AMANDA MENESES FERREIRA LACOMBE

**Proteína Esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1
(SOAT1): um novo marcador preditivo de agressividade dos
carcinomas do córtex suprarrenal**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida
Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2020

AMANDA MENESES FERREIRA LACOMBE

**Proteína Esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1
(SOAT1): um novo marcador preditivo de agressividade dos
carcinomas do córtex suprarrenal**

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

Programa de Endocrinologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida
Barisson Villares Fragoso

São Paulo

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Lacombe, Amanda Meneses Ferreira
Proteína Esterol O-acilcoenzima A: colesterol
aciltransferase 1 (SOAT1) : um novo marcador
preditivo de agressividade dos carcinomas do córtex
suprarrenal / Amanda Meneses Ferreira Lacombe. --
São Paulo, 2020.
Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Candida Barisson Villares
Fragoso.

Descritores: 1.Carcinoma adrenocortical
2.Expressão gênica 3.Imuno-histoquímica
4.Biomarcadores tumorais 5.Prognóstico 6.Mitotano
7.Sobrevida

USP/FM/DBD-137/20

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

Aos meus pais, Lireda e Renor, por todo amor e pelos exemplos de trabalho, dedicação e responsabilidade.

À minha irmã, Ali, companheira inseparável de todas as horas, pelo apoio e carinho constantes.

Ao meu marido, Luiz Augusto, esposo querido, quem suavizou os momentos difíceis e foi fonte de estímulo constante, pelos momentos que lhe faltei.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho foi possível com a ajuda de pessoas que estiveram ao meu lado neste período – a estas pessoas aqui estão os meus agradecimentos:

À Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, pela valiosa orientação e pelo exemplo como pesquisadora, médica assistente comprometida e dedicada a seus pacientes e por estar sempre disponível, iluminando a trajetória deste trabalho com seus ensinamentos e orientações. Sinto-me honrada por estar entre os alunos a quem orientou. Humana, competente e conhecedora de tantos aspectos do carcinoma do córtex suprarrenal, sempre colaborou com ideias preciosas e pragmáticas para a execução desta tese, ensinando-me, apoiando-me e corrigindo-me. As próximas páginas, sem a sua contribuição, certamente não teriam o mesmo valor.

Ao Prof. Dr. Madson Queiroz Almeida, um médico e pesquisador ímpar, por todos os ensinamentos no Ambulatório de Suprarrenal. Agradeço ao Prof. Dr. Madson Queiroz Almeida, juntamente com o colega André Murad Faria, pela confecção, em 2012, de uma das três micromatrizes teciduais utilizadas nesta tese.

Às Profas. Dras. Berenice Bilharinho de Mendonça e Ana Claudia Latronico, pelo apoio a este trabalho e por serem grandes incentivadoras da busca pelo conhecimento e da pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, ao Dr. Iberê Cauduro Soares e ao Dr. Marcelo Luiz Balancin, por toda paciência e colaboração na preparação das novas micromatrizes teciduais confeccionadas e na análise e leitura dos estudos imuno-histoquímicos. Os três com um jeito doce e sereno, são grandes exemplos de médicos e profissionais.

À Ana Paula Flora e à Mirian Souto, funcionárias do Departamento de Anatomia Patológica, pelo levantamento dos blocos e lâminas utilizados neste trabalho.

À Sra. Alda Wakamatsu, profissional do LIM14, pela sua sempre prontidão, boa vontade e esmero no processamento das lâminas de imuno-histoquímica. À Aline Assato, também profissional do LIM14, pelo seu auxílio em todas as etapas da confecção das novas micromatrizes teciduais e pela confecção destas com técnica minuciosa e execução impecável.

À toda equipe do LIM42, em especial à Mirian Yumie Nishi e à colega Beatriz Marinho de Paula Mariani, pelas horas dispendidas comigo no desenvolvimento de importantes etapas do projeto na bancada, bem como pela paciência em transmitir a mim diversos conhecimentos do mundo da biologia molecular.

Ao Vinícius Fernando Calsavara, por sua contribuição preciosa com a preparação dos dados e com as análises estatísticas.

Às professoras membros da banca de qualificação, Profa. Marisa Passarelli, Profa. Dra. Maria Adelaide Albergaria Pereira e Profa. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi, pelas críticas e sugestões valiosas para o aprimoramento desta tese.

Às queridas amigas de residência e pós-graduação Marcela Rassi da Cruz e Lia Mesquita Lousada Quintão, pela companhia e parceria nos ambulatórios, aulas e almoços e pelo apoio mútuo ao sucesso de nossas teses. Às colegas Vânia Balderrama Brondani, Letícia Assis Pereira Vilela, Helaine Laiz da Silva Charchar, Janaina Petenuci, Thais Castanheira de Freitas e Ana Alice Wolf, pela harmoniosa e agradável convivência nos ambulatórios de quarta-feira.

Aos pacientes portadores de carcinoma do córtex suprarrenal, por serem amáveis com seus cuidadores mesmo nos momentos mais difíceis de suas vidas, além de contribuírem para o aprendizado de dezenas de médicos desta instituição.

Aos meus pais Lireda Meneses Silva e Renor Ferreira, constantes fontes de amor e exemplo em minha vida, por me darem a sabedoria de aprender a transformar desejos em sonhos, lutas e realizações. À minha irmã Aliana Meneses Ferreira, por sua amizade fiel, apoio constante e pela anfitriã carinhosa e amada que foi durante os últimos três anos.

Ao meu amado esposo, Luiz Augusto Cardoso Lacombe, por seu amor intenso, puro e sincero, por seu apoio, companheirismo e cumplicidade que me tornam uma pessoa completa, feliz e realizada.

A Deus, pela oportunidade de ter conhecido pessoas tão especiais ao longo da minha trajetória. Peço a ele que continue sendo o meu guia “maior”, dando-me sabedoria e conhecimento para zelar pela saúde daqueles que são a razão do nosso trabalho: os nossos pacientes.

Agradecimentos Especiais

**À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Auxílio
Pesquisa: 2017/26345-5)**, que aprovou e financiou parcialmente a execução deste
projeto, pela confiança que dedica à pesquisa científica.

*“É o motivo que engrandece a ação; é o
fazer, não o feito.”*

Margaret Preston

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

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

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

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

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

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de figuras

Lista de tabelas

Lista de gráficos

Lista de anexos

Resumo

Abstract

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 O Carcinoma do córtex suprarrenal	2
1.2 Apresentação clínica do carcinoma do córtex suprarrenal	2
1.3 Diagnóstico do carcinoma do córtex suprarrenal.....	2
1.3.1 Diagnóstico laboratorial.....	3
1.3.2 Diagnóstico radiológico	4
1.3.3 Diagnóstico histopatológico.....	4
1.3.3.1 Marcadores tumorais.....	5
1.4 Estadiamento.....	5
1.5 Prognóstico	5
1.6 O tratamento do carcinoma do córtex suprarrenal	8
1.6.1 Mitotano	8
1.6.2 Outras modalidades terapêuticas	10
1.7 A proteína SOAT1	11
2 OBJETIVOS	14
3 MÉTODOS.....	16
3.1 Considerações éticas.....	17
3.2 Casuística	17
3.2.1 População para avaliação da expressão proteica da SOAT1	18
3.2.2 População para avaliação da expressão do gene <i>SOAT1</i>	18
3.3 Avaliação da Expressão Proteica	19
3.3.1 Micromatrizes teciduais dos tumores primários.....	20
3.3.2 Micromatriz tecidual das metástases	21
3.3.3 Imuno-histoquímica.....	21
3.3.3.1 Análise da imuno-histoquímica (SOAT1)	23
3.3.3.2 Análise da imuno-histoquímica (Ki67).....	25

3.3.3.3	Análise da imuno-histoquímica (SF-1).....	25
3.4	Avaliação da expressão gênica	26
3.4.1	Extração de RNA e síntese de cDNA	26
3.4.2	Estudo da expressão da <i>SOAT1</i> por PCR quantitativa em tempo real.....	26
3.5	Correlação entre a expressão proteica da SOAT1 e a resposta ao mitotano	28
3.5.1	Critérios de inclusão - tratamento com mitotano adjuvante	28
3.5.2	Critérios de inclusão - tratamento com mitotano no contexto de doença avançada (tratamento paliativo).....	29
3.6	Análise estatística.....	30
4	RESULTADOS	32
4.1	Carcinomas do córtex suprarrenal (Tumores primários).....	33
4.1.1	Expressão proteica da SOAT1	34
4.1.1.1	Expressão proteica da SOAT1 e características clínicas, bioquímicas e histológicas	35
4.1.1.2	Expressão proteica da SOAT1 e análises de sobrevida	37
4.1.1.3	A expressão proteica da SOAT1 e o índice Ki67	42
4.1.2	Expressão do gene <i>SOAT1</i>	43
4.1.3	Expressão proteica da SOAT1 em subgrupo específico	44
4.1.3.1	Adultos carreadores da variante alélica germinativa c.1010G>A no gene <i>TP53</i> (p.Arg337His, R337H).....	44
4.2	Metástases de carcinomas do córtex suprarrenal	48
4.2.1	Expressão proteica da SOAT1	49
4.2.1.1	Expressão proteica da SOAT1 no tumor primário <i>versus</i> a expressão proteica da SOAT1 na metástase	51
4.2.2	Outras características das metástases	55
4.3	Expressão proteica do SF-1	56
4.3.1	A relação entre a expressão proteica da SOAT1 e a expressão proteica do SF-1	58
4.4	Expressão proteica da SOAT1 e resposta ao tratamento com mitotano.....	59
4.4.1	Mitotano adjuvante	60
4.4.2	Mitotano paliativo	60
4.4.3	Correlação entre a expressão da SOAT1 e as concentrações de mitotano	60
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	70
7	ANEXOS.....	72
8	REFERÊNCIAS.....	103
	Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$2^{-\Delta\Delta CT}$	- Método de quantificação relativa
ΔCT	- Delta CT
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
Arg	- Arginina
BSA	- Solução de albumina de soro bovino
<i>BUB1B</i>	- Gene que codifica o ponto de verificação mitótico serina/treonina-proteína quinase BUB1
CCS	- Carcinoma do córtex suprarrenal
CGA	- Campo de grande aumento
CT	- <i>Cycle threshold</i> (ciclo limiar)
CTLA4	- Antígeno 4 associado ao linfócito T citotóxico
CYC	- Ciclofilina
<i>CYP11A1</i>	- Gene que codifica a enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol
<i>CYP11B1</i>	- Gene que codifica a enzima CYP11B1 (11 β -hidroxilase)
<i>CYP11B2</i>	- Gene que codifica a enzima CYP11B2 (Aldosterona-sintase)
<i>CYP3A4</i>	- Gene que codifica a enzima citocromo P450 3A4
cDNA	- DNA complementar
DGL7	- Proteína DGL7
DHEAS	- Sulfato de dehidroepiandrosterona
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DICER1	- Proteína DICER1
EDTA	- Ácido etilenodiamido tetra-acético
ENSAT	- European Network for the Study of Adrenal Tumors (Rede Europeia para o Estudo dos Tumores Adrenais)
EPM	- Erro padrão da amostra
EUA	- Estados Unidos da América
HAS	- Hipertensão arterial sistêmica
HC	- Hospital das Clínicas
FMUSP	- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
<i>G0S2</i>	- Gene G0/G1 Switch 2
GUSB	- β -glicuronidase

His	- Histidina
H ₂ O ₂	- Peróxido de hidrogênio
IC 95%	- Intervalo de confiança 95%
ICC	- Correlação intraclass
ICESP	- Instituto do Câncer do Estado de São Paulo
IGF2	- Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IHQ	- Imuno-histoquímica
Ki67	- Marcador de proliferação celular Ki67 (antígeno nuclear)
LIM14	- Laboratório de investigação médica 14
LIM42	- Laboratório de investigação médica 42
LIN28	- Proteína LIN28
M	- Mitocôndria
MP	- Membrana Plasmática
N	- Núcleo
<i>NR5A1</i>	- Gene que codifica o fator esteroideogênico 1 (nomenclatura alternativa <i>SF-1</i>)
o.p'DDA	- Ácido o.p'-diclorodifenil acético
o.p'DDD	- Mitotano
o.p'DDE	- Ácido o.p'-diclorodifenil dicloroetano
P53	- Proteína tumoral 53
PBS	- Solução salina tamponada com fosfato
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
PD-1	- Proteína de morte celular programada 1
PDL-1	- Ligante de morte celular programada 1
PET	- Tomografia por emissão de pósitron
PET-TC	- Tomografia por emissão de pósitron acoplada à TC
pH	- Potencial hidrogeniônico
<i>PINK1</i>	- Gene que codifica a proteína quinase 1 induzida por PTEN
P450	- Citocromo P450
qRT-PCR	- PCR quantitativa em tempo real
RE	- Retículo endoplasmático
RLDL	- Receptor de LDL-colesterol
RNA	- Ácido ribonucleico

