A foram cultivadas em placas de 100 mm e após atingirem 80% de confluência, foram lavadas com PBS e incubadas por 24 horas com meio RPMI 1640 sem soro fetal nem outros componentes promotores de crescimento. Após o período de “jejum” (ausência suplementos promotores do crescimento) o meio foi substituído pelo meio RPMI 1640 suplementado com os aditivos utilizados normalmente (5% soro fetal bovino, insulina, transferrina, selênio e antibióticos) e as células tratadas com lovastatina nas concentrações de 1, 5, 10 e 100 µM. Após 24 horas o extrato protéico total foi obtido pelo tratamento das células com solução de lise (1% (v/v) Triton X-100, 150 mM NaCl, 10% (v/v) glicerol, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 100 mM NaF, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM ortovanadato de sódio, 10 mg/ml aprotinina).

As proteínas totais das células NCI-H295A foram submetidas à separação por eletroforese em gel de poliacrilamida e dodecilsulfato de sódio (*SDS-PAGE*) e na sequência transferidas do gel para uma membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF) com a utilização de sistema semi-seco. Antes da imuno-marcação da fração de proteína de interesse com anticorpo primário, a membrana foi bloqueada sequencialmente com leite desnatado 10% e com albumina sérica bovina (BSA) 3% por uma hora cada. Depois disso a membrana foi incubada um período de aproximadamente 16 horas com o anticorpo primário específico contra ERK 1/2 fosforilados nas tirosinas 202/204 (p-ERK1/2) (Invitrogen, EUA), diluído em BSA 1% na concentração final de 1:200. Após a incubação, a membrana foi lavada 3 vezes com PBS-T (80 mM Na₂HPO₄·2H₂O; 20 mM NaH₂PO₄, pH 7,50; 1M NaCl; 0,1% Tween 20) e incubada por mais uma hora com o anticorpo anti-IgG de coelho de macaco conjugado a peroxidase de rábano silvestre (GE, UK) diluído em PBS-T na concentração de final de 1:5000. O resultado foi detectado através do sistema de quimioluminescência ECL PlusTM Western blotting (Amershan Pharmacia, EUA) e as imagens geradas foram captadas pelo phosphorimager Storm 860 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) e analisadas pelo programa ImageQuant 5.2 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

A quantificação do conteúdo total de ERK1/2 (formas fosforiladas ou não fosforiladas) foi realizada por imunomarcação com anticorpos anti-ERK 1/2 (Invitrogen, EUA) na concentração final de 1:400 após a remoção dos anticorpos utilizados na detecção da ERK1/2 fosforilada. A intensidade da

fosforilação da ERK1/2 foi calculada como fração da ERK 1/2 total e os resultados apresentados como porcentagem de fosforilação em relação ao basal (células tratadas com SFB e ITS, na ausência de lovastatina).

3.3.3 Ensaio para determinação da viabilidade celular

Considerando que várias proteínas isopreniladas estão envolvidas em vias de proliferação e sobrevivência celular, o tratamento da linhagem NCI-H295A com inibidores da via do mevalonato pode diminuir a viabilidade celular através da inativação da isoprenilação das proteínas (Tabela 4). Para determinação da viabilidade celular utilizamos o ensaio colorimétrico CellTiter 96 (Promega, Madison, WI, USA). O reagente deste ensaio é formado por uma combinação de um composto de tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio; MTS) e outro reagente de acoplamento de elétrons (fenazina etossulfato, PES). A redução do sal de tetrazólio, de cor amarela, é mediada por NADPH ou NADH produzido pelas desidrogenases da atividade metabólica das células. Esta redução produz o formazan, de cor azul, cuja intensidade pode ser medida pela absorbância a 490 nm. O número de células viáveis é diretamente proporcional à atividade das desidrogenases na amostra ⁽¹³⁷⁾.

Tabela 4 - Inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas utilizados e suas enzimas alvo

<i>Inibidor</i>	<i>Marca</i>	<i>Enzima alvo</i>	<i>Número de classificação da enzima alvo (EC)</i>	<i>Estrutura molecular</i>
Lovastatina sódica	Calbiochem (San Diego, CA, EUA)	HMGCR	1.1.1.88
Sinvastatina sódica	Calbiochem (San Diego, CA, EUA)	HMGCR	1.1.1.88
Alendronato de sódio	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	Farnesil - sintase	2.5.1.10
Ácido Zaragóxico A	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	FDFT1 ou SQS	2.5.1.21
FTI-277	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	FTase	2.5.1.58
L744,382	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	FTase	2.5.1.58
Álcool perílico	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	FTase, GGTase I e GGTase II	2.5.1.58
GGTI-2133	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	GGTase I	2.5.1.59
GGTI-298	Sigma-Aldrich (St Louis, MO, EUA)	GGTase I	2.5.1.59

As células NCI-H295A foram cultivadas a uma densidade de 20×10^3 células por poço (placas de 96 poços) e tratadas com diversos inibidores da via do mevalonato (Tabela 4) nas concentrações de 1 a 100 μM por 24, 48, 72 e 96 horas. Ao fim de cada período, as células foram incubadas com reagente CellTiter 96 (20 μL /poço) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por até 4 horas. A absorbância a 490 nm foi realizada utilizando o leitor de placa MRX (Dynex Technologies Inc., Chantilly, UK). A proporção de células viáveis foi calculada utilizando a fórmula: [(média da absorbância das células tratadas/média da absorbância das células não tratadas) x 100]. Os experimentos foram realizados em triplicata.

3.4 Análises estatísticas

A normalidade da distribuição das medidas de intensidade de expressão gênica foi verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A expressão entre os grupos de estudo dos genes que apresentam distribuição normal foi feita utilizando o teste t de Student. O teste de Wilcoxon foi utilizado nas comparações em que o teste de Shapiro-Wilk não suporta a hipótese da normalidade de distribuição das intensidades expressão do gene analisado. O controle do erro das múltiplas comparações foi feito controlando a taxa de falso descobrimento (FDR) visto que é um ajuste menos conservador do que os procedimentos de controle de taxas de erro. A FDR escolhida foi 0,2.

Para comparação da expressão gênica foram considerados como estatisticamente significante valores de $P < 0,02$. A correlação entre as expressões dos genes estudados foi feita com o teste de correlação de Spearman. Considerou-se correlação estatisticamente significativa quando o valor do p obtido pelo teste de correlação foi menor ou igual ao 0,05.

Além da inferência comparativa dos dados de expressão gênica foram realizados também estudos de descobrimento de classes e de predição de classe. Os métodos de descobrimento de classes são procedimentos exploratórios que têm como objetivo visualizar a estrutura presente nos dados em questão (perfil de expressão do conjunto de genes em cada amostra ou o comportamento das amostras quando cada um dos genes é considerado) permitindo ao pesquisador verificar a partição destes dados (o número e a composição das classes que estão presentes). Utilizamos a análise de componente principal (*principal component analysis*, PCA) e a análise de grupamento hierárquico (*hierarchical cluster analysis*) para identificar as partições dos nossos dados.

A análise de componente principal é um procedimento estatístico que visa reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados no qual existe um grande número de variáveis correlatas, enquanto se retém o máximo possível da variação presente nestes dados. Em outras palavras, esta técnica tenta representar em poucas dimensões um conjunto de dado que é multidimensional por natureza. Esta redução da dimensionalidade facilita inspecção da estrutura de dados e descobrimento das classes neles embutidas. Os genes utilizados na PCA são aqueles considerados

diferencialmente expressos nos testes de comparação de grupos (teste t de Student e teste de Wilcoxon) e foi realizada utilizando como base a matriz de covariância e um algoritmo que realiza a decomposição de valor singular da matriz.

Tanto PCA como análise de agrupamentos foram feitos com auxílio do ambiente estatístico R. Os cálculos foram feitos com a utilização das rotinas pré-definidas desta linguagem de programação.

4 Resultados

4.1 Expressão dos genes *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1*, *HSD3B1*, *FDFT1*, *HMGCR*, *StAR*, *TSPO*, *SCARB1* e *LDLR* em tumores adrenocorticais

Experimentos prévios realizados em nosso laboratório detectaram a hiperexpressão do gene *HMGCR* nas células NCI-H295A e um espécime de carcinoma adrenocortical ⁽⁵⁹⁾. Este achado, em conjunto com dados da literatura obtidos em experimentos de *microarray* que demonstram a hipoexpressão de genes relacionados à esteroidogênese ⁽⁶⁷⁾ nos motivou a verificar se a expressão de genes esteroidogênicos e de genes relacionados à síntese e captação de colesterol esta associada ao comportamento biológico de tumores adrenocorticais. Com este propósito avaliamos a expressão dos genes envolvidos na síntese e captação de colesterol: *HMGCR*, *FDFT1*, *LDLR* e *SCARB1*, esteroidogênese adrenal: *StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1* e *CYP21A2* e a enzima *HSD3B1* (diferencialmente expressa em carcinomas adrenocorticais em estudo prévio) ⁽⁶⁷⁾ através de PCR em tempo real em 46 espécimes tumorais.

Na avaliação da expressão gênica por PCR em tempo real, os tumores adrenocorticais hiperexpressaram *HMGCR*. Comparados ao pool calibrador, 64% (7/11) dos carcinomas apresentaram hiperexpressão da *HMGCR*, enquanto que 6 de 14 amostras (43%) de adenomas adrenocorticais apresentaram hiperexpressão de *HMGCR* (Tabela 5).

FDFT1, que codifica a enzima responsável por direcionar os produtos da via do mevalonato para a biossíntese de colesterol, é hipoexpressa nos adenomas adrenocorticais do grupo adulto (11/14) e em menor grau nos carcinomas (6/11) (Tabela 5). Já a expressão do gene *LDLR* foi variável, mas a maioria dos carcinomas (8/11) e quase metade dos adenomas (6/13) apresentaram expressão semelhante ao calibrador (Tabela 5). *SCARB1* - o gene que codifica o receptor de HDL, também denominado SR-BI - estava hipoexpresso tanto em tumores benignos quanto em malignos do grupo adulto (Tabela 5). Comparado com os adenomas, os carcinomas adrenocorticais do grupo adulto apresentaram hipoexpressão sistemática dos genes envolvidos na esteroidogênese (*StAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP17A1*, *CYP21A2* e *HSD3B1*) (Tabela 5). As discrepâncias nas frequências de amostras com hipoexpressão desses genes nos carcinomas em comparação com os adenomas ficam evidente na Tabela 5.

Visto que os nossos dados foram gerados utilizando um pool de RNA proveniente de adrenais normais de adultos (15 a 61 anos) como amostra de referência, não é prudente tirar quaisquer conclusões sobre a expressão gênica em neoplasias adrenocorticais do grupo pediátrico. Contudo, pode-se notar, que os tumores adrenocorticais benignos e malignos do grupo pediátrico apresentaram hiperexpressão do gene da *HMGCR* em comparação ao pool calibrador (Tabela 5). Os tumores benignos e malignos grupo pediátrico exibiram frequências muito semelhantes de amostras onde a hipoexpressão de genes envolvidos na esteroidogênese estava presente (Tabela 5).

Tabela 5 - Status da expressão dos genes estudados nos tumores adrenocorticais

Gene	Grupo adulto								Grupo pediátrico							
	Adenoma				Carcinoma				Adenoma				Carcinoma			
	N	↑	↓	↔	N	↑	↓	↔	N	↑	↓	↔	N	↑	↓	↔
<i>HMGR</i>	14	6	1	7	11	7	1	3	13	13	0	0	8	6	0	2
<i>FDFT1</i>	14	0	11	3	11	1	6	4	13	3	2	8	6	3	1	2
<i>LDLR</i>	13	2	5	6	11	1	2	8	13	2	0	11	6	0	2	4
<i>SCARB1</i>	14	0	10	4	11	0	10	1	13	0	11	2	6	0	6	0
<i>StAR</i>	14	1	2	11	11	0	9	2	13	0	9	4	8	0	5	3
<i>TSP0</i>	14	3	1	10	11	0	8	3	13	0	12	1	8	0	7	1
<i>CYP11A1</i>	14	0	7	7	11	0	9	2	13	0	9	4	7	0	6	1
<i>CYP11B1</i>	14	0	10	4	11	0	11	0	13	0	13	0	8	0	8	0
<i>CYP17A1</i>	14	0	6	8	11	0	9	2	13	0	11	2	7	1	5	1
<i>CYP21A2</i>	14	0	6	8	11	0	11	0	13	0	12	1	7	0	6	1
<i>HSD3B1</i>	14	0	4	10	11	0	10	1	13	0	13	0	6	0	4	2

Número de amostras de cada grupo que hiperexpressam ($RQ > 2,000$), hipoexpressam ($RQ \leq 0.500$) ou não apresentam diferença de expressão ($0.500 < RQ < 2.000$) nos genes estudados quando comparadas com pool de RNA controle proveniente de 62 adrenais normais de adultos.

N: número de amostras testadas; ↑: hiperexpressão; ↓: hipoexpressão; ↔: não houve diferença de expressão.

Uma vez que os carcinomas e adenomas adrenocorticais do grupo adulto diferem com relação à frequência de hiper/hipoexpressão em vários genes estudados, os dados de expressão dos 11 genes analisados em ambos os grupos etários (adulto e pediátrico) foram comparados (Tabela 6). Não foram observadas diferenças de expressão dos genes envolvidos na biossíntese e captação de colesterol nos tumores do grupo adulto (Tabela 6,

Figuras 5 e 6). Apesar da hiperexpressão da *HMGCR* ser mais frequente nos carcinomas, e a RQ mediana dos carcinomas (3,683) é praticamente o dobro da RQ mediana dos adenomas (1,717), não foi observada diferença de expressão em comparação com os adenomas. Em contrapartida, dos sete genes envolvidos na esteroidogênese cinco (*StAR*, *TSPO*, *CYP11B1*, *CYP21A2* e *HSD3B1*) são diferencialmente expressos de forma estatisticamente significativa, mesmo após controle de FDR (Tabela 6, Figuras 5 e 6).

Em relação aos tumores adrenocorticais do grupo pediátrico, nenhum dos genes estudados apresentou diferença de expressão entre os carcinomas e adenomas (Tabela 6, Figuras 7 e 8). Embora a análise univariada tenha detectado diferença de expressão do gene *LDLR*, esta diferença não foi considerada estatisticamente significativa após ajuste para testes múltiplos. Portanto a hipoeexpressão dos genes envolvidos na esteroidogênese parece ser um fenômeno restrito aos carcinomas adrenocorticais do grupo adulto.