RNA _m	- RNA mensageiro
RR	- Risco relativo
RT	- Transcrição reversa
SF-1	- Fator esteroideogênico 1
SG	- Sobrevida global
SLP	- Sobrevida livre de progressão
SLR	- Sobrevida livre de recorrência
SOAT1	- Proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1
<i>SOAT1</i>	- Gene que codifica a proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1
SPSS	- Statistical Package for Social Sciences software
RM	- Ressonância magnética
RT	- Transcrição reversa
StAR	- Proteína reguladora da esteroideogênese aguda
TC	- Tomografia computadorizada
TMA	- Micromatriz tecidual
TMA ₁	- Micromatriz tecidual de tumores primários 1
TMA ₂	- Micromatriz tecidual de tumores primários 2
TMA ₃	- Micromatriz tecidual de metástases
<i>TP53</i>	- Gene que codifica a proteína tumoral P53
v/v	- Volume/volume
WNT	- Via de sinalização <i>Wingless iNTegration</i>
<i>ZNRF3</i>	- Gene que codifica a proteína E3 ubiquitina ligase ZNRF3
cm	- Centímetros
h	- Horas
L	- Litro
mg	- Miligramas
mg/L	- Miligramas por litro
mg/mL	- Miligramas por mililitro
mM	- Milímetro
ng/dL	- Nanogramas por decilitro
µg/dL	- Microgramas por decilitro
µg/mL	- Microgramas por mililitro

μm

- Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração esquemática da função da proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1). A SOAT1, proteína localizada no retículo endoplasmático, é responsável pela conversão enzimática das moléculas de colesterol livre e de ácidos graxos livres em colesterol esterificado. As estruturas ricas em colesterol esterificado são chamadas de “*lipid droplets*” (identificadas nos círculos em azul). 11

Figura 2. Série de carcinomas do córtex suprarrenal para a análise da expressão proteica e imuno-histoquímica e para análise da expressão gênica através da quantificação do RNA mensageiro..... 18

Figura 3. Série de metástases de carcinoma do córtex suprarrenal para a análise da expressão proteica e imuno-histoquímica. 19

Figura 4. Ilustração exemplificando as áreas de interesse assinaladas nas lâminas e nos respectivos blocos (blocos doadores)..... 20

Figura 5. (A e B) Imunorreatividade para a SOAT1 em glândulas suprarrenais normais à microscopia (400x)..... 34

Figura 6. Imunorreatividade para SOAT1 à microscopia em quatro casos de carcinomas do córtex suprarrenal (A) Imunorreatividade ausente para a SOAT1 (escore 0) em carcinoma do córtex suprarrenal não funcionante de uma paciente do sexo feminino de 61 anos com evolução clínica favorável e seguimento de 42 meses (400x). (B) Imunorreatividade fraca para a SOAT1 (escore 2) em carcinoma do córtex suprarrenal produtor de andrógenos de uma paciente do sexo feminino de 30 anos com evolução clínica favorável (400x). (C) Imunorreatividade forte para a SOAT1 (escore 3) em carcinoma do córtex suprarrenal produtor de cortisol, andrógenos e estrógeno de um paciente do sexo masculino de 37 anos com evolução clínica desfavorável (400x). (D) Imunorreatividade forte para a SOAT1 (escore 4) em um carcinoma do córtex suprarrenal produtor de cortisol de um paciente do sexo masculino de 30 anos com evolução clínica desfavorável e sobrevida global de 16 meses (400x)..... 35

Figura 7. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H; subgrupo 3) (A) Escore de imunorreatividade 4; expressão proteica forte da SOAT1 (400x). (B) Escore de imunorreatividade 2; expressão fraca da SOAT1 (400x). (C) Escore de imunorreatividade 2; expressão fraca da SOAT1 (400x). (D-H) Escore de imunorreatividade 4; expressão proteica forte da SOAT1 (400x). 47

Figura 8. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do carcinoma do córtex suprarrenal (tumor primário) e da metástase intra-abdominal ressecados em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 1,5 e, portanto, expressão proteica fraca da SOAT1 (100x). (B)

Metástase intra-abdominal ressecada após 37,2 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 2 e expressão proteica fraca da SOAT1 (100x). 51

Figura 9. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do carcinoma do córtex suprarrenal (tumor primário) e da metástase hepática ressecada em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e, portanto, expressão proteica forte da SOAT1 (100x). (B) Metástase hepática ressecada após 20,4 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x). 52

Figura 10. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do tumor primário e de metástases em diferentes sítios e ressecadas em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e, portanto, expressão proteica forte da SOAT1 (100x). (B e C) Metástases pulmonares (dois nódulos diferentes) ressecadas após 27 meses da ressecção do tumor primário (100x). (B) Escore de imunorreatividade 3 e expressão forte da SOAT1 (100x). (C) Escore de imunorreatividade 0 e expressão ausente da SOAT1 (100x). (D) Metástase para SNC ressecada após 30 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x). 53

Figura 11. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do tumor primário e de metástases pulmonares ressecadas em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 1,5 e, portanto, expressão proteica fraca da SOAT1 (100x). (B e C) Metástases pulmonares (dois nódulos diferentes) ressecadas após 20 meses da ressecção do tumor primário (100x). (B) Escore de imunorreatividade 4 e expressão forte da SOAT1 (100x). (C) Escore de imunorreatividade 3 e expressão forte da SOAT1 (100x). (D) Metástase pulmonar ressecada após 30 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x). 54

Figura 12. Imunorreatividade para o SF-1 em carcinomas do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário). (A) Escore de imunorreatividade ausente para o SF-1 (escore = 0) (400x). (B) Imunorreatividade fraca para o SF-1 (escore = 1) (400x). (C) Imunorreatividade fraca para o SF-1 (escore = 2) (400x). (D) Imunorreatividade forte para o SF-1 (escore = 3). (E) Imunorreatividade forte para o SF-1 (escore = 4) (400x). 57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Investigação laboratorial a ser realizada nos pacientes com suspeita clínica de carcinoma do córtex suprarrenal.	3
Tabela 2. Pontuação de acordo com a intensidade da imunorreatividade.	24
Tabela 3. Pontuação de acordo com a extensão da imunorreatividade.	24
Tabela 4. Análise da concordância entre os dois observadores utilizando o coeficiente de concordância Kappa.	24
Tabela 5. Análise da concordância entre os dois observadores utilizando o coeficiente de correlação intraclasse.	25
Tabela 6. Pontuação de acordo com a extensão da imunorreatividade.	25
Tabela 7. Características clínicas dos 112 pacientes com carcinomas do córtex suprarrenal incluídos nas micromatrizes teciduais de tumores primários.	33
Tabela 8. Frequência dos escores de imunorreatividade (0 - 4) para a proteína SOAT1 dentre os 112 carcinomas do córtex suprarrenal e categorização dos casos de acordo com a expressão proteica.	34
Tabela 9. Relação entre a expressão proteica da SOAT1 e as características clínicas, bioquímicas e histopatológicas dos 112 pacientes com carcinoma do córtex suprarrenal (apenas amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário).	36
Tabela 10. Fatores prognósticos relacionados à sobrevida global, à sobrevida livre de recorrência e à sobrevida livre de progressão em pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário).	41
Tabela 11. Características dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene <i>TP53</i> (p.Arg337His, R337H (Casos A-D)).	46
Tabela 12. Características dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene <i>TP53</i> (p.Arg337His, R337H (Casos E-H)).	46
Tabela 13. Caracterização das 42 metástases incluídas na micromatriz tecidual das metástases (TMA ₃).	48

Tabela 14. Frequência dos escores de imunorreatividade (0 - 4) para a SOAT1 dentre as 42 metástases de carcinoma do córtex suprarrenal e categorização dos casos de acordo com a expressão proteica.....	49
Tabela 15. Relação entre a expressão proteica da SOAT1 e as características clínicas e histopatológicas das 42 metástases de carcinoma do córtex suprarrenal.	50
Tabela 16. Distribuição dos escores de imunorreatividade para o SF-1 nas suprarrenais normais, carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários) e nas metástases.	56
Tabela 17. Escore de Weiss para diferenciar neoplasias benignas e malignas do córtex suprarrenal.....	73
Tabela 18. Escore de Weiss modificado para diferenciar neoplasias benignas e malignas do córtex suprarrenal.....	73
Tabela 19. Estadiamento do carcinoma do córtex suprarrenal.....	74
Tabela 20. Interpretação do coeficiente de concordância Kappa.	83
Tabela 21. Interpretação do coeficiente de concordância intraclasse.	83

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1.** Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do gene *SOAT1* em relação ao gene endógeno *GUSB* (β -glicuronidase). 27
- Gráfico 2.** Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do gene *SOAT1* em relação ao gene endógeno *CYC* (ciclofilina A)..... 28
- Gráfico 3.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da *SOAT1* na sobrevida global de 112 pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário)... 37
- Gráfico 4.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da *SOAT1* na sobrevida livre de progressão de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise da sobrevida livre de progressão, apenas pacientes com doença metastática ao diagnóstico foram analisados (subgrupo 1). 38
- Gráfico 5.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da *SOAT1* na sobrevida livre de recorrência de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise da sobrevida livre de recorrência, apenas pacientes com doença localizada ao diagnóstico que foram submetidos à ressecção completa do tumor primário (*status* de ressecção R0) foram analisados (subgrupo 2). 39
- Gráfico 6.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão da proteína *SOAT1* e do índice de proliferação Ki67 na sobrevida global de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. 42
- Gráfico 7.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão da proteína *SOAT1* e do índice de proliferação Ki67 na sobrevida livre de recorrência de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise de sobrevida livre de recorrência, apenas pacientes com ressecção completa do tumor primário (*status* de ressecção R0) foram analisados (subgrupo 2) 43
- Gráfico 8.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da presença de variantes alélicas germinativas patogênicas no gene *TP53* na sobrevida global de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. 45
- Gráfico 9.** Localização das 42 metástases incluídas na micromatriz tecidual das metástases (TMA₃)..... 49
- Gráfico 10.** Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da *SOAT1* na sobrevida livre de recorrência e progressão de 231 pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal provenientes de doze centros. 59

Gráfico 11. Correlação entre a expressão proteica da SOAT1 e a recorrência da doença quando apenas os pacientes que atingiram concentrações plasmáticas de mitotano ≥ 14 mg/L após 3 meses (A) e após 6 meses (B) do início da droga foram analisados.....61

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Escore de Weiss e escore de Weiss modificado.	73
Anexo II. Sistema de estadiamento do carcinoma do córtex suprarrenal de acordo com o sistema de classificação TNM de classificação dos tumores malignos e de acordo com a ENSAT.	74
Anexo III. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.	75
Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.	78
Anexo V. Estudos piloto para a análise da imuno-histoquímica da SOAT1 e para a análise da imuno-histoquímica do SF-1.	81
Anexo VI. Interpretação do coeficiente de concordância Kappa e do coeficiente de concordância intraclass.	83
Anexo VII. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imuno-histoquímica para o antígeno esteroide O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1).	84
Anexo VIII. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imuno-histoquímica para o antígeno Ki67.	87
Anexo IX. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imuno-histoquímica para o antígeno fator esteroideogênico 1 (SF-1).	89
Anexo X. Planilhas dos dados.	91

RESUMO

Lacombe, AMF. *Proteína Esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1): um novo marcador preditivo de agressividade dos carcinomas do córtex suprarrenal* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introdução: O carcinoma do córtex suprarrenal (CCS) é uma malignidade rara associada a um prognóstico reservado na maioria dos pacientes. Além do prognóstico desfavorável, as alternativas de tratamento são escassas e, apesar de muitos progressos no conhecimento da patogênese da doença, pouco se evoluiu em relação a sua terapêutica. Desta forma, o estabelecimento de novos marcadores prognósticos que possam contribuir para o desenvolvimento de tratamentos-alvo é de grande interesse. A esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1) é uma enzima codificada pelo gene *SOAT1*, o qual é alvo da ação do fator de transcrição esteroideogênico 1 (SF-1). A SOAT1 está envolvida na esterificação do colesterol e na formação das partículas de gordura ou “*lipid droplets*”. Recentemente foi demonstrado que a inibição *in vitro* da SOAT1 resulta em comprometimento da esteroideogênese e da viabilidade celular no CCS. Até o momento não há estudos que avaliaram o impacto da expressão da SOAT1 no prognóstico e nos desfechos clínicos de pacientes com CCS. **Objetivos:** Avaliar a expressão do gene e da proteína SOAT1 no CCS e correlacioná-la com as características clínicas, bioquímicas e anatomopatológicas e com os desfechos clínicos sobrevida livre de recorrência (SLR), sobrevida livre de progressão (SLP) e sobrevida global (SG); avaliar a expressão proteica da SOAT1 no tumor primário *versus* a expressão proteica deste marcador em metástases de CCS em diferentes sítios; comparar a expressão proteica da SOAT1 com a expressão do SF-1 e avaliar o impacto da expressão proteica da SOAT1 na resposta ao tratamento com mitotano. **Métodos:** Analisamos a expressão gênica e proteica da SOAT1 avaliada por meio da reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e por imuno-histoquímica (IHQ) em três micromatrizes teciduais (TMAs): dois TMAs foram confeccionados a partir de amostras tumorais de carcinomas primários (escore de Weiss ≥ 3) de 112 pacientes adultos e um TMA foi confeccionado a partir de amostras tumorais de 42 metástases de CCS de 19 pacientes. Dois patologistas experientes avaliaram os resultados imuno-histoquímicos de forma cega e independente utilizando uma abordagem semi-quantitativa. **Resultados:** A expressão proteica da SOAT1 foi heterogênea. Na série de tumores primários e de metástases, 37,5% e 36%, respectivamente, apresentaram expressão proteica forte (escore > 2). A expressão forte da proteína SOAT1, nos tumores primários, correlacionou-se com características de maior agressividade no CCS como com a secreção excessiva de cortisol pelo tumor e com o *status* de hipercortisolismo ($p = 0,01$), com o estadiamento avançado ao diagnóstico (ENSAT 3 e 4; $p = 0,011$) e com um índice de proliferação celular Ki67 mais elevado ($p = 0,002$). A expressão forte da SOAT1 foi um fator preditivo independente para uma menor SG (risco relativo (RR) 2,15; intervalo de confiança (IC) 95% 1,26-3,66; $p = 0,005$) e para uma menor SLR em pacientes com doença localizada ao diagnóstico que foram submetidos à ressecção

cirúrgica completa do tumor primário (RR 2,1; IC 95% 1,09-4,06; $p = 0,027$). Nas metástases a expressão proteica da SOAT1 enquadrava-se na mesma categoria de expressão que a do tumor primário em 72% dos casos; contudo, não se correlacionou de forma estatisticamente significativa com as características clínicas, bioquímicas e histológicas. A expressão do SF-1 foi positiva na maioria dos casos, tendo sido demonstrada em 92% dos tumores primários e em 74% das metástases. A expressão da SOAT1 e do SF-1 foram concordantes em cerca de dois terços dos casos. A expressão proteica da SOAT1, isoladamente, não predisse a resposta ao tratamento com mitotano, tanto no contexto adjuvante quanto no contexto paliativo. **Conclusões:** A expressão proteica da SOAT1 tem valor prognóstico no CCS, definindo um subgrupo de pacientes com prognóstico mais reservado. Reforçamos a importância de que a SOAT1 seja investigada como um possível alvo terapêutico nos pacientes portadores desta neoplasia maligna.

Descritores: carcinoma do córtex suprarrenal; expressão gênica; imuno-histoquímica; marcadores biológicos do tumor; prognóstico; mitotano; sobrevida.

ABSTRACT

Lacombe, AMF. *Sterol O-acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 (SOAT1): a new predictive marker for aggressiveness of adrenocortical carcinomas* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2020.

Introduction: Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare cancer associated with poor prognosis in most patients. In addition to the unfavorable prognosis, alternative treatments are lacking, and there has been a lack of significant advances in the development of treatments. Thus, the establishment of new prognostic markers that can contribute to the development of target therapies is of enormous interest. Sterol O-acylcoenzyme A: cholesterol acyltransferase 1 (SOAT1) is an enzyme encoded by the *SOAT1* gene, which is the target of steroidogenic transcription factor 1 (SF-1). SOAT1 is an enzyme involved in cholesterol esterification and lipid droplet formation. Recently, it was demonstrated that, in vitro, SOAT1 inhibition leads to impaired steroidogenesis and cell viability in ACC. To date, no studies have addressed the impact of SOAT1 expression on ACC prognosis and clinical outcomes. **Aims:** We aimed to evaluate the correlation between SOAT1 expression and the clinical, biochemical and anatomopathological characteristics, recurrence-free survival (RFS), progression-free survival (PFS) and overall survival (OS) associated with ACC and to evaluate SOAT1 protein expression in the primary tumor versus that in ACC metastases at different sites. We also intended to compare SOAT1 protein expression with SF-1 expression and to evaluate the impact of SOAT1 protein expression in response to treatment with mitotane. **Methods:** We evaluated SOAT1 gene and protein expression through real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC) in three tissue microarrays (TMAs), respectively. Two TMAs were prepared from primary carcinoma samples (Weiss score ≥ 3) from 112 adult patients, and one TMA was prepared from tumor samples from 42 ACC metastases from 19 patients. Two experienced pathologists evaluated the immunohistochemical results blindly and independently using a semiquantitative approach. **Results:** SOAT1 protein expression was heterogeneous. Among the primary tumors and metastases, 37.5% and 36%, respectively, demonstrated strong protein expression (score > 2). In the primary tumors, strong SOAT1 protein expression was correlated with features of high aggressiveness in ACC, such as excessive cortisol secretion by the tumor and with the hypercortisolism status ($p = 0.01$), with an advanced stage at diagnosis (ENSAT 3 and 4; $p = 0.011$) and with a higher Ki67 index ($p = 0.002$). Strong SOAT1 protein expression was an independent predictive factor of decreased OS (hazard ratio (HR) 2.15; 95% confidence interval (CI) 1.26-3.66; $p = 0.005$) and decreased RFS in the subgroup of patients with localized disease at diagnosis who underwent complete surgical resection of the primary tumor (HR 2.1; 95% CI 1.09-4.06; $p = 0.027$). For the metastases, the level of SOAT1 protein expression resulted in their being included in the same expression category as the primary tumor in 72% of the cases, but it was not correlated in a statistically significant way with the clinical, biochemical or

histological characteristics. The SF-1 expression status was positive in most cases (92% of primary tumors and 74% of metastases). The expression levels of SOAT1 and SF-1 were similar in approximately two-thirds of the cases. SOAT1 expression alone did not predict the response to treatment with mitotane in both the adjuvant and palliative settings. **Conclusions:** Our findings demonstrated that the detection of SOAT1 protein expression has prognostic value in ACC, defining a subgroup of patients with poorer prognosis. We also reinforced the importance of investigating SOAT1 as a possible therapeutic target for patients with ACC.

Descriptors: adrenocortical carcinoma; gene expression; immunohistochemistry; tumor markers; prognosis; mitotane; survival.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O Carcinoma do córtex suprarrenal

O carcinoma do córtex suprarrenal (CCS) é uma neoplasia maligna rara e extremamente agressiva¹, com uma incidência de 0,5 a 2 casos por milhão de adultos por ano². O CCS pode ocorrer em qualquer idade, no entanto, dois picos de incidência são bem definidos na literatura: a primeira década de vida, acometendo crianças, e a quarta e quinta décadas de vida^{3,4}. As regiões sul e sudeste do Brasil destacam-se por uma incidência expressivamente maior desta condição na faixa etária pediátrica, sendo esta 10 a 15 vezes maior do que a de outras regiões ao redor do mundo⁵ em decorrência da alta prevalência da variante alélica patogênica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H)¹.

1.2 Apresentação clínica do carcinoma do córtex suprarrenal

Nos adultos, as manifestações clínicas mais comuns do CCS decorrem da secreção excessiva de cortisol pelo tumor. Alguns pacientes apresentam excesso de cortisol e andrógenos, apresentando uma síndrome mista (síndrome de Cushing e síndrome virilizante). O excesso isolado de andrógenos é pouco comum e o excesso de estrógenos e/ou aldosterona é infrequente^{2,6}. Em alguns casos não há excesso hormonal identificado pela avaliação clínica e hormonal habitual; entretanto, com a utilização de métodos mais sensíveis como a espectrometria de massas é possível identificar concentrações elevadas de precursores da esteroidogênese suprarrenal⁷.

Os pacientes com tumores aparentemente não funcionantes podem se apresentar com sintomas decorrentes do efeito de massa do tumor como dor abdominal, náuseas, vômitos, sensação de saciedade precoce e dorsalgia ou dor lombar. Mais raramente, o CCS pode ser diagnosticado como achado incidental em exames de imagem realizados com outro objetivo que não a avaliação da glândula suprarrenal^{8,9}. No entanto, a probabilidade de um incidentaloma suprarrenal tratar-se de um CCS é pequena; o CCS representa apenas 8 a 12% de todos os incidentalomas suprarrenais¹⁰.

1.3 Diagnóstico do carcinoma do córtex suprarrenal

O diagnóstico do CCS é baseado na avaliação cuidadosa e conjunta da história clínica, das características laboratoriais (bioquímicas e hormonais) e radiológicas antes do tratamento cirúrgico, se este for possível e, após a ressecção cirúrgica, das características histopatológicas³.

1.3.1 Diagnóstico laboratorial

Em 2005, a Rede Europeia para o Estudo dos Tumores Adrenais (ENSAT) sugeriu uma avaliação laboratorial pré-operatória a ser realizada em todos os pacientes com suspeita de CCS, a qual foi revisitada e atualizada recentemente^{11,12}. Os exames a serem solicitados encontram-se descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Investigação laboratorial a ser realizada nos pacientes com suspeita clínica de carcinoma do córtex suprarrenal.

Avaliação hormonal	
Objetivo	Exame
Confirmar o excesso de glicocorticoides	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de supressão com dexametasona 1mg via oral <i>overnight</i> ou cortisol livre urinário 24h • ACTH basal (plasmático)
Confirmar o excesso de esteroides sexuais e seus precursores	<ul style="list-style-type: none"> • DHEAS (sérico) • 17-OH-progesterona (sérico) • Androstenediona (sérico) • Testosterona (sérico, apenas em mulheres) • 17-β-estradiol (sérico, apenas em homens ou mulheres na pós menopausa) • 11-desoxicortisol
Confirmar o excesso de mineralocorticoides	<ul style="list-style-type: none"> • Potássio (sérico) • Relação aldosterona/renina (apenas em pacientes com HAS e/ou com hipocalemia)
Excluir feocromocitoma	<ul style="list-style-type: none"> • Catecolaminas ou metanefrinas urinárias 24h • Metanefrinas plasmáticas

ACTH, hormônio adrenocorticotrófico; DHEAS, dehidroepiandrosterona; HAS, hipertensão arterial sistêmica

A avaliação hormonal detalhada destes pacientes é importante uma vez que o diagnóstico do excesso de esteroides estabelece a origem adrenocortical do tumor e qualquer evidência de cossecreção de esteroides e de seus precursores aumenta a probabilidade do diagnóstico de um CCS¹¹. Ainda, se não diagnosticada, a secreção autônoma de cortisol pode levar à insuficiência suprarrenal secundária após a ressecção completa da lesão tumoral. O padrão hormonal pré-operatório também pode ser útil como um marcador tumoral no seguimento pós-operatório, facilitando a detecção de recorrências locais ou à distância^{6,12}.

1.3.2 Diagnóstico radiológico

Nos casos em que a suspeita de um CCS é alta, está indicada a realização de tomografia computadorizada (TC) de tórax, além de TC ou ressonância magnética (RM) de abdômen e pelve, uma vez que o resultado destes exames pode vir a modificar a decisão terapêutica do paciente. O objetivo da realização destes exames é avaliar a extensão locorregional do tumor e descartar a presença de metástases, as quais mais comumente acometem o fígado e os pulmões. Exames de imagem adicionais como RM de encéfalo e cintilografia óssea devem ser solicitados apenas se o paciente apresentar sintomas que elevem a suspeição clínica do acometimento destes sítios uma vez que metástases cerebrais e ósseas são menos comuns, principalmente em pacientes sem evidência de acometimento secundário de sítios mais comuns como fígado e pulmões.

O uso rotineiro da tomografia por emissão de pósitron acoplada à TC (PET-TC) ainda precisa ser validado^{13,14}. No entanto, este é um exame frequentemente solicitado no estadiamento inicial ou no momento da recorrência quando a ressecção cirúrgica da mesma (metastasectomia) é considerada.

1.3.3 Diagnóstico histopatológico

A avaliação histopatológica do tumor é determinante para o diagnóstico final do CCS sendo, no grupo adulto, fundamental⁴. Uma vez que o CCS pode ser não funcionante, a determinação da origem adrenocortical do tumor é a primeira etapa desta avaliação. A segunda etapa consiste na avaliação de diversos parâmetros macroscópicos e microscópicos com o objetivo de diferenciar os tumores benignos dos tumores malignos³.