Tabela 6 - Análise comparativa da expressão dos genes estudados nos tumores adrenocorticais

Gene	Grupo adulto			Grupo pediátrico		
	Adenoma	Carcinoma	P	Adenoma	Carcinoma	P
	Mediana/IQR	Mediana/IQR		Mediana/IQR	Mediana/IQR	
<i>HMGCR</i>	1.717/1.015	3.683/3.416	0.120	5.578/1.736	3.953/2.127	0.161
<i>FDFT1</i>	0.291/0.265	0.444/0.475	0.403	1.324/1.096	1.649/2.009	0.744
<i>LDLR</i>	0.763/0.905	0.912/0.748	0.572	1.096/0.673	0.914/0.590	0.019Ω
<i>SCARB1</i>	0.407/0.319	0.136/0.234	0.051	0.299/0.044	0.257/0.203	0.103
<i>StAR</i>	0.877/0.357	0.441/0.216	0.004	0.356/0.277	0.339/0.446	0.750
<i>TSPO</i>	1.012/0.629	0.285/0.404	0.001	0.266/0.111	0.302/0.235	0.860
<i>CYP11A1</i>	0.564/0.521	0.290/0.151	0.051	0.393/0.247	0.350/0.249	0.103
<i>CYP11B1</i>	0.320/0.293	0.025/0.110	0.001	0.127/0.096	0.085/0.11	0.310
<i>CYP17A1</i>	0.594/0.519	0.266/0.312	0.058	0.336/0.163	0.344/0.145	0.972
<i>CYP21A2</i>	0.571/0.420	0.175/0.118	0.008	0.147/0.130	0.227/0.249	0.700
<i>HSD3B1</i>	0.669/0.273	0.073/0.121	<0.001	0.059/0.183	0.124/0.445	0.744

Dados de expressão obtidos por PCR em tempo real foram utilizados para comparação dos diferentes grupos. Ajuste para testes múltiplos foi realizado através do controle da taxa de falso descobrimento (FDR) a 2% pelo método de Benjamini e Hochberg.

IQR: intervalo interquartil; Ω: resultado estatisticamente não significativo após controle de FDR.

Expressão relativa dos genes envolvidos na síntese e captação de colesterol e reguladores da esteroidogênese nos tumores adrenocorticais de adultos

Figura 5 - Resultados de expressões relativas obtidas por PCR em tempo real dos genes *HMGCR*, *FDFT1*, *StAR*, *TSPO*, *LDLR* e *SCARB1* no grupo de tumores adrenocorticais adultos. Houve diferença de expressão dos genes *StAR* e *TSPO* entre adenomas e carcinomas ($p < 0,02$) neste grupo de tumores

Expressão relativa dos genes das enzimas esteroidogênicas nos tumores adrenocorticais de adultos

Figura 6 - Resultados de expressões relativas obtidas por PCR em tempo real dos genes envolvidos na esteroidogênese *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A2* e *HSD3B1* no grupo de tumores adrenocorticais adultos. Houve diferença de expressão dos genes *CYP11B1*, *CYP21A2* e *HSD3B1* entre adenomas e carcinomas ($p < 0,02$) neste grupo de tumores

Expressão relativa dos genes envolvidos na síntese e captação de colesterol e reguladores da esteroidogênese nos tumores adrenocorticais de crianças

Figura 7 - Resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes *HMGCR*, *FDFT1*, *StAR*, *TSPO*, *LDLR* e *SCARB1* no grupo de tumores adrenocorticais adultos. Não houve diferença de expressão entre adenomas e carcinomas neste grupo de tumores ($p > 0,02$)

Expressão relativa dos genes envolvidos na esteroidogênese nos tumores adrenocorticais de crianças

Figura 8 - Resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes envolvidos na esteroidogênese *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A2* e *HSD3B1* no grupo de tumores adrenocorticais pediátrico. Não houve diferença de expressão entre adenomas e carcinomas neste grupo de tumores ($p > 0,02$)

Figura 9 - Análise de componente principal dos tumores adrenocorticais do grupo adulto. Representação bidimensional onde três agrupamentos são visíveis. O primeiro grupo é composto por uma amostra de carcinoma (AM10) e três tumores benignos (AB2, AB3, BA5). O segundo grupo abriga todos os restantes 10 carcinomas e 8 adenomas. Enquanto um terceiro grupo é formado por três adenomas (AB10, AB11, AB13)

Em seguida, verificamos através da análise de componente principal se a expressão dos genes esteroidogênicos diferencia os tumores malignos de benignos de adultos. Como os dois primeiros componentes respondem por 85,4% da variabilidade observada, a relação das neoplasias córtex adrenal de adultos quanto à expressão de genes esteroidogênicos poderiam

ser satisfatoriamente representados por estes dois componentes principais (Figura 9). Nesta representação bidimensional três agrupamentos são claramente visíveis (Figura 9). O primeiro grupo é composto por uma amostra de carcinoma (AM10) e três tumores benignos (AB2, AB3, AB5). O segundo grupo abriga os 10 carcinomas restantes e 8 adenomas (Figura 9), enquanto um terceiro grupo é formado por três adenomas (AB10, AB11, AB13) (Figura 9).

Figura 10 - Análise cluster dos tumores adrenocorticais do grupo adulto. Com exceção das amostras AM10 e AM12, todas as amostras de carcinoma estão agrupadas em um mesmo cluster

A análise de cluster também foi realizada para detectar a relação entre os espécimes de neoplasia adrenocorticais do grupo adulto. Os

carcinomas, com exceção da amostra AM10 foram agrupados em um mesmo cluster, sugerindo a existência de uma assinatura de identificação da expressão de genes esteroideogênicos especificamente relacionados a tumores malignos adrenocorticais do grupo adulto (Figura 10).

Tabela 7 - Matriz de correlação entre a expressão dos diferentes genes no grupo de tumores adrenocorticais adulto

		<i>TSPO</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>StAR</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>CYP17A1</i>	<i>CYP11A1</i>	<i>HSD3B1</i>	<i>SCARB1</i>	<i>LDLR</i>	<i>FDFT1</i>
<i>HMGCR</i>	r	-0.424	-0.016	0.126	0.191	0.342	0.344	-0.031	0.497	0.818	0.513
	p	0.035*	0.937	0.544	0.357	0.093	0.091	0.882	0.012*	0.000*	0.009*
<i>TSPO</i>	r		0.478	0.374	0.046	0.112	0.002	0.333	0.092	-0.337	-0.161
	p		0.016*	0.065	0.824	0.592	0.990	0.102	0.657	0.106	0.438
<i>CYP11B1</i>	r			0.478	0.554	0.560	0.408	0.619	0.593	0.187	0.052
	p			0.016*	0.004*	0.004*	0.043*	0.000*	0.002*	0.377	0.804
<i>StAR</i>	r				0.698	0.697	0.735	0.449	0.652	0.151	0.020
	p				0.000*	0.000*	0.000*	0.024*	0.000*	0.476	0.922
<i>CYP21A2</i>	r					0.741	0.817	0.704	0.716	0.448	0.247
	p					0.000*	0.000*	0.000*	0.000*	0.028*	0.231
<i>CYP17A1</i>	r						0.813	0.509	0.671	0.467	0.215
	p						0.000*	0.010*	0.000*	0.022*	0.297
<i>CYP11A1</i>	r							0.432	0.735	0.400	0.116
	p							0.031*	0.000*	0.052	0.576
<i>HSD3B1</i>	r								0.377	0.378	0.024
	p								0.063	0.068	0.908
<i>SCARB1</i>	r									0.524	0.221
	p									0.009*	0.285
<i>LDLR</i>	r										0.455
	p										0.026*

*: resultados estatisticamente significantes

Como os produtos da via do mevalonato são participantes chave em vários processos celulares, examinamos como a expressão de enzimas

envolvidas na síntese de colesterol e esteroidogênese, além de genes envolvidos na captação de colesterol se correlacionam com a expressão da *HMGCR*. Se uma interação sinérgica entre *HMGCR* e alguns dos genes estudados conferir vantagem seletiva para as neoplasias adrenocorticais então a expressão de enzimas desta via se correlacionaria positivamente com a expressão de *HMGCR*. Por outro lado, uma correlação negativa entre *HMGCR* e um destes genes seria de prever que não há qualquer vantagem seletiva para a via de que este gene faz parte.

Através do teste de correlação *Spearman* foi observada uma correlação positiva entre a expressão dos genes *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP21A2*, *CYP17A1*, *HSD3B1* e *StAR* ($p < 0,05$) no grupo de tumores de adultos, ou seja, estes genes tendem a apresentar o mesmo padrão de expressão (no grupo dos carcinomas todos estavam hipoexpressos) (Tabela 7). A expressão do gene *HMGCR* se correlacionou positivamente com a expressão dos genes *FDFT1*, *SCARB1* e *LDLR* ($p < 0,05$) (Tabela 7). Também foi observada uma correlação positiva entre a expressão do gene *LDLR* com os genes *FDFT1*, *SCARB1*, *CYP21A2* e *CYP17A1*. Interessantemente, este teste detectou uma correlação inversa entre a expressão de *HMGCR* e *TSPO* ($p < 0,05$), ou seja, quanto maior a expressão do gene *HMGCR* uma menor expressão do gene *TSPO* foi observada (Tabela 7). Nota-se que, com exceção de dois tumores, há uma clara separação dos carcinomas e adenomas quando a expressão destes dois genes é representada em um gráfico de correlação linear (Figura 11). Os

adenomas apresentaram maior expressão do *TSPO* e menor expressão da *HMGCR* em relação aos carcinomas.

Figura 11 - Correlação dos resultados de expressão relativa obtidas por PCR em tempo real dos genes *HMGCR* e *TSPO* nos tumores adrenocorticais do grupo adulto. A linha verde separa os dois grupos, do lado esquerdo grupo de adenomas com menor expressão do gene *HMGCR* e maior expressão do gene *TSPO* e do lado direito o grupo dos carcinomas que apresentam comportamento inverso

No grupo pediátrico, o teste de correlação *Spearman* detectou correlação positiva entre *HMGCR* e *CYP11A1*; *HMGCR* e *SCARB1*; *HMGCR* e *LDLR*; *StAR* e *CYP11A1*; *StAR* e *CYP17A1*; *CYP11B1* e *SCARB1* ($p < 0,05$) (Tabela 8). Este teste também detectou uma correlação inversa entre a expressão de *HSD3B1* e *CYP11A1*; *HSD3B1* e *CYP17A1* ($p < 0,05$) (Tabela 8).

Tabela 8 - Matriz de correlação entre a expressão dos diferentes genes no grupo de tumores adrenocorticais pediátrico

		<i>TSPO</i>	<i>CYP11B1</i>	<i>StAR</i>	<i>CYP21A2</i>	<i>CYP17A1</i>	<i>CYP11A1</i>	<i>HSD3B1</i>	<i>SCARB1</i>	<i>LDLR</i>	<i>FDFT1</i>
<i>HMGR</i>	r	-0.357	0.224	0.081	-0.101	0.480	0.290	-0.425	0.478	0.472	0.174
	p	0.110	0.322	0.724	0.667	0.032*	0.210	0.069	0.037*	0.041*	0.470
<i>TSPO</i>	r		0.284	-0.192	-0.098	-0.147	-0.354	0.237	-0.140	0.158	0.381
	p		0.208	0.398	0.676	0.529	0.124	0.323	0.560	0.512	0.105
<i>CYP11B1</i>	r			0.257	-0.005	-0.071	0.010	0.267	0.564	0.405	0.368
	p			0.256	0.977	0.762	0.962	0.264	0.012*	0.083	0.118
<i>StAR</i>	r				-0.119	0.513	0.563	-0.384	-0.204	0.083	0.560
	p				0.612	0.021*	0.010*	0.102	0.397	0.732	0.013
<i>CYP21A2</i>	r					-0.047	0.008	0.179	0.029	0.130	-0.439
	p					0.841	0.972	0.457	0.900	0.590	0.059
<i>CYP17A1</i>	r						0.422	-0.546	-0.084	0.211	0.400
	p						0.062	0.016*	0.726	0.381	0.088
<i>CYP11A1</i>	r							-0.689	0.137	-0.097	0.314
	p							0.000*	0.570	0.683	0.186
<i>HSD3B1</i>	r								-0.004	0.004	-0.282
	p								0.980	0.986	0.236
<i>SCARB1</i>	r									0.285	0.005
	p									0.230	0.980
<i>LDLR</i>	r										-0.002
	p										0.991

*: resultados estatisticamente significantes

4.2 Avaliação dos efeitos de diferentes inibidores da via do mevalonato e de isoprenilação de proteínas em células NCI-H295A

A fim de verificar o efeito na viabilidade celular após o bloqueio de diversos pontos da via do mevalonato, determinamos a viabilidade celular após tratamento com diferentes inibidores da via do mevalonato. O tratamento até 100 μM dos inibidores da HMGR, sinvastatina ($\text{DL}_{50} = 50 \mu\text{M}$) e lovastatina ($\text{DL}_{50} = 59 \mu\text{M}$), levou a diminuição da viabilidade celular em até 46% após 96 h indicando que a viabilidade de células NCI-H295A é dependente da atividade da HMGR (Figura 12). A inibição da farnesil sintase pelo alendronato de sódio ($\text{DL}_{50} = 323 \mu\text{M}$) também diminui, em menor grau ($\text{DL}_{50} \sim 6$ vezes maior que estatinas), a viabilidade das células NCI-H295A em até 60% (Figura 12).

Figura 12 - Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da HMGCR pelas drogas simvastatina (A) e lovastatina (B) e a inibição da farnesil sintase pelo alendronato de sódio (C). Há diminuição em até 46% da viabilidade celular no tratamento com 100 μM destes inibidores

Para comprovar que o bloqueio da HMGCR inibe vias de proliferação celular após tratamento com lovastatina, realizamos *Western blot* para avaliar a fosforilação de ERK 1/2 (importante mediador de ação de fatores de crescimento como IGF1). Verificamos que a fosforilação de ERK 1/2 foi inibida em mais de 80% indicando que o bloqueio da atividade da HMGCR diminui a ativação de vias proliferativas, sendo uma das causas da redução da viabilidade celular (Figura 13).

A **B**

Figura 13 - Fosforilação de ERK1/2 após tratamento por 24 horas com inibidor da HMGCR - lovastatina - em diversas concentrações na linhagem NCI-H295A. **A:** Foto representativa do *imunoblot* da fosforilação de ERK1/2. **B:** Representação da porcentagem de fosforilação da proteína ERK1/2 em relação ao basal (2%SFB/ITS)

Para determinar como a via do mevalonato afeta a viabilidade das células NCI-H295A bloqueamos especificamente a síntese de colesterol (inibição da FDFT1 ou SQS) com ácido zaragózico. O bloqueio da produção

endógena de colesterol, sem afetar a produção dos intermediários isoprenoídes, não afetou a viabilidade das células NCI-H295A ($DL_{50} = 1,2 \times 10^6 \mu M$) (Figura 14).