Vários sistemas foram propostos para definir malignidade do ponto de vista microscópico dentre os tumores adrenocorticais, sendo o sistema proposto por Weiss, em 1984, o escore mais validado para este fim e, também, o mais utilizado³. Este sistema compreende nove parâmetros histopatológicos: três relacionados à estrutura do tumor (presença ou ausência de necrose, padrão arquitetural e porcentagem de células claras), três relacionados à estrutura celular (presença ou ausência de mitoses atípicas, número de mitoses e pleomorfismo nuclear) e três relacionados à invasão (presença ou ausência de invasão vascular, invasão sinusoidal e invasão capsular) (Anexo Ia). Em 2002, um sistema de Weiss modificado foi proposto excluindo-se quatro parâmetros do sistema original que se mostraram mais subjetivos e de difícil interpretação (Anexo Ib).

Considerando-se o escore de Weiss original ou o modificado, um tumor do córtex suprarrenal é definido como carcinoma (tumor maligno) quando apresenta pelo menos três critérios¹⁵. O índice mitótico elevado e a presença de mitoses atípicas estão relacionados com uma evolução desfavorável da doença¹⁶.

1.3.3.1 Marcadores tumorais

A imuno-histoquímica (IHQ) pode ser utilizada para diferenciar, com segurança, tumores do córtex suprarrenal de outras massas suprarrenais, além de comprovar a origem adrenocortical de metástases. Os marcadores melan-A e inibina são rotineiramente usados com este objetivo, mas sabe-se que sua acurácia diagnóstica é limitada. O fator esteroideogênico 1 (SF-1), um fator de transcrição envolvido no desenvolvimento da glândula suprarrenal, mostrou-se como sendo o melhor marcador independente disponível para determinar a origem adrenocortical de uma massa adrenal e/ou de uma metástase de CCS, com alta sensibilidade e especificidade¹⁷.

A alta expressão do antígeno Ki67, uma proteína nuclear, é um índice validado de proliferação celular e, atualmente, é considerado o parâmetro histopatológico que oferece a maior predição de sobrevida^{9,18,19}.

Outros marcadores moleculares passíveis de avaliação utilizando a IHQ e que já foram descritos como fatores prognósticos no CCS são: p53, SF-1, IGF2, β -catenina, DICER1 e LIN28^{5,17,20}. Todavia, o único marcador que é utilizado rotineiramente na prática clínica atual é o Ki67¹⁸.

1.4 Estadiamento

O estadiamento ao diagnóstico é um importante fator prognóstico em pacientes com CCS, sendo utilizada a classificação proposta pela ENSAT (Anexo II)²¹. Esta classificação define os estádios I e II como tumores localizados com um tamanho ≤ 5 cm e > 5 cm, respectivamente. O estágio III é caracterizado pela infiltração de tecidos adjacentes, linfonodos positivos ou trombo tumoral na veia cava ou veia renal, enquanto o estágio IV é definido pela presença de metástases à distância.

1.5 Prognóstico

Os principais determinantes prognósticos do CCS são o estadiamento e a extensão da ressecção cirúrgica (*status* da ressecção)¹. Entretanto, diversos outros fatores

interferem no risco de recorrência local ou à distância e influenciam a sobrevida dos pacientes; a identificação destes fatores é de grande relevância para o seguimento dos pacientes.

- Estadiamento: entre os pacientes que se apresentam no estágio I ao diagnóstico, observa-se uma sobrevida de 66 a 82% em 5 anos; no estágio II e III esta é de 58 a 64% e 24 a 50%, respectivamente. No estágio IV a sobrevida em 5 anos diminui de forma significativa, sendo de 0 a 28%¹¹.
- *Status* da ressecção: nos pacientes com doença localizada ao diagnóstico, o tratamento cirúrgico é a intervenção mais importante e a ressecção completa (*status* de ressecção R0) correlaciona-se com um melhor prognóstico. A ressecção incompleta, identificada na microscopia (R1) ou na macroscopia (R2) e um *status* de ressecção desconhecido (Rx) estão associados a uma sobrevida inferior³.
- Funcionalidade: o hiperandrogenismo isolado é um fator independente associado a um melhor prognóstico. Por outro lado, os CCSs secretores de cortisol, incluindo aqueles com secreção mista (cortisol e andrógenos) tendem a apresentar um comportamento mais agressivo, possivelmente em decorrência dos efeitos imunossupressores do cortisol^{22,23}. Os raros casos com produção estrogênica também caracterizam um grupo de tumores com comportamento mais agressivo.
- Ki67: o marcador de proliferação celular Ki67 é considerado o fator isolado mais importante para prever recorrência em pacientes submetidos à ressecção cirúrgica completa do tumor primário (*status* de ressecção R0)¹⁸. Ainda, o índice Ki67 é capaz de prever a mortalidade doença-específica dos pacientes com CCS²⁴.
- Aspectos moleculares:
 - Fator esteroideogênico 1 (SF-1): a análise da expressão proteica do SF-1 utilizando a IHQ tem, além de um alto valor na confirmação da origem adrenocortical da neoplasia, um alto valor prognóstico. Os CCSs que apresentam expressão forte do SF-1 têm um prognóstico mais reservado do que aqueles que apresentam expressão fraca deste marcador¹⁷.
 - Genes *DGL7*, *BUB1B* e *PINK1*: um estudo que analisou o perfil de expressão gênica de 94 CCSs de adultos demonstrou que os genes *DGL7* e *PINK1*, envolvidos na regulação do ciclo celular, foram diferentemente expressos entre tumores recorrentes e não recorrentes²⁵. A hiperexpressão

do *DGL7* em células tronco de modelos animais inibe a diferenciação e estimula o crescimento celular²⁶. Além disso, o cálculo da diferença da expressão dos genes *BUB1B* e *PINK1* foi um fator preditivo significativo de redução da sobrevida global (SG) dos pacientes²⁵. A importância prognóstica da expressão combinada dos genes *BUB1B* e *PINK1* foi posteriormente validada nos CCSs de pacientes adultos seguidos no HC-FMUSP²⁷.

- Hipermetilação do *G0S2*: a hipermetilação e o silenciamento do gene *G0S2* (G0/G1 Switch 2) são encontrados em cerca de 40% dos CCSs. Essa assinatura molecular define um subgrupo de pacientes que apresenta uma menor sobrevida livre de doença e uma menor SG, de forma que o silenciamento do *G0S2* também é considerado um fator preditivo independente de recorrência e óbito²⁸.
- Gene *ZNRF3*: mutações somáticas inativadoras e deleções em homozigose do *ZNRF3* induzem à ativação da via Wnt/ β -catenina, e por isso o *ZNRF3* é considerado um novo gene supressor tumoral²⁹. O CCS é a neoplasia que apresenta com maior frequência alterações no *ZNRF3* e foi demonstrado previamente que pacientes com tumores que apresentam alterações neste gene apresentam uma menor taxa de SG em relação aos pacientes sem alterações³⁰.
- Metilação do DNA: a metilação do DNA está envolvida na patogênese de várias doenças, entre elas, o câncer. Em comparação com células normais, células tumorais exibem um metiloma diferenciado no qual padrões de hipometilação e hipermetilação podem ser observados³¹. A hipermetilação das ilhas “CpG”, as quais estão localizadas nas regiões regulatórias dos genes, contribui para a inativação de genes supressores tumorais. A hipermetilação das ilhas “CpG” no CCS caracteriza um subgrupo de pacientes com piores desfechos clínicos e pior prognóstico^{32–34}; estes resultados já foram, inclusive, confirmados por meio da classificação molecular dos pacientes com CCS do projeto *Cancer Genome Atlas*³⁵.

1.6 O tratamento do carcinoma do córtex suprarrenal

A ressecção cirúrgica completa nos casos de doença localizada consiste no tratamento curativo que oferece a maior sobrevida a longo prazo. No entanto, apesar da ressecção completa (*status* de ressecção R0) ser um importante fator prognóstico, ela não previne a recorrência da doença³⁶. As altas taxas de recorrência da doença (75 – 80%)³⁷, localmente e à distância, motivam a instituição de modalidades terapêuticas adicionais à cirurgia na maioria dos pacientes. Para os pacientes com doença irressecável ou metastática ao diagnóstico, todas as alternativas terapêuticas de que se dispõe são paliativas, inclusive o tratamento cirúrgico, quando considerado.

Um tratamento bem estabelecido para o CCS é o tratamento com o quimioterápico oral mitotano, sendo este utilizado tanto no contexto adjuvante (tratamento realizado após o tratamento cirúrgico e ressecção completa do tumor primário com o objetivo de diminuir o risco de recorrência nos pacientes que apresentam alto risco para tal) quanto no contexto de doença avançada (tratamento paliativo); na última, em geral, em associação com outras drogas³⁸. No contexto adjuvante, o estudo prospectivo multicêntrico que está em andamento (ADIUVO-Trial - NCT00777244 ([ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov))) tem como finalidade avaliar o benefício desta medicação no contexto adjuvante em pacientes com baixo e intermediário risco de recorrência (estádio ENSAT 1-3, *status* de ressecção R0, e índice Ki67 $\leq 10\%$).

1.6.1 Mitotano

O mitotano [1-(2-clorofenil)-1-(4-clorofenil)-2,2-dicloroetano, (o,p'-DDD)] é a única droga aprovada para o tratamento do CCS avançado desde a década de sessenta (até o momento nenhuma droga foi formalmente aprovada em bula com a finalidade de adjuvância)³⁹.

A primeira publicação sobre o uso do mitotano em indivíduos com CCS provém de 1959⁴⁰ e, desde então, tem sido demonstrado o efeito desta droga em termos de inibição da esteroidogênese (efeito anti-hormonal) e de destruição celular (efeito citotóxico)⁴¹. No entanto, apesar do longo tempo de uso e da experiência com esta droga, os mecanismos de ação subjacentes aos seus efeitos acima descritos ainda não se encontram claramente definidos³⁹. Além disso, há muitas áreas de incerteza em relação ao uso desta droga, como por quanto tempo usá-la e o que esperar em termos de resposta terapêutica.

A ação do mitotano na esteroidogênese suprarrenal está associada à inibição e à menor expressão de enzimas dependentes (CYP11A1, CYP11B1 e CYP11B2) e independentes (3 β hidroxisteróide desidrogenase) do citocromo P450⁴². As enzimas mais sensíveis ao mitotano em concentrações não citotóxicas são a StAR (*steroidogenic acute regulatory protein*) e a CYP11A1, enzimas de maior importância já que estão envolvidas na etapa limitante da esteroidogênese⁴¹.

Já que a maioria das reações enzimáticas da biossíntese de hormônios esteroides ocorre na mitocôndria, a hipótese da indução de um defeito na cadeia respiratória mitocondrial pelo mitotano ser responsável pela inibição da esteroidogênese e morte celular foi aventada em estudos francês e italiano realizados em 2013^{41,43}.

A metabolização do mitotano em metabólitos ativos parece ser importante para o seu efeito terapêutico. O mitotano é metabolizado em dois metabólitos: 1,1-(o,p-diclorodifenil)2,2-dicloroetano (o,p'DDE) e 1,1-(o,p-diclorodifenil) ácido acético (o,p'DDA) por meio de α -hidroxilação e β -hidroxilação, respectivamente⁴⁴. Os estudos são conflitantes em relação ao papel destes metabólitos e em relação a qual destes dois metabólitos apresenta maior correlação com a resposta clínica com o uso do mitotano⁴⁵. Possíveis interferências na metabolização do mitotano em seus metabólitos ativos poderiam ser responsáveis por potenciais diferenças nas concentrações plasmáticas e na resposta terapêutica a esta droga⁴⁵.

Recentemente foi demonstrado que o mitotano sensibiliza as células do CCS à radiação ionizante por meio da atenuação do reparo do DNA, sugerindo que esta droga também exerça algum tipo de interação com o material genético das células⁴⁶.

De forma paralela à disponibilidade insuficiente que se tem atualmente em relação a fatores prognósticos do CCS, poucos fatores preditivos da eficácia do tratamento já foram identificados. As concentrações plasmáticas do mitotano (mitotanemia) consistem no único fator preditivo de resposta a esta droga disponível até o momento; a manutenção de concentrações plasmáticas de mitotano (mitotanemia) acima de 14mg/L estão associadas à maior sobrevida livre de progressão (SLP) e à maior sobrevida livre de recorrência (SLR) quando utilizado no manejo da doença avançada e no contexto adjuvante, respectivamente⁴².