Figura 14 - Representação dos resultados do ensaio de viabilidade celular após inibição da esqualeno sintase (FDFT1) pelo ácido zaragózico A. Mesmo em altas doses (100 μM) a redução máxima da viabilidade foi de 15%

Em contraste, quando bloqueamos especificamente a isoprenilação de proteínas através do tratamento de inibidores específicos da farnesilação de proteínas [FTI-277 ($DL_{50} = 45 \mu M$), L744,382 ($DL_{50} = 31 \mu M$); Figura 15], inibidores específicos da geranilgeranilação de proteínas [GGTI-298 ($DL_{50} = 19 \mu M$) e GGTI2133 ($DL_{50} = 56 \mu M$); Figura 16] e inibidor tanto da farnesilação e geranilgeranilação de proteínas [álcool perilíco ($DL_{50} = 0,043\%$); Figura 17] detectamos redução significativa da viabilidade celular.

Figura 15 - Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da farnesil transferase pelas drogas FTI-277 (A), L744,382 (B). Há diminuição de mais de 60% da viabilidade celular no tratamento com altas concentrações (100 μM) destes inibidores

Figura 16 - Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da geranilgeranil transferase tipo I pelas drogas GGTI-298 (A) e GGTI-2133 (B). Há diminuição da viabilidade celular de mais de 50% no tratamento com altas concentrações (100 μM) destes inibidores

Figura 17 - Representação dos resultados dos ensaios de viabilidade celular após inibição da FTase, GGTase I e GGTase II pelo álcool perílico. Há diminuição da viabilidade celular de mais de 50% no tratamento com altas concentrações (1%) deste inibidor

5 Discussão

O desenvolvimento de um tratamento não cirúrgico eficiente para carcinoma de córtex supra-renal encontra diversas barreiras até agora não transpostas. A primeira barreira é a capacidade de separar, de maneira confiável, os pacientes que vão evoluir desfavoravelmente daqueles que vão apresentar uma evolução favorável. Essa discriminação é fundamental, pois a definição da eficácia de um plano de tratamento passa necessariamente pela identificação dos pacientes que dele precisa. A segunda barreira é a inexistência de alvos específicos que, quando submetidos à ação de compostos químicos, produzam o máximo de dano aos tecidos neoplásicos sem produzir efeitos tóxicos excessivos a tecidos saudáveis. Por esta razão investigações sobre detalhes de fisiologia das células de carcinomas adrenocorticais é de importância fundamental.

A HMGCR é a enzima controladora da via de biossíntese do colesterol ⁽⁸²⁾. Esta via produz vários intermediários que são fundamentais para diversos processos celulares ⁽⁸²⁾. O produto final desta via é o colesterol, esteroide predominante da membrana celular (essencial para sua integridade e fluidez), importante na sinalização celular e regulação do crescimento de células eucarióticas ⁽⁸³⁾ e, em células esteroideogênicas, é substrato para produção dos diversos hormônios esteróides ⁽⁹¹⁾. Evidências sugerem que tanto em estágios pré-malignos quanto malignos há perda do controle por retroalimentação da via do mevalonato ⁽⁸³⁾. A atividade da

HMGCR em células leucêmicas e de carcinoma de pulmão está 3-8 vezes e 2 vezes aumentada ⁽¹³⁸⁻¹⁴⁰⁾, respectivamente, em relação às células normais. Uma alta atividade de HMGCR é um fenômeno esperado para os tumores adrenocorticais devido à atividade esteroidogênica do tecido de origem, entretanto seu papel no comportamento biológico dos tumores adrenocorticais é desconhecido. Ampliamos neste estudo o achado inicial do nosso grupo obtido por *differential display* ⁽⁵⁹⁾ e demonstramos que as neoplasias adrenocorticais expressam mais *HMGCR* do que córtex adrenal não neoplásico. A detecção do aumento da expressão do gene *HMGCR* nos tumores adrenocorticais sugere que a via do mevalonato é um processo relevante na biologia destes tumores.

A análise da expressão de genes de componentes das vias de esteroidogênese adrenal permitiu que inferências fossem feitas com relação se o aumento da expressão da *HMGCR* nas neoplasias adrenocorticais está relacionado à esteroidogênese. O colesterol é transportado da OMM para IMM pela ação das proteínas StAR e TSPO ⁽¹⁴¹⁾. Na mitocôndria ocorre a etapa limitante da esteroidogênese que é a conversão do colesterol a pregnenolona através da ação do P450_{scc} ⁽¹⁴¹⁾. Assim, a análise de expressão destes genes e dos genes das enzimas esteroidogênicas *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* permitem examinar o *status* de pontos críticos da esteroidogênese. Os carcinomas adrecorticais apresentaram menor expressão dos genes *TSPO*, *StAR*, *CYP11B1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* do que os adenomas de forma significativa, como já observado anteriormente ⁽⁶⁷⁾. A análise de *cluster* detectou uma relação

entre carcinomas adrenocorticais do grupo adulto. Os carcinomas, com exceção da amostra AM10 foram agrupados em um mesmo *cluster*, sugerindo a existência de uma assinatura de identificação da expressão de genes esteroidogênicos especificamente relacionados a tumores malignos adrenocorticais do grupo adulto. Assim, a hipoexpressão de genes relacionados à esteroidogênese e (em menor grau) a hiperexpressão da *HMGCR* caracterizam o carcinoma adrenocortical do grupo adulto. Além disto, a expressão dos genes *STAR*, *TSPO*, *CYP11A1*, *CYP11B1*, *CYP17A1*, *CYP21A1* e *HSD3B1* se correlacionou positivamente entre si, ou seja quando um destes genes tende a ser hipoexpresso os outros apresentam a mesma tendência. Interessantemente, a expressão dos genes *HMGCR* e *TSPO* se correlacionou inversamente. Visto que *TSPO* e *StAR* fazem parte de um complexo de múltiplas proteínas envolvidas na translocação de colesterol na mitocôndria, podemos inferir que há uma relação antagônica entre o aumento da expressão da *HMGCR* e a esteroidogênese. Além disso, o gene *FDFT1*, que codifica a enzima que compromete irreversivelmente os produtos da via do mevalonato para produção de colesterol, estava hipoexpresso em grande parte dos tumores do grupo adulto, a despeito da correlação positiva com a expressão da *HMGCR*. Estes dados sugerem que a consequência funcional da hiperexpressão da *HMGCR* provavelmente não está relacionada à produção de colesterol e/ou à atividade esteroidogênica nos tumores do grupo adulto. O que dá sustentação à hipótese de que o aumento da atividade via do mevalonato privilegia a produção de isoprenoídes.

Como já mencionado, no córtex adrenal, além da produção endógena, a captação de colesterol transportado pelas lipoproteínas também contribui para formação da reserva intracelular do mesmo ⁽⁹¹⁾. Nas nossas amostras a expressão do *LDLR* se correlacionou positivamente com a expressão *HMGCR*. O gene *SCARB1* estava hipoexpresso nos tumores adrenocorticais. Entretanto, como o LDL é a principal fonte de colesterol das células do córtex adrenal ⁽⁹¹⁾ e a expressão do LDLR foi semelhante ao pool calibrador adulto (principalmente nos carcinomas) podemos concluir que o aporte de colesterol está preservado na maioria destes tumores. Dessa forma, podemos dizer que o desvio na via do mevalonato para produção de isoprenoídes não interfere de maneira relevante a capacidade de síntese de esteróides das neoplasias adrenocorticais de adultos.

Com relação ao grupo pediátrico não foi possível chegarmos a muitas conclusões, como já dito acima, o calibrador utilizado para análise de expressão é proveniente de pool de adrenal normal adulto e não houve diferença de expressão entre adenomas e carcinomas deste grupo.

O tratamento das células NCI-H295A com estatinas provocou redução, dose e tempo dependente, da viabilidade celular. O bloqueio da via do mevalonato num outro ponto – produção de isoprenóides – através da inibição da farnesil sintase com alendronato de sódio também reduziu de maneira apreciável a viabilidade celular após 96 horas de incubação. Com base nesses resultados fica claro que a viabilidade das células NCI-H295A é dependente da atividade da via do mevalonato. Esta dependência pode ser atribuída ao envolvimento (direto ou indireto) da via de mevalonato nas vias

de proliferação e sobrevivência celulares como pode ser demonstrado pela inibição da fosforilação de ERK 1/2 (efetor final da via das MAPKs) pela lovastatina de forma dose-dependente. Este efeito da lovastatina evidencia o acoplamento de uma via primariamente metabólica com uma via fundamental para proliferação celular nas células de tumor do córtex adrenal.

O bloqueio da biossíntese de colesterol com ácido zaragózico não afetou a viabilidade das células NCI-H295A indicando que a produção de colesterol endógena não é essencial para proliferação destas células. Em contraste, o bloqueio específico da isoprenilação de proteínas através do tratamento de inibidores da FTase (FTI-277, L744,382), da GGTase I (GGTI-298 e GGTI-2133) e de FTase, GGTase I e GGTase II (álcool perílico) reduziu drasticamente a viabilidade celular. Estes resultados nos permitem dizer que o papel da via do mevalonato na regulação da proliferação das células NCI-H295A é fornecer substratos para isoprenilação de proteínas que tem papel fundamental em vias de proliferação e sobrevivência celular, como por exemplo, as pequenas GTPases como Ras e Rho entre outras. Estas informações indicam que esta via é um ponto de vulnerabilidade das neoplasias adrenocorticais. Numa neoplasia em que inexiste terapêutica específica comprovadamente eficaz, a descoberta de uma via fundamental para a viabilidade de suas células que é passível de bloqueio por compostos que já se encontram em ensaios clínicos preliminares é um importante passo para alterar esta realidade.

Portanto, a partir de nossos dados podemos inferir que o aumento da expressão da HMGCR representa uma adaptação metabólica das células do tumor adrenocortical para o aumento da produção de isoprenoídes resultando no aumento da isoprenilação de proteínas e privilegiando a sinalização de vias de proliferação e sobrevivência celular em detrimento da produção de colesterol (Figura 18). Esta adaptação metabólica é provavelmente essencial na determinação do comportamento biológico destes tumores.

Figura 18 - Esquema representativo do papel da via do mevalonato nas neoplasias adrenocorticais

6 Conclusões

1. Observamos o aumento da expressão do gene da *HMGCR* e hipoexpressão dos genes *FDFT1* e *SCARB1* nos tumores adrenocorticais adultos.
2. Em adultos, a hipoexpressão de genes relacionados à esteroidogênese (*StAR*, *TSP0*, *CYP11B1*, *CYP21A1* e *HSD3B1*) e (em menor grau) a hiperexpressão da *HMGCR* caracterizam o carcinoma adrenocortical.
3. Não é prudente tirar quaisquer conclusões sobre a expressão gênica em neoplasias adrenocorticais do grupo pediátrico, pois nossos dados foram gerados utilizando um pool de RNA proveniente de adrenais normais de adultos como amostra de referência e não houve diferença de expressão entre carcinomas e adenomas deste grupo.
4. A hiperexpressão da *HMGCR* e consequente aumento da atividade da via do mevalonato não está associado à produção de colesterol e nem a esteroidogênese uma vez que reguladores e enzimas participantes estão hipoexpressas nos carcinomas de adultos e o bloqueio específico da síntese de colesterol não reduz a viabilidade de células NCI-H295A.

-
5. A redução da viabilidade das células NCI-H295A após bloqueio da via do mevalonato indica o envolvimento desta via na proliferação e crescimento tumoral.
 6. A ativação da via do mevalonato está associada à produção de isoprenoídes visto que a viabilidade de células NCI-H295A foi afetada pela inibição específica da isoprenilação de proteínas e produção de isoprenóides.
 7. A disponibilidade de colesterol através da captação de LDL pelo seu receptor (LDLR) está preservada nas neoplasias adrenocorticais de adultos (principalmente nos carcinomas), portanto a capacidade esteroidogênica destes tumores não é afetada pelo desvio na via do mevalonato para produção de isoprenoídes.
 8. Um dos mecanismos que envolvem a dependência da via do mevanolato na viabilidade de células NCI-H295A é a ativação de vias proliferativas como a via das MAPKs.
 9. A via de mevalonato é um alvo promissor para tratamento de tumores adrenocorticais em adultos.

7 Referências

1. Thompson GB, Young WF, Jr. Adrenal incidentaloma. *Curr Opin Oncol.* 2003 Jan;15(1):84-90.
2. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev.* 1995 Aug;16(4):460-84.
3. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jul;91(7):2650-5.
4. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 2001 Jul;25(7):891-7.
5. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer.* 2000 Feb 15;88(4):711-36.
6. Wooten MD, King DK. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer.* 1993 Dec 1;72(11):3145-55.
7. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol.* 2004 Mar 1;22(5):838-45.

8. Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, et al. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer*. 2006 Jul;47(1):56-60.
9. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Oct;86(10):4970-3.
10. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001 Jul 31;98(16):9330-5. *Proc Natl Acad Sci U S A*
11. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Jul;82(7):2027-31.
12. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 May;82(5):1317-24.
13. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol*. 2003 Jan;169(1):5-11.
14. Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl*. 1958 Sep;23(3):155-86.
15. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol*. 1978 Dec;120(6):660-5.

16. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, et al. Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience. *World J Surg.* 2004 Sep;28(9):896-903.
17. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Mar;60(3):273-87.
18. Bertagna C, Orth DN. Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978). *Am J Med.* 1981 Nov;71(5):855-75.
19. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol.* 1979 Sep;72(3):390-9.
20. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer.* 1985 Feb 15;55(4):766-73.
21. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984 Mar;8(3):163-9.
22. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989 Mar;13(3):202-6.
23. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum Pathol.* 2009 Jun;40(6):757-68.
24. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 2002 Dec;26(12):1612-9.

-
25. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol*. 1995 Dec;154(6):2004-9.
 26. 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 Jul;27(7):867-81.
 27. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000 Jan 7;100(1):57-70.
 28. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006 Nov 17;127(4):679-95.
 29. Lerario AM, Mendonca BB, Lin CJ. Molecular mechanisms involved in adrenocortical tumorigenesis. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2005 Oct;49(5):753-68.
 30. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer*. 2007 Mar;14(1):13-28.
 31. Blanes A, Diaz-Cano SJ. DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative lesions. *Hum Pathol*. 2006 Oct;37(10):1295-303.
 32. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, et al. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 1994 Apr;40(4):465-77.
 33. Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev*. 2004 Apr;14(2):120-5.

34. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000 Jun;28(2):145-52.
35. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res*. 1996 Sep 15;56(18):4219-23.
36. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002 Jul;87(7):3467-74.
37. Zhao J, Roth J, Bode-Lesniewska B, Pfaltz M, Heitz PU, Komminoth P. Combined comparative genomic hybridization and genomic microarray for detection of gene amplifications in pulmonary artery intimal sarcomas and adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 May;34(1):48-57.
38. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Mar;84(3):1116-21.
39. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer*. 1999 Sep;81(2):300-4.
40. Gicquel C, Le Bouc Y. Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res*. 1997;47(4-6):269-72.
41. Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, et al. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1

locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Feb;84(2):730-5.

42. Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, et al. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. *J Natl Cancer Inst.* 1989 Apr 5;81(7):518-23.