A identificação de novos fatores preditivos de resposta ao mitotano se faz necessária uma vez que o tratamento com esta droga em geral é mantido por um longo período (anos), necessita de monitorização das suas concentrações plasmáticas e está

associado a uma alta prevalência de efeitos adversos e de interações medicamentosas. As interações medicamentosas se devem principalmente pela potente indução da CYP3A4 pelo mitotano, a qual resulta na rápida metabolização de drogas em uso concomitante ao mitotano com menor efeito terapêuticos destas; tal interação é vista, por exemplo, no uso concomitante do mitotano com inibidores da tirosina-quinase⁴⁵. A indução desta isoforma do citocromo P450 implica também na necessidade de um regime menos habitual de reposição de esteroides durante o seu uso, como glicocorticoides de curta ação em doses significativamente mais elevadas ou glicocorticoides que apresentem tempo de meia-vida plasmática mais prolongado¹¹.

1.6.2 Outras modalidades terapêuticas

A radioterapia adjuvante do leito tumoral (ARDT) pode ser considerada em pacientes com CCS submetidos à ressecção cirúrgica completa do tumor primário que apresentam alto risco de recorrência (*status* de ressecção R0, mas tumores grandes, *status* de ressecção R1 ou estágio ENSAT 3). Os poucos estudos que avaliaram esta modalidade até o momento foram retrospectivos e envolveram coortes com número pequeno de pacientes; alguns destes demonstraram melhora do controle local com menor taxa de recorrência local; outros não demonstraram qualquer benefício. Um estudo recente publicado por Gharzai *et al.* demonstrou impacto positivo da ARDT na SLR e, pela primeira vez, também na SG de pacientes com CCS submetidos à ressecção cirúrgica, independentemente do *status* de ressecção⁴⁷.

A terapia citotóxica (quimioterapia sistêmica com cisplatina, etoposídeo e doxorrubicina), a imunoterapia (inibidores de “*checkpoints*” do sistema imune (PD-1, PDL-1 e CTLA-4), as terapias-alvo (inibidores de quinases) e a ablação por radiofrequência e a crioablação são outras modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do CCS avançando, muitas vezes em associação com o mitotano^{38,48-50}. Enquanto que com a primeira modalidade foi demonstrado um impacto positivo em termos de sobrevida livre de progressão (SLP), mas não em relação à SG⁵¹, os resultados dos estudos até o momento disponíveis para a segunda e terceira modalidades são desanimadores⁴⁹. A ablação por radiofrequência e a crioablação, por sua vez, vêm ganhando espaço no tratamento de recorrências de baixo volume⁵⁰.

1.7 A proteína SOAT1

A esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1) é uma proteína codificada pelo gene *SOAT1*; este, por sua vez, é alvo do fator de transcrição esteroideogênico 1 (SF-1, NR5A1) na glândula suprarrenal humana.

A proteína SOAT1 é expressa em diferentes órgãos, entretanto, nas células do córtex suprarrenal observa-se a sua maior expressão. A SOAT1, uma proteína com função enzimática, está presente no retículo endoplasmático (RE), sendo responsável pela regulação da formação de ésteres de colesterol a partir do colesterol livre. Esta proteína é essencial para a homeostase intracelular do colesterol, mantendo concentrações apropriadas de colesterol não esterificado no interior das células para a estabilidade de suas membranas e protegendo as células suprarrenais dos efeitos potencialmente prejudiciais das moléculas de colesterol livre em excesso⁵² (Figura 1).

Figura 1. Ilustração esquemática da função da proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1). A SOAT1, proteína localizada no retículo endoplasmático, é responsável pela conversão enzimática das moléculas de colesterol livre e de ácidos graxos livres em colesterol esterificado. As estruturas ricas em colesterol esterificado são chamadas de “*lipid droplets*” (identificadas nos círculos em azul).

RLDL, receptor do LDL-colesterol; MP, membrana plasmática; AGL, ácidos graxos livres; COL, colesterol livre; RE, retículo endoplasmático; CE, colesterol esterificado; SOAT1, proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1; N, núcleo; M, mitocôndria.

As propriedades das moléculas de colesterol esterificado, sobretudo no que tange à sua solubilidade, tornam estas moléculas ideais para o estoque de colesterol, o qual

ocorre principalmente no citoplasma no interior das partículas de gordura (“*lipid droplets*”). Uma maior disponibilidade de moléculas de colesterol esterificado leva a um aumento da proliferação e da invasividade celular, sugerindo que tais moléculas possam contribuir para um fenótipo de proliferação celular, iniciação, promoção e progressão tumoral⁵³.

Na última década houve uma expansão considerável no conhecimento dos mecanismos que regulam a formação e as funções das partículas de gordura (ou “*lipid droplets*”) no câncer. Quando consideramos as principais características que diferenciam as células cancerosas das células normais, sintetizadas por Hanahan e Weinberg em uma das principais publicações em oncologia em 2000 (“The Hallmarks of Cancer”)⁵⁴ e revisitadas pelos mesmos autores em 2011⁵⁵, as “*lipid droplets*” estão associadas à maioria delas. Estas partículas associam-se às características listadas abaixo que estão sublinhadas (7 das 10 características centrais das células cancerosas)⁵⁶:

- Reprogramação do metabolismo energético;
- Potencial replicativo ilimitado;
- Evasão do sistema imune;
- Promoção de processos inflamatórios;
- Sinalização de proliferação celular sustentada;
- Instabilidade genômica e mutações;
- Resistência a mecanismos de apoptose celular;
- Indução da angiogênese;
- Capacidade de invasão celular e tecidual e disseminação metastática;
- Escape dos processos inibitórios de proliferação.

Evidências recentes demonstram que o metabolismo lipídico, de fato, é submetido a uma reprogramação nas células cancerosas, condição esta observada em diferentes neoplasias malignas. No glioblastoma multiforme, a esterificação do colesterol e a formação destas partículas ricas em moléculas de colesterol esterificado (“*lipid droplets*”) constituem uma característica marcante desta neoplasia e correlacionam-se de forma diretamente proporcional com a sua agressividade e de forma inversamente proporcional com a SG⁵⁷. No carcinoma hepatocelular, um subgrupo de pacientes que se caracteriza pela presença de alterações na homeostase do colesterol apresenta a menor taxa de SG e o maior risco de uma evolução desfavorável; de forma interessante, a assinatura

molecular deste subgrupo de pacientes é a alta expressão da SOAT1⁵⁸. Ainda, os dados publicados no Atlas de Patologia Humana (www.proteinatlas.org/pathology) evidenciam que a regulação positiva da SOAT1 também se correlaciona com a SG no câncer de tireoide ($n = 501$; $p = 0,047$), no câncer de cabeça e pescoço ($n = 499$; $p = 0,002$), no câncer gástrico ($n = 354$; $p = 0,005$) e no câncer renal ($n = 877$; $p = 0,007$). Da mesma forma, um aumento da expressão da SOAT1 também já foi relatado no câncer de próstata e no câncer de pâncreas e foi associado, nestas duas malignidades, a um pior prognóstico^{59,60}.

Considerando a homogeneidade dos dados acima, sugere-se de forma bastante consistente que a expressão elevada da proteína SOAT1 pode ser considerada uma característica de diferentes neoplasias malignas e que esta proteína deve ser avaliada como um marcador prognóstico e possível alvo terapêutico para diferentes cânceres.

Em 2015, Sbiera *et al.* demonstraram que a inibição *in vitro* da SOAT1 resultou em um prejuízo na esteroidogênese suprarrenal e na viabilidade de células de CCS. Isto ocorreu principalmente devido ao estresse do RE desencadeado pela redução da formação de ésteres de colesterol e consequente acúmulo das moléculas de colesterol livre e dos ácidos graxos livres no microambiente intracelular³⁹. À perpetuação do estresse do RE procedeu o aumento da expressão de genes pró-apoptóticos e a redução da expressão de genes anti-apoptóticos e, em última análise, a apoptose celular. Além disso, este processo resultou na menor expressão de genes envolvidos na esteroidogênese suprarrenal e na menor síntese hormonal. Este mesmo estudo descreveu a SOAT1 como um dos alvos moleculares da ação do mitotano.

Até o presente momento, nenhum estudo abordou o impacto da expressão da SOAT1 no prognóstico e nos desfechos clínicos dos pacientes com CCS.

2 OBJETIVOS

- Correlacionar a expressão gênica e proteica da SOAT1 com parâmetros clínicos, hormonais, histológicos (microscópicos) e com a evolução clínica dos pacientes com carcinoma do córtex suprarrenal.
- Avaliar a expressão proteica da SOAT1 no tumor primário *versus* a expressão proteica deste marcador em metástases de carcinoma do córtex suprarrenal em diferentes sítios.
- Comparar a expressão proteica da SOAT1 com a expressão do SF-1 em carcinomas primários e em metástases de carcinoma do córtex suprarrenal.
- Avaliar o impacto da expressão proteica da SOAT1 na resposta ao tratamento com mitotano.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [HC-FMUSP (parecer nº 2.291.546)]. O termo de consentimento livre e esclarecido por escrito foi lido e assinado por todos os pacientes ou responsáveis (Anexo III).

3.2 Casuística

Foram estudados um total de 112 carcinomas primários do córtex suprarrenal de 112 pacientes adultos independentes e 42 metástases (recorrências locais ou à distância) de CCS de 19 pacientes independentes.

Todos os casos de CCS referem-se a casos de pacientes adultos operados pela equipe do Serviço de Urologia do HC-FMUSP e a casos operados em serviços externos, mas que, após a cirurgia, foram encaminhados para acompanhamento e seguimento pela equipe do Serviço de Endocrinologia do HC-FMUSP no período entre 1979 e 2017. As metástases referem-se a casos de pacientes que estão ou estavam em acompanhamento regular no HC-FMUSP ou ICESP e que foram submetidos à ressecção cirúrgica da metástase (metastasectomia).

O relatório anatomopatológico foi revisado e o diagnóstico do tumor primário e da metástase foi confirmado em todos os casos.

Em relação aos tumores primários foram coletados os seguintes dados: gênero do paciente, idade do paciente quando do diagnóstico, apresentação clínico-laboratorial ao diagnóstico, lado do tumor (esquerdo, direito ou bilateral), tamanho do tumor em centímetros (cm), peso do tumor em gramas (g), estadiamento (ENSAT), escore de Weiss e escore de Weiss modificado e índice Ki67 (%). Em relação à evolução clínica, foram avaliados a presença de recorrência ou progressão da doença (para os casos localizados e para os casos metastáticos ao diagnóstico, respectivamente), o tempo para a recorrência e para a progressão da doença (em meses), a evolução para óbito decorrente do CCS e o tempo para o óbito decorrente do CCS (em meses).

Em relação às metástases as seguintes informações foram coletadas: número de metástases por paciente, sítios das metástases, tempo entre a ressecção do tumor primário e a ressecção da metástase (em meses), *status* funcional da metástase (produção hormonal) e tamanho da lesão metastática (cm). Do ponto de vista histológico, o escore de Weiss foi calculado após adaptação deste escore para metástases (o critério invasão

venosa foi considerado presente/positivo em todas as metástases e o critério invasão da cápsula tumoral não foi considerado); o índice Ki67 (%) também foi avaliado.

3.2.1 População para avaliação da expressão proteica da *SOAT1*

Para a análise da expressão proteica da *SOAT1*, incluímos os espécimes cirúrgicos de todos os 112 carcinomas primários e de todas as 42 metástases.

Todas as lâminas histológicas e respectivos blocos de parafina foram levantados e avaliados, bem como os respectivos relatórios anatomopatológicos e toda a história e a evolução clínica, laboratorial e radiológica.

3.2.2 População para avaliação da expressão do gene *SOAT1*

Para a análise da expressão do gene *SOAT1* foram selecionados todos os casos em que se estudou a expressão proteica do tumor primário e nos quais o tecido conservado em nitrogênio líquido estava disponível.

As metástases não foram avaliadas em relação à expressão gênica dada a indisponibilidade de tecido conservado em nitrogênio líquido para a realização dos estudos moleculares.

Figura 2. Série de carcinomas do córtex suprarrenal para a análise da expressão proteica e imuno-histoquímica e para análise da expressão gênica através da quantificação do RNA mensageiro. IHQ, imuno-histoquímica; RNAm, RNA mensageiro

Figura 3. Série de metástases de carcinoma do córtex suprarrenal para a análise da expressão proteica e imuno-histoquímica.

IHQ, imuno-histoquímica

3.3 Avaliação da Expressão Proteica

A avaliação da expressão proteica foi realizada por meio da confecção de três micromatrizes teciduais (TMAs). Esta tecnologia é uma ferramenta para estudo de um número grande de casos simultaneamente e caracteriza-se pela construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras teciduais ou tumorais obtidas de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais^{61,62}. As lâminas histológicas obtidas a partir dos blocos de TMAs podem ser utilizadas em diversas técnicas, entre elas a técnica de IHQ, sendo possível conhecer a expressão de um determinado marcador em centenas de amostras ao custo de uma única reação.

Desta forma, o uso dos TMAs propicia a validação proteica de dados obtidos em plataformas de expressão gênica, sendo um instrumento importante para a rápida obtenção de informações a respeito de uma população tumoral além de favorecer a uniformidade das condições experimentais^{63,64}.

Foram confeccionados dois TMAs para os tumores primários – o primeiro TMA (TMA₁) contém amostras teciduais de casos diagnosticados entre 1979 e 2012 e, o segundo TMA (TMA₂), contém amostras teciduais de casos diagnosticados entre 2012 e 2017. Um terceiro TMA (TMA₃) contendo amostras teciduais de metástases foi confeccionado – as amostras aqui incluídas referem-se, em sua grande maioria, a metástases originadas de tumores primários de casos contidos no TMA₁ e no TMA₂ que evoluíram com recorrências locais e/ou à distância e as quais foram submetidos à ressecção cirúrgica (metastasectomia).

3.3.1 Micromatrizes teciduais dos tumores primários

As áreas mais representativas do tumor primário dos casos incluídos no estudo foram selecionadas nas lâminas histológicas coradas pela hematoxilina e eosina levantadas do arquivo. Essas áreas foram marcadas sobre cada lâmina histológica através de pontos com o uso de canetas hidrográficas próprias para marcação não lavável. Foram utilizadas canetas de duas cores diferentes, marrom e vermelho; as áreas representativas do centro do tumor primário foram marcadas com caneta de cor marrom e aquelas representativas da periferia do tumor com caneta de cor vermelha. Foram selecionadas quatro áreas representativas do centro do tumor e duas áreas representativas da periferia do tumor. Estas marcas foram então transferidas para os blocos de parafina, estes designados blocos doadores.

Figura 4. Ilustração exemplificando as áreas de interesse assinaladas nas lâminas e nos respectivos blocos (blocos doadores).

Os pontos marcados nos blocos de parafina doadores, também chamados cilindros ou *spots*, em um total de seis por caso, foram então transferidos para seis blocos de parafina receptores os quais constituíram os blocos de TMA propriamente ditos. Para a confecção dos blocos de TMA foram utilizados os seguintes itens:

- Planilhas contendo a exata localização de cada cilindro dentro do respectivo bloco de TMA, em um sistema de coordenadas cartesianas de linhas e colunas;
- Um instrumento mecânico para confecção de TMA, marca *Beecher InstrumentsTM* (*Sun Prairie, Wisconsin, EUA*), sendo escolhidas agulhas perfuradoras com diâmetro de 1,0 mm, uma profundidade de perfuração de 0,6 cm e distância entre os cilindros de 0,3 mm.

Após a confecção dos seis blocos, três blocos de TMA foram cortados ao micrótomo em cortes consecutivos com a espessura de 3 μm (*Leica Instruments, Singapura*) e numerados sequencialmente. Foi analisado o intervalo com menor perda e selecionadas três lâminas referentes aos três blocos do TMA₁ e três lâminas referentes aos três blocos do TMA₂ (duas lâminas contendo amostras centrais do tumor e uma lâmina contendo amostra da periferia do tumor) para as reações de IHQ para o marcador de interesse (SOAT1).

3.3.2 Micromatriz tecidual das metástases

O mesmo processo acima descrito foi realizado para confecção do TMA de metástases de CCS para diferentes sítios (TMA₃). Para este TMA foram selecionadas seis áreas doadoras de cada lesão metastática, três correspondentes ao centro da lesão (marcação em cor verde) e três correspondentes à periferia da lesão (marcação em cor vermelho). Foram confeccionados dois blocos, o primeiro contendo duas amostras do centro e uma amostra da periferia de cada lesão metastática e, o segundo, contendo uma amostra do centro e duas amostras da periferia de cada lesão metastática. Após a confecção dos dois blocos, um bloco (o primeiro) foi cortado ao micrótomo em cortes consecutivos com a espessura de 3 μm (*Leica Instruments, Singapura*), tendo sido os cortes numerados sequencialmente.

3.3.3 Imuno-histoquímica

Para a realização do procedimento de IHQ das lâminas de TMA, foram realizadas as seguintes etapas descritas abaixo:

- Desparafinização dos cortes de 3 μm de espessura do material incluído em parafina através de incubação com xilol a 60 °C por 20 minutos seguido de outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 20 minutos.
- Hidratação dos cortes com etanol em concentrações variadas – 3 banhos de etanol a 100% de 30 segundos cada, 1 banho de etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos em cada uma destas concentrações e lavagem com água corrente e água destilada.
- Recuperação antigênica mediante a incubação das lâminas em solução de tampão citrato pH 6.0 (PMB1-125 (*Spring Bioscience, Pleasanton, Califórnia, EUA*)) ou solução tampão Tris-EDTA, pH 9.0 (PMB4-125 (*Spring Bioscience, Pleasanton,*

Califórnia, EUA)) em panela a vapor - após a fervura da água da panela com a cuba de solução de recuperação, foi colocado o suporte com as lâminas, as quais assim permaneceram por 35 minutos. Após esse período, deixou-se as lâminas esfriarem por 20 minutos à temperatura ambiente e procedeu-se a lavagens em água corrente e água destilada.

- Bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 6% diluída v/v em metanol através de 3 banhos, cada um com 10 minutos de duração.
- Lavagem das lâminas em água corrente e água destilada.
- Lavagem das lâminas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.
- Bloqueio de proteínas inespecíficas com Cas Block™ (*Invitrogen by Life Technologies, Carlsbad, Califórnia, EUA*) catálogo nº 00-8120 por 10 minutos a 37 °C seguido da incubação com o anticorpo primário.
- Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (*Sigma, EUA*) a 1% e azida sódica NaN_3 (*Inlab, São Paulo, Brasil*) a 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 minutos a 37 °C e, em seguida, 18 horas (*overnight*) a 4 °C;
 - Anticorpo anti-SOAT1 (título 1:4000; ab39327; *Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA*).
- Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
- Incubação com o bloqueador pós-primário (*Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltda*), referência RE7 159, por 30 minutos a 37 °C.
- Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
- Incubação com NovoLink (*Polimer, Leica Biosystems, Newcastle Ltda, Reino Unido*), referência RE7 161, por 30 minutos a 37 °C.
- Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
- Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (*Sigma, EUA*) a 0,1%, H_2O_2 a 0,06%, dimetil sulfóxido (*Labsynth*) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37 °C.
- Lavagens em água corrente e água destilada.

- Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto seguida de lavagens em água corrente e água destilada. Após, imersão rápida em solução de hidróxido de amônia a 0,5% seguida de lavagens em água corrente e água destilada.
- Desidratação dos cortes através de banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (3 trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (3 trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (*Entellan*, código 1.07961.0100, Merck, Darmstadt, Alemanha) com lamínula.

Os controles utilizados na reação de IHQ compreenderam um controle positivo para o anticorpo em estudo e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os demais procedimentos imuno-histoquímicos.

Além disso, mais uma triplicata de lâminas foi corada com anticorpo monoclonal contra o antígeno Ki67 (título 1:40; clone MIB-1; *M7240*; *Dako*, Dinamarca) e uma outra triplicata foi corada com o anticorpo monoclonal contra o antígeno SF-1 (Anti-NR5A1, título 1:100; 434200; *Invitrogen*, Carlsbad, Califórnia, EUA). Os procedimentos acima descritos foram realizados no laboratório de investigação médica 14 (LIM14) e no laboratório de imuno-histoquímica da FMUSP, respectivamente.

3.3.3.1 Análise da imuno-histoquímica (SOAT1)

A avaliação das lâminas de TMA para análise da imunorreatividade da proteína SOAT1 foi realizada por dois patologistas especialistas em córtex suprarrenal e de forma independente: Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini e Dr. Iberê Cauduro Soares.

Em um momento prévio ao início das análises foi realizado um estudo piloto para o marcador de interesse com a participação dos dois patologistas (Anexo V). A análise propriamente dita ocorreu em momentos diferentes para cada patologista, de forma cega e independente e foram determinados os coeficientes de concordância Kappa e de correlação intraclasse (ICC).

Em cada cilindro de amostras tumorais foi avaliada a imunorreatividade do compartimento citoplasmático para o anticorpo anti-SOAT1. A intensidade da imunorreatividade foi avaliada em uma escala de zero a um (Tabela 2) e a extensão

(percentual de células tumorais positivas) foi avaliada em uma escala de zero a quatro (Tabela 3).

Tabela 2. Pontuação de acordo com a intensidade da imunorreatividade.

Intensidade	Pontuação
Ausente	0
Fraca/intermediária	0,5
Forte	1

Tabela 3. Pontuação de acordo com a extensão da imunorreatividade.

Extensão	Categoria
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Um escore semiquantitativo (escore H modificado) foi obtido utilizando o produto da intensidade pela extensão da imunorreatividade e variou de zero a quatro. Como cada amostra tumoral foi analisada em triplicata e por dois patologistas, a moda dos seis escores de imunorreatividade de cada caso foi utilizada para definir o seu escore final de imunorreatividade.

Considerando os TMAs dos carcinomas primários e das metástases, a concordância interobservador foi substancial para a análise da imunorreatividade da SOAT1 quando avaliada pelo coeficiente de concordância Kappa e foi alta quando avaliada pelo coeficiente ICC (Tabelas 4 e 5; Anexo VIa e VIb).

Tabela 4. Análise da concordância entre os dois observadores utilizando o coeficiente de concordância Kappa.

	Kappa	Erro padrão	<i>p</i>
SOAT1	0,779	0,046	<0,0001

SOAT1, proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1

Tabela 5. Análise da concordância entre os dois observadores utilizando o coeficiente de correlação intraclass.

Variável	ICC	IC (95%)		p
		Inferior	Superior	
SOAT1	0,889	0,853	0,916	<0,0001

SOAT1, proteína esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1; ICC, coeficiente de correlação intraclass; IC (95%), intervalo de confiança 95%

3.3.3.2 Análise da imuno-histoquímica (Ki67)

As lâminas foram escaneadas por aparelho de *scanner* próprio para lâminas histológicas e pelo software Pannoramic Viewer 1:15 (3DHISTECH, Budapeste, Hungria). Todas as imagens foram processadas utilizando o *software Image Pro Plus 4.5* (MediaCybernetics, Rockville, MD, EUA) e os núcleos positivos e o total de núcleos foram automaticamente contabilizados.

3.3.3.3 Análise da imuno-histoquímica (SF-1)

A análise da imunorreatividade para a proteína SF-1 foi realizada pelo patologista especialista em córtex suprarrenal Dr. Marcelo Luiz Balancin. Em um momento prévio ao início das análises também foi realizado um estudo piloto para este marcador (Anexo V). A extensão da imunorreatividade para o SF-1 no compartimento nuclear (percentual de células tumorais positivas) foi avaliada em uma escala de zero a quatro (Tabela 6).

Cada amostra tumoral foi analisada em triplicata, o escore mais alto foi utilizado para definir o escore final de imunorreatividade de cada caso.

Tabela 6. Pontuação de acordo com a extensão da imunorreatividade.

Extensão	Categoria
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

3.4 Avaliação da expressão gênica

3.4.1 Extração de RNA e síntese de cDNA

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual e armazenados em nitrogênio líquido até a realização da extração de RNA. O RNA total das amostras foi extraído a partir dos tecidos congelados e conservados em nitrogênio líquido utilizando o produto comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (*Qiagen, Hilden, Alemanha*), conforme o seu protocolo. A qualidade do RNA extraído foi avaliada a partir da relação de absorbância $A_{260/280}$ e da integridade das bandas de RNA ribossômico em gel de agarose 1% após eletroforese. A relação de absorbância $A_{260/280}$ foi maior que 1,8 em todas as amostras. As concentrações das amostras de RNA total foram determinadas em espectrofotômetro. As amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando procedimento padrão. O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa (RT) utilizando-se o produto comercial Superscript III Reverse Transcriptase (*Invitrogen, Carlsbad, Califórnia, EUA*).