43. Caron de Fromentel C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1992 Jan;4(1):1-15.

44. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, et al. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol.* 2001 Aug;145(2):207-12.

45. Lin SR, Lee YJ, Tsai JH. Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Feb;78(2):483-91.

46. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer.* 1993 May 28;54(3):408-10.

47. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994 Mar;78(3):790-4.

48. Libe R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, et al. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res.* 2007 Feb 1;13(3):844-50.

-
49. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol.* 1997 Jan;150(1):1-13.
50. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet.* 1999 Oct;65(4):995-1006.
51. Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Nov 16;86(22):1707-10.
52. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol.* 2002 Jan;9(1):12-6.
53. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):378-403.
54. Dai HY, Tsao N, Leung WC, Lei HY. Increase of intracellular pH in p53-dependent apoptosis of thymocytes induced by gamma radiation. *Radiat Res.* 1998 Aug;150(2):183-9.
55. Rainey WE, Carr BR, Wang ZN, Parker CR, Jr. Gene profiling of human fetal and adult adrenals. *J Endocrinol.* 2001 Nov;171(2):209-15.
56. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2007 Jan 15;67(2):600-8.

-
57. Barzon L, Pasquali C, Grigoletto C, Pedrazzoli S, Boscaro M, Fallo F. Multiple endocrine neoplasia type 1 and adrenal lesions. *J Urol*. 2001 Jul;166(1):24-7.
58. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Jan;84(1):216-9.
59. Gouveia M. Análise comparativa dos transcritoemas do córtex adrenal normal e adenocarcinoma do córtex adrenal. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2008.
60. Martin ES, Cesari R, Pentimalli F, Yoder K, Fishel R, Himelstein AL, et al. The BCSC-1 locus at chromosome 11q23-q24 is a candidate tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci US*. 2003 Sep 30;100(20):11517-22.
61. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008 Sep;93(9):3524-31.
62. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Aug;82(8):2559-65.
63. de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM, Feige JJ. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000 Dec;85(12):4734-41.

-
64. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):521-31.
65. Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006 Apr;154(4):587-98.
66. Velazquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, Hoog A, Odeberg J, Kjellman M, et al. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery.* 2005 Dec;138(6):1087-94.
67. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, et al. 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 Mar;90(3):1819-29.
68. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol.* 1997 Mar;136(3):296-303.
69. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3476-83.
70. Molkentin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 2000 Dec 15;275(50):38949-52.
71. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, et al. Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal

and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology*. 2002 Aug;143(8):3136-43.

72. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 during mouse and human adrenocortical development. *Endocr Res*. 2002 Nov;28(4):647-50.

73. Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ. Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord*. 2004 Jul 7;4(1):3.

74. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):615-9.

75. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept*. 2003 Sep 18;1(1):8.

76. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(8):1040-3.

77. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol (Baltimore, Md)*. 2007 Dec;21(12):2968-87.

78. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients

with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2001 Sep 15;61(18):6762-7.

79. Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):148-54.

80. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol.* 2009 Mar 1;27(7):1108-15.

81. Cohen LH, Griffioen M. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase mRNA contents in human hepatoma cell line Hep G2 by distinct classes of mevalonate-derived metabolites. *Biochem J.* 1988 Oct 1;255(1):61-7.

82. Wang W, Tong TJ. The key enzyme of cholesterol synthesis pathway: HMG-CoA reductase and disease. *Sheng li ke xue jin zhan [Progress in physiology]*. 1999 Jan;30(1):5-9.

83. Tosi MR, Tugnoli V. Cholesteryl esters in malignancy. *Clin Chim Acta.* 2005 Sep;359(1-2):27-45.

84. Haeffner EW, Hoffmann CJ, Stoehr M, Scherf H. Cholesterol-induced growth stimulation, cell aggregation, and membrane properties of ascites tumor cells in culture. *Cancer Res.* 1984 Jun;44(6):2668-76.

85. Zhao MW, Liang WQ, Zhang DB, Wang N, Wang CG, Pan YJ. Cloning and characterization of squalene synthase (SQS) gene from *Ganoderma lucidum*. *J Microbiol Biotechnol.* 2007 Jul;17(7):1106-12.

-
86. Brusselmans K, Timmermans L, Van de Sande T, Van Veldhoven PP, Guan G, Shechter I, et al. Squalene synthase, a determinant of Raft-associated cholesterol and modulator of cancer cell proliferation. *J Biol Chem*. 2007 Jun 29;282(26):18777-85.
87. Mo H, Elson CE. Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2004 Jul;229(7):567-85.
88. Newmark HL. Squalene, olive oil, and cancer risk. Review and hypothesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1999;889:193-203.
89. Singh RP, Kumar R, Kapur N. Molecular regulation of cholesterol biosynthesis: implications in carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2003;22(2):75-92.
90. Mason JI, Rainey WE. Steroidogenesis in the human fetal adrenal: a role for cholesterol synthesized de novo. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Jan;64(1):140-7.
91. Miller WL. Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev*. 2008;13:1-18.
92. Payne AH, Hales DB. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocr Rev*. 2004 Dec;25(6):947-70.
93. Broitman SA, Cerda S, Wilkinson Jt. Cholesterol metabolism and colon cancer. *Prog Food Nutr Sci*. 1993 Jan-Mar;17(1):1-40.
94. Zhuang L, Kim J, Adam RM, Solomon KR, Freeman MR. Cholesterol targeting alters lipid raft composition and cell survival in prostate cancer cells and xenografts. *J Clin Invest*. 2005 Apr;115(4):959-68.

-
95. Silvius JR. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta*. 2003 Mar 10;1610(2):174-83.
96. McTaggart SJ. Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Feb;63(3):255-67.
97. Pechlivanis M, Kuhlmann J. Hydrophobic modifications of Ras proteins by isoprenoid groups and fatty acids--More than just membrane anchoring. *Biochim Biophys Acta*. 2006 Dec;1764(12):1914-31.
98. Roberts PJ, Mitin N, Keller PJ, Chenette EJ, Madigan JP, Currin RO, et al. Rho Family GTPase modification and dependence on CAAX motif-signaled posttranslational modification. *J Biol Chem*. 2008 Sep 12;283(37):25150-63.
99. Wright LP, Philips MR. Thematic review series: lipid posttranslational modifications. CAAX modification and membrane targeting of Ras. *J Lipid Res*. 2006 May;47(5):883-91.
100. Ren Z, Elson CE, Gould MN. Inhibition of type I and type II geranylgeranyl-protein transferases by the monoterpene perillyl alcohol in NIH3T3 cells. *Biochem Pharmacol*. 1997 Jul 1;54(1):113-20.
101. Leung KF, Baron R, Ali BR, Magee AI, Seabra MC. Rab GTPases containing a CAAX motif are processed post-geranylgeranylation by proteolysis and methylation. *J Biol Chem*. 2007 Jan 12;282(2):1487-97.
102. Walker K, Olson MF. Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Curr Opin Genet Dev*. 2005 Feb;15(1):62-8.
103. Swarthout JT, Lobo S, Farh L, Croke MR, Greentree WK, Deschenes RJ, et al. DHHC9 and GCP16 constitute a human protein fatty

acyltransferase with specificity for H- and N-Ras. *J Biol Chem*. 2005 Sep 2;280(35):31141-8.

104. Calleros L, Lasa M, Rodriguez-Alvarez FJ, Toro MJ, Chiloeches A. RhoA and p38 MAPK mediate apoptosis induced by cellular cholesterol depletion. *Apoptosis*. 2006 Jul;11(7):1161-73.