3.4.2 Estudo da expressão da *SOAT1* por PCR quantitativa em tempo real

A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho AriaMx (*Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA*) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema TaqMan: gene alvo (*SOAT1*, Hs00922322_m1) e endógenos (*GUSB*, β -glicuronidase, Hs 99999908_m1 e *CYC*, ciclofilina A, Hu_4326316E). Estes ensaios contêm oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas interexônicas para o fragmento amplificado, que garantem a não amplificação de DNA genômico. As sondas do gene alvo são marcadas com a fluorescência FAM, enquanto que as sondas dos genes endógenos são marcadas com a fluorescência VIC.

Durante a reação de PCR, o ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência (C_T) foi determinado e utilizado para a quantificação da expressão gênica. As reações de amplificação foram realizadas em uma etapa inicial de 95 °C por 10 minutos, seguida de 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto. A amplificação dos genes alvo foi normalizada pelas condições de amplificação da β -glicuronidase e da ciclofilina (controles endógenos) em cada amostra tumoral. Um grupo comercial de 25 tecidos adrenocorticais normais (*Human Adrenal Cortex Poly A⁺ RNA, Clontech, Mountain View, Califórnia, EUA*) foi utilizado como amostra de

referência da análise da quantificação relativa. A quantificação relativa foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ⁶⁵, onde o ΔC_T representa a diferença de expressão entre o gene alvo e o endógeno (média dos dois genes usados) de uma determinada amostra (tumor ou calibrador) e o $\Delta\Delta C_T$ corresponde à diferença entre o ΔC_T de uma amostra tumoral e o ΔC_T do calibrador. Os valores da expressão gênica representam o número de vezes em que o gene alvo está expresso no tecido tumoral em relação ao *pool* de tecido normal. A mediana de expressão foi utilizada para definir hipoexpressão ou hiperexpressão gênica. A expressão do gene *SOAT1* foi avaliada em relação às características clínicas, histológicas e à evolução clínica.

A validação do método $2^{-\Delta\Delta C_T}$ foi realizada pela construção de curvas de amplificação com concentrações progressivamente maiores de cDNA a fim de se avaliar se as eficiências de amplificação do gene alvo e endógenos foram comparáveis (inclinação da reta $< 0,1$). A eficiência da amplificação do gene *SOAT1* foi comparável à da *GUSB* e *CYC* (Gráficos 1 e 2) nas reações em *singleplex* (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos).

Gráfico 1. Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do gene *SOAT1* em relação ao gene endógeno *GUSB* (β -glicuronidase).

ΔC_T , Delta C_T ; cDNA, DNA complementar; *SOAT1*, gene que codifica a esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1; *GUSB*, gene que codifica a β -glicuronidase; Log, função logarítmica

Gráfico 2. Curva de eficiência de amplificação em *singleplex* do gene *SOAT1* em relação ao gene endógeno *CYC* (ciclofilina A).

ΔCT, Delta CT; cDNA, DNA complementar; *SOAT1*, gene que codifica a esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1; *CYC*, gene que codifica a ciclofilina A; Log, função logarítmica

3.5 Correlação entre a expressão proteica da *SOAT1* e a resposta ao mitotano

A avaliação do impacto da expressão proteica da *SOAT1* na resposta ao mitotano foi realizada em colaboração com um estudo multicêntrico que envolveu, além do HC-FMUSP, único centro participante do Brasil, outros onze centros da Europa. Este estudo teve como objetivo investigar a expressão proteica da *SOAT1* como marcador da resposta ao tratamento com mitotano, tanto no contexto do tratamento adjuvante com esta droga quanto no contexto do tratamento da doença avançada (tratamento paliativo).

3.5.1 Critérios de inclusão - tratamento com mitotano adjuvante

- Pacientes com CCS que foram submetidos à ressecção completa do tumor primário;
- Mitotano adjuvante em monoterapia iniciado até três meses da ressecção cirúrgica completa do tumor primário;
- Duração mínima de 6 meses do tratamento adjuvante com mitotano em monoterapia.

3.5.2 Critérios de inclusão - tratamento com mitotano no contexto de doença avançada (tratamento paliativo)

- Pacientes com CCS irressecável;
- Mitotano paliativo em monoterapia iniciado até três meses do diagnóstico da doença;
- Duração mínima de 2 meses do tratamento com mitotano em monoterapia;
- Disponibilidade de pelo menos uma avaliação radiológica durante este tratamento.

Em relação à nossa participação, avaliamos todos os 112 casos em relação à realização ou não de tratamento com mitotano no contexto adjuvante ou paliativo. Aqueles pacientes que foram submetidos a este tratamento e que tiveram os critérios de inclusão acima respeitados para ambos os grupos foram incluídos no estudo multicêntrico. Trinta (n = 30) casos preencheram os critérios, sendo 21 casos para o grupo tratamento adjuvante e 9 casos para o grupo tratamento da doença avançada. O HC-FMUSP foi o segundo centro que mais contribuiu em termos de número de casos.

Cada centro forneceu cinco lâminas histológicas de cada caso e as informações clínicas de interesse (gênero, idade ao diagnóstico, estágio tumoral ao diagnóstico de acordo com o sistema de estadiamento proposto pela ENSAT, padrão de secreção hormonal pelo tumor, escore de Weiss, índice Ki67, as concentrações plasmáticas do mitotano após três e seis meses do uso da droga e a resposta ao tratamento durante o seguimento de acordo com os critérios de resposta em tumores sólidos (RECIST)⁶⁶.

A reação de IHQ, apenas para responder este objetivo específico do estudo, foi realizada em cortes histológicos completos (uma lâmina histológica para cada caso (não foi realizada em TMA)). O mesmo anticorpo foi utilizado (anticorpo anti-SOAT1; ab39327; Abcam, Cambridge, Massachusetts, EUA) e também foi calculado um escore semiquantitativo para a análise da imunorreatividade. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas na Universidade de Wurzburg (Alemanha).

3.6 Análise estatística

Para a expressão proteica da SOAT1 foi avaliada a concordância entre as medidas dos avaliadores. O coeficiente de concordância Kappa foi calculado no contexto de variáveis qualitativas e o coeficiente de correlação intraclass para as variáveis de natureza quantitativa.

Com o objetivo de resumir as variáveis quantitativas foram consideradas as medidas-resumo de posição e dispersão, como média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo; com o objetivo de resumir as variáveis qualitativas foram utilizadas as frequências absoluta e relativa (%).

O teste exato de *Fisher* ou o teste de qui-quadrado (ou o teste de qui-quadrado com correção de continuidade) foi aplicado para a avaliação de possíveis associações entre variáveis qualitativas. A comparação das variáveis quantitativas em relação a dois grupos independentes foi realizada por meio do teste não paramétrico U de *Mann-Whitney* ou, quando houve indícios de normalidade dos dados, pelo teste-T para amostras independentes (o teste de *Shapiro-Wilk* foi aplicado para avaliar a normalidade dos dados).

A SG foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico do CCS e a data do óbito relacionado à doença ou da última visita de seguimento. A SLR foi definida como o tempo entre a data da ressecção tumoral completa e a data da primeira evidência radiológica de recorrência local ou à distância. A SLP foi definida como o tempo entre a data do diagnóstico e a data da primeira evidência radiológica de progressão da doença (de acordo com o RECIST)⁶⁶. Em relação às análises em que o tempo até o óbito, até a recorrência e até a progressão eram de interesse, a técnica de análise de sobrevivência foi empregada. Esta consistiu na determinação de um ponto de corte (*cut-off*) que melhor discriminou as curvas de sobrevivência. A estimativa do *cut-off* foi estimada por meio da maximização da estatística *log-rank* padronizada. Uma vez estimado o *cut-off*, a função de sobrevivência foi estimada utilizando o estimador de *Kaplan-Meier* e as curvas de sobrevivência estimadas foram comparadas por meio do teste *log-rank*. Ainda, um modelo de riscos proporcionais de Cox foi ajustado aos dados para descrever a relação entre as variáveis independentes com o tempo até o óbito, recorrência e progressão. Dentre as variáveis com valor de *p* inferior a 0,05 no modelo de regressão de Cox simples e as variáveis com valor de *p* entre 0,05 e 0,25 neste modelo, mas que apresentam importância clínica substancial, foram selecionadas variáveis para o modelo de regressão

de Cox múltiplo. Esta seleção foi realizada a partir do método de *stepwise backward* com p de entrada de 0,25, obtendo assim o modelo final. Em todos os modelos ajustados, a suposição de proporcionalidade foi avaliada por meio dos resíduos de *Schoenfeld*.

O nível de significância adotado foi de 5%, ou seja, resultados com valor de p inferior a 0,05 foram considerados significantes. A análise dos dados foi realizada por meio do software R versão 3.5 e do software SPSS versão 24.

4 RESULTADOS

4.1 Carcinomas do córtex suprarrenal (Tumores primários)

As características clínicas dos 112 pacientes com CCS incluídos neste estudo estão resumidas na Tabela 7. A mediana de idade ao diagnóstico do CCS foi de 40 anos e houve uma predominância deste diagnóstico no sexo feminino. A produção hormonal mista pelo tumor (produção de cortisol e andrógenos) foi a apresentação clínica mais frequentemente encontrada e a maioria dos pacientes apresentava-se com estágio ENSAT II ou III ao diagnóstico. A mediana do tempo de seguimento dos pacientes foi de 35,6 meses.

Tabela 7. Características clínicas dos 112 pacientes com carcinomas do córtex suprarrenal incluídos nas micromatrizes teciduais de tumores primários.

Característica	Carcinomas do córtex suprarrenal n = 112
Idade (anos) ^(A)	40 (15-83)
Sexo (F : M)	2,4 : 1
Síndrome clínica, <i>n</i> (%)	
Síndrome de Cushing	26 (23)
Síndrome virilizante	10 (9)
Síndrome mista	51 (46)
Não funcionante	20 (18)
Não disponível	5 (4)
ENSAT, <i>n</i> (%)	
I	10 (9)
II	50 (45)
III	27 (24)
IV	25 (22)
Escore de Weiss, <i>n</i> (%)	
3-6	63 (56)
>6	49 (44)
Ki67, <i>n</i> (%)	
Conhecidos	102 (91)
≤ 10	47 (46)
>10	55 (54)
Seguimento (meses) ^(A)	35,6 (0,6-381)

(A): mediana

4.1.1 Expressão proteica da SOAT1

Ainda que a expressão proteica da SOAT1 em suprarrenais normais seja bem estabelecida, uma vez que a suprarrenal é um dos órgãos com maior expressão desta proteína, amostras de duas suprarrenais de pacientes independentes submetidos à nefroadrenalectomia total por neoplasia maligna de rim e, portanto, com suprarrenal normal, foram avaliadas em relação à imunoeexpressão da SOAT1 (Figura 5).

Figura 5. (A e B) Imunorreatividade para a SOAT1 em glândulas suprarrenais normais à microscopia (400x).

Nos carcinomas do córtex suprarrenal, observou-se uma heterogeneidade na imunorreatividade para a SOAT1; o escore resultante do produto da intensidade pela extensão da imunorreação variou de 0 a 4. Um escore > 2 foi considerado e utilizado para definir a expressão forte da SOAT1 e foi encontrado em 42 casos (37,5%). Um escore ≤ 2 foi utilizado para definir a expressão fraca ou ausente da proteína SOAT1 e foi encontrado em 70 casos (62,5%) (Tabela 8 e Figura 6).

Tabela 8. Frequência dos escores de imunorreatividade (0 - 4) para a proteína SOAT1 dentre os 112 carcinomas do córtex suprarrenal e categorização dos casos de acordo com a expressão proteica.

Escore de imunorreatividade para a proteína SOAT1							
Expressão fraca ou ausente (escore ≤ 2)					Expressão forte (escore > 2)		
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
n (%)	26 (23,2)	4 (3,6)	4 (3,6)	4 (3,6)	32 (28,5)	5 (4,5)	37 (33)
n (%)	70 (62,5)					42 (37,5)

Figura 6. Imunorreatividade para SOAT1 à microscopia em quatro casos de carcinomas do córtex suprarrenal (A) Imunorreatividade ausente para a SOAT1 (escore 0) em carcinoma do córtex suprarrenal não funcionante de uma paciente do sexo feminino de 61 anos com evolução clínica favorável e seguimento de 42 meses (400x). (B) Imunorreatividade fraca para a SOAT1 (escore 2) em carcinoma do córtex suprarrenal produtor de andrógenos de uma paciente do sexo feminino de 30 anos com evolução clínica favorável (400x). (C) Imunorreatividade forte para a SOAT1 (escore 3) em carcinoma do córtex suprarrenal produtor de cortisol, andrógenos e estrógeno de um paciente do sexo masculino de 37 anos com evolução clínica desfavorável (400x). (D) Imunorreatividade forte para a SOAT1 (escore 4) em um carcinoma do córtex suprarrenal produtor de cortisol de um paciente do sexo masculino de 30 anos com evolução clínica desfavorável e sobrevida global de 16 meses (400x).