105. Ravoet C, Mineur P, Robin V, Debusscher L, Bosly A, Andre M, et al. Farnesyl transferase inhibitor (lonafarnib) in patients with myelodysplastic syndrome or secondary acute myeloid leukaemia: a phase II study. *Ann Hematol*. 2008 Nov;87(11):881-5.

106. E2902: A Phase III randomized study of farnesyl transferase inhibitor R115777 in acute myeloid leukemia patients in second or subsequent remission or in remission after primary induction failure or patients over age 60 in first remission. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2007 Jan;5(1):13-4.

107. Lubet RA, Christov K, You M, Yao R, Steele VE, End DW, et al. Effects of the farnesyl transferase inhibitor R115777 (Zarnestra) on mammary carcinogenesis: prevention, therapy, and role of HaRas mutations. *Mol Cancer Ther*. 2006 Apr;5(4):1073-8. *Mol Cancer Ther*

108. Warnberg F, White D, Anderson E, Knox F, Clarke RB, Morris J, et al. Effect of a farnesyl transferase inhibitor (R115777) on ductal carcinoma in situ of the breast in a human xenograft model and on breast and ovarian cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Res*. 2006;8(2):R21.

109. Basso AD, Kirschmeier P, Bishop WR. Lipid posttranslational modifications. Farnesyl transferase inhibitors. *J Lipid Res*. 2006 Jan;47(1):15-31.

-
110. Andela VB, Pirri M, Schwarz EM, Puzas EJ, O'Keefe RJ, Rosenblatt JD, et al. The mevalonate synthesis pathway as a therapeutic target in cancer. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 Oct(415 Suppl):S59-66.
111. Cohen LH, Pieterman E, van Leeuwen RE, Overhand M, Burm BE, van der Marel GA, et al. Inhibitors of prenylation of Ras and other G-proteins and their application as therapeutics. *Biochem Pharmacol*. 2000 Oct 15;60(8):1061-8.
112. Essig M, Vrtovsni F, Friedlander G. Inhibitors of HMG CoA reductase: new modes of action, new indications?. *Therapie*. 2000 Jan-Feb;55(1):43-9.
113. Wong WW, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. HMG-CoA reductase inhibitors and the malignant cell: the statin family of drugs as triggers of tumor-specific apoptosis. *Leukemia*. 2002 Apr;16(4):508-19.
114. Graaf MR, Richel DJ, van Noorden CJ, Guchelaar HJ. Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev*. 2004 Nov;30(7):609-41.
115. Demyanets S, Kaun C, Pfaffenberger S, Hohensinner PJ, Rega G, Pammer J, et al. Hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase inhibitors induce apoptosis in human cardiac myocytes in vitro. *Biochem Pharmacol*. 2006 Apr 28;71(9):1324-30.
116. Gauthaman K, Fong CY, Bongso A. Statins, stem cells, and cancer. *J Cell Biochem*. 2009 Apr 15;106(6):975-83. *J Cell Biochem*
117. Hoque A, Chen H, Xu XC. Statin induces apoptosis and cell growth arrest in prostate cancer cells. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2008 Jan;17(1):88-94.

-
118. Fritz G. HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as anticancer drugs (review). *Int J Oncol*. 2005 Nov;27(5):1401-9.
119. Chan KK, Oza AM, Siu LL. The statins as anticancer agents. *Clin Cancer Res*. 2003 Jan;9(1):10-9.
120. Jani JP, Specht S, Stemmler N, Blanock K, Singh SV, Gupta V, et al. Metastasis of B16F10 mouse melanoma inhibited by lovastatin, an inhibitor of cholesterol biosynthesis. *Invasion Metastasis*. 1993;13(6):314-24.
121. Wong B, Lumma WC, Smith AM, Sisko JT, Wright SD, Cai TQ. Statins suppress THP-1 cell migration and secretion of matrix metalloproteinase 9 by inhibiting geranylgeranylation. *J Leukoc Biol*. 2001 Jun;69(6):959-62.
122. Park HJ, Kong D, Iruela-Arispe L, Begley U, Tang D, Galper JB. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors interfere with angiogenesis by inhibiting the geranylgeranylation of RhoA. *Circulation Res*. 2002 Jul 26;91(2):143-50.
123. Farina HG, Bublik DR, Alonso DF, Gomez DE. Lovastatin alters cytoskeleton organization and inhibits experimental metastasis of mammary carcinoma cells. *Clin Exp metastasis*. 2002;19(6):551-9. *Clin Exp Metastasis*
124. Wong WW, Tan MM, Xia Z, Dimitroulakos J, Minden MD, Penn LZ. Cerivastatin triggers tumor-specific apoptosis with higher efficacy than lovastatin. *Clin Cancer Res*. 2001 Jul;7(7):2067-75.
125. Lishner M, Bar-Sef A, Elis A, Fabian I. Effect of simvastatin alone and in combination with cytosine arabinoside on the proliferation of myeloid leukemia cell lines. *J Investig Med*. 2001 Jul;49(4):319-24.
126. Fleisch H. Diphosphonates: history and mechanisms of action. *Metab Bone Dis Relat Res*. 1981;3(4-5):279-87.

-
127. Green JR. Anti-tumor potential of bisphosphonates. *Med Klin (Munich)*. 2000 Oct 15;95 Suppl 2:23-8.
128. Berruti A, Dogliotti L, Tucci M, Tarabuzzi R, Fontana D, Angeli A. Metabolic bone disease induced by prostate cancer: rationale for the use of bisphosphonates. *J Urol*. 2001 Dec;166(6):2023-31.
129. Fassnacht M, Franke A, Dettling A, Hahner S, Zink M, Wudy S, et al. Clodronate inhibits adrenocortical cell proliferation and P450c21 activity. *J Endocrinol*. 2002 Sep;174(3):509-16.
130. Boudou-Rouquette P, Alexandre J, Soubrane O, Bertagna X, Goldwasser F. Antitumoral effect of the bisphosphonate zoledronic acid against visceral metastases in an adrenocortical cancer patient. *Ann Oncol*. 2009 Oct;20(10):1747.
131. Rowinsky EK, Windle JJ, Von Hoff DD. Ras protein farnesyltransferase: A strategic target for anticancer therapeutic development. *J Clin Oncol*. 1999 Nov;17(11):3631-52.
132. Azzoli CG, Miller VA, Ng KK, Krug LM, Spriggs DR, Tong WP, et al. A phase I trial of perillyl alcohol in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2003 Jun;51(6):493-8.
133. 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 Dec;25(4):402-8.
134. Rodriguez H, Hum DW, Staels B, Miller WL. Transcription of the human genes for cytochrome P450scc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Feb;82(2):365-71.

-
135. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990 Sep 1;50(17):5488-96.
136. Staels B, Hum DW, Miller WL. Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* (Baltimore, Md). 1993 Mar;7(3):423-33.
137. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983 Dec 16;65(1-2):55-63.
138. Yachnin S, Mannickarottu V. Increased 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol biosynthesis in freshly isolated hairy cell leukemia cells. *Blood.* 1984 Mar;63(3):690-3.
139. Vitols S, Norgren S, Juliusson G, Tatidis L, Luthman H. Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells. *Blood.* 1994 Oct 15;84(8):2689-98.
140. Bennis F, Favre G, Le Gaillard F, Soula G. Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int J Cancer.* 1993 Oct 21;55(4):640-5.
141. Rone MB, Fan J, Papadopoulos V. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. *Biochim Biophys Acta.* 2009 Jul;1791(7):646-58.