4.1.1.1 Expressão proteica da SOAT1 e características clínicas, bioquímicas e histológicas

A expressão forte da proteína SOAT1 foi substancialmente mais frequente em carcinomas produtores de cortisol (em associação ou não a outras produções hormonais), em estádios mais avançados (ENSAT III e ENSAT IV) e em carcinomas com maior proliferação celular avaliada pelo índice Ki67. A expressão forte da proteína SOAT1 não se correlacionou com o gênero do paciente, com o tamanho tumoral ou com a pontuação no escore de Weiss (Tabela 9).

Tabela 9. Relação entre a expressão proteica da SOAT1 e as características clínicas, bioquímicas e histopatológicas dos 112 pacientes com carcinoma do córtex suprarrenal (apenas amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário).

Característica	Expressão proteica da SOAT1		<i>p</i>[*]
	Fraca ou ausente (≤ 2)	Forte (> 2)	
<i>n</i> (%)	70 (62,5%)	42 (37,5%)	
Idade (anos)			
Mediana	43,6 (15,38-83,19)	36,32 (17,71-81)	0,32
Sexo – <i>n</i> (%)			
Feminino	53 (75,7%)	26 (61,9%)	0,181
Masculino	17 (24,3%)	16 (36,1%)	
Tamanho (cm)			
Mediana	11,15 (2,5-27)	12,2 (2,2-23)	0,792
Hipercortisolismo – <i>n</i> (%)			
Presente	38 (58,5%)	35 (85,4%)	0,01
Ausente	27 (41,5%)	6 (14,6%)	
ENSAT – <i>n</i> (%)			
I-II	45 (64,3)	15 (35,7)	0,011
III-IV	25 (35,7)	27 (64,3)	
Escore de Weiss			
3-6	42 (62,7)	15 (35,7)	0,068
>6	25 (35,7)	27 (64,3)	
Ki67 (%)			
Mediana	10 (1-75)	17,5 (1-80)	0,002**

ENSAT, Rede Europeia para o Estudo de Tumores Adrenais.

*Teste de independência (teste de qui-quadrado com correção de continuidade ou teste de qui-quadrado).

**Teste-t de Student para amostras independentes.

4.1.1.2 Expressão proteica da SOAT1 e análises de sobrevida

A expressão forte da SOAT1 correlacionou-se de forma significativa com uma redução da SG ($p = 0,0061$) no CCS (Gráfico 3). Os cento e doze pacientes com CCS foram classificados em dois subgrupos de acordo com o estadiamento ao diagnóstico (ENSAT). Esta classificação teve como finalidade avaliar o impacto da expressão da SOAT1 na SLP no subgrupo de pacientes com doença metastática ao diagnóstico (ENSAT IV; subgrupo 1; $n = 22$) e na SLR no subgrupo de pacientes com doença localizada ao diagnóstico que foram submetidos à ressecção cirúrgica completa do tumor primário (*status* de ressecção R0 (subgrupo 2; $n = 83$)). A expressão forte da SOAT1, isoladamente, correlacionou-se com uma menor SLP ($p = 0,019$) mas não se correlacionou com uma menor SLR ($p = 0,25$ (Gráficos 4 e 5)).

Gráfico 3. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da SOAT1 na sobrevida global de 112 pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário).

Gráfico 4. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da SOAT1 na sobrevida livre de progressão de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise da sobrevida livre de progressão, apenas pacientes com doença metastática ao diagnóstico foram analisados (subgrupo 1).

Gráfico 5. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da SOAT1 na sobrevida livre de recorrência de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise da sobrevida livre de recorrência, apenas pacientes com doença localizada ao diagnóstico que foram submetidos à ressecção completa do tumor primário (*status* de ressecção R0) foram analisados (subgrupo 2).

Em relação à SG, a presença de hipercortisolismo ($p = 0,013$), um estadiamento ENSAT III ou IV ($p < 0,0001$), um escore de Weiss > 6 ($p < 0,0001$), um índice de proliferação Ki67 $> 10\%$ ($p < 0,0001$) e a expressão forte da proteína SOAT1 ($p = 0,007$) foram associados à menor SG. Na análise multivariada, apenas um estadiamento ENSAT III ou IV (risco relativo (RR) 2,93; intervalo de confiança (IC) 95% 1,68-5,13; $p < 0,0001$), um índice Ki67 $> 10\%$ (RR 3,11; IC 95% 1,71-5,67; $p < 0,0001$) e a expressão proteica forte da SOAT1 (RR 2,15; IC 95% 1,26-3,66; $p = 0,005$) permaneceram como fatores preditivos de redução da SG.

Considerando os casos de CCS submetidos à ressecção cirúrgica completa do tumor primário (*status* de ressecção R0), um estadiamento ENSAT III ($p = 0,014$), um

escore de Weiss > 6 ($p < 0,0001$) e um índice de proliferação Ki67 $> 10\%$ ($p < 0,0001$) foram características associadas a uma menor SLR. A expressão forte da SOAT1 não se correlacionou, na análise univariada, a uma menor SLR ($p = 0,241$). No entanto, quando esta variável foi avaliada em conjunto com características prognósticas relevantes e bem estabelecidas no CCS através da análise multivariada, um índice Ki67 $> 10\%$ (RR 9,87; IC 95% 4,39-22,2; $p < 0,0001$) e a expressão proteica forte da SOAT1 (RR 2,1; IC 95% 1,09-4,06; $p = 0,027$) foram preditivos de uma menor SLR.

A SLP não foi avaliada pelo modelo múltiplo (análise multivariada) uma vez que o número de pacientes com doença metastática ao diagnóstica é pequeno ($n = 22$) e, consequentemente, haveria limitações na valorização de eventuais resultados.

Tabela 10. Fatores prognósticos relacionados à sobrevida global, à sobrevida livre de recorrência e à sobrevida livre de progressão em pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário).

	Análise univariada			Análise multivariada		
	Sobrevida global					
	RR	IC 95%	<i>p</i>	RR	IC 95%	<i>p</i>
Hipercortisolismo presente	2,019	1,16-3,5	0,013			
ENSAT III e IV	3,48	2,11-5,75	< 0,0001	2,93	1,68-5,13	< 0,0001
Escore de Weiss > 6	3,47	2,08-5,77	< 0,0001			
Ki67 > 10%	3,67	2,04-6,59	< 0,0001	3,11	1,71-5,67	< 0,0001
Expressão proteica forte da SOAT1	1,94	1,19-3,15	0,007	2,15	1,26-3,66	0,005
	Análise univariada			Análise multivariada		
	Sobrevida livre de recorrência					
	RR	IC 95%	<i>p</i>	RR	IC 95%	<i>p</i>
Hipercortisolismo presente	1,16	0,64-2,11	0,619			
ENSAT III e IV	14	1,85-105,5	0,014			
Escore de Weiss > 6	3,33	1,8-6,15	<0,0001			
Ki67 > 10%	9,05	4,12-19,81	<0,0001	9,87	4,39-22,2	< 0,0001
Expressão proteica forte da SOAT1	1,44	0,78-2,67	0,241	2,1	1,09-4,06	0,027
	Análise univariada			Análise multivariada		
	Sobrevida livre de progressão					
	RR	IC 95%	<i>p</i>	RR	IC 95%	<i>p</i>
Hipercortisolismo presente	1,64	0,37-7,26	0,514			
Escore de Weiss > 6	2,45	0,52-11,43	0,252			
Ki67 > 10%	3,37	0,44-25,64	0,24			
Expressão proteica forte da SOAT1	4,1	1,14-14,7	0,03			

RR, risco relativo; IC 95%, intervalo de confiança 95%; ENSAT, Rede Europeia para o Estudo de Tumores Adrenais

4.1.1.3 A expressão proteica da SOAT1 e o índice Ki67

Uma vez que o índice de proliferação Ki67 é o fator prognóstico no CCS mais utilizado na prática clínica, o impacto da combinação da expressão proteica da SOAT1 e do índice Ki67 na SG e na SLR (índice Ki67 disponível para 102 e 76 pacientes, respectivamente) foi avaliada. A associação de um índice Ki67 > 10% com uma expressão forte da proteína SOAT1 (escore > 2) correlacionou-se de forma estatisticamente significativa com piores desfechos quando comparada à associação de um índice Ki67 > 10% com uma expressão fraca ou ausente da SOAT1 (escore ≤ 2 (RR 2,65; IC 95% 1,43-4,9; $p = 0,002$ para SG e RR 2,24; IC 95% 1,02-4,05; $p = 0,044$ para SLR)). Estes resultados demonstram que estes dois fatores parecem ser complementares na estratificação prognóstica dos pacientes com CCS e poderiam definir um subgrupo de pacientes com prognóstico ainda mais desfavorável (Gráficos 6 e 7).

Gráfico 6. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão da proteína SOAT1 e do índice de proliferação Ki67 na sobrevida global de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal.

Gráfico 7. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão da proteína SOAT1 e do índice de proliferação Ki67 na sobrevida livre de recorrência de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal. Para a análise de sobrevida livre de recorrência, apenas pacientes com ressecção completa do tumor primário (*status* de ressecção R0) foram analisados (subgrupo 2).

Quando o subgrupo de pacientes com $Ki67 \leq 10\%$ foi analisado, a expressão proteica forte da SOAT1 não impactou de forma estatisticamente significativa a SG (RR 1,27; IC 95% 0,46-3,5; $p = 0,64$) e a SLR (RR 2,53; IC 95% 0,68-9,43; $p = 0,166$).

4.1.2 Expressão do gene *SOAT1*

De forma paralela à expressão proteica, os níveis de expressão do gene *SOAT1* foram heterogêneos neste grupo de pacientes. Os níveis de expressão do gene *SOAT1* variaram de 0,017 a 2,366 e a mediana foi de 0,509.

A alta expressão do gene *SOAT1* foi mais frequente em pacientes com um estadiamento da doença mais avançado ao diagnóstico (ENSAT III e IV, 62% (13 em 21 casos) em comparação com ENSAT I e II, 24% (5 em 21 casos); $p = 0,006$) e em carcinomas que apresentam um índice Ki67 mais elevado ($Ki67 > 10\%$, 76% (16 em 21 casos) em comparação com $Ki67 \leq 10\%$, 29% (6 em 21 casos); $p = 0,005$).

A expressão do gene *SOAT1* não se correlacionou com os desfechos recorrência e óbito; isto ocorreu, possivelmente, devido a menor disponibilidade de tecidos conservados em nitrogênio líquido para esta análise que aquela para a análise da expressão proteica. No entanto, a ocorrência de eventos pós-translacionais e sua possível contribuição para este achado não pode ser descartada.

4.1.3 Expressão proteica da SOAT1 em subgrupo específico

A expressão proteica da *SOAT1* foi avaliada de forma mais específica no subgrupo de oito pacientes carreadores da variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H), pacientes estes pertencentes à casuística total do estudo.

4.1.3.1 Adultos carreadores da variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H)

Dentre os 112 adultos com CCS incluídas nesta casuística, dez (9%) apresentaram variantes alélicas germinativas patogênicas no gene *TP53*. Dentre estes dez pacientes, oito mostraram ser carreadores da variante alélica germinativa c.1010G>A (p.Arg337His, R337H); sabidamente o CCS diagnosticado na faixa etária adulta nestes carreadores apresenta um prognóstico bastante reservado⁶⁷ – na nossa casuística confirmamos o impacto negativo conferido por esta variante (Gráfico 8).

Gráfico 8. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da presença de variantes alélicas germinativas patogênicas no gene *TP53* na sobrevida global de pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal.

A análise deste subgrupo (subgrupo 3) de oito casos, quando avaliado de forma mais detalhada em relação à expressão proteica da SOAT1, demonstra que a expressão da SOAT1 é forte nos seis casos que evoluíram de forma desfavorável; estes seis casos evoluíram a óbito (em cinco deles a causa do óbito foi relacionada ao CCS e em um caso o óbito decorreu de complicações da cirurgia para ressecção do tumor (caso A – Tabela 11) e a mediana de SG foi de 9 meses. Por outro lado, a expressão proteica da SOAT1 mostrou-se fraca nos dois casos que apresentaram evolução favorável (ausência de óbito com tempo de seguimento superior a 4 anos (90 e 56 meses (Tabelas 11 e 12 e Figura 7)).

Tabela 11. Características dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H (Casos A-D)).

	Caso A*	Caso B	Caso C	Caso D
Sexo	F	F	F	M
Idade ao diagnóstico	67	38	44	38
Hipercortisolismo	Sim	Não	Sim	Sim
ENSAT	3	3	2	3
Escore de Weiss	5	8	4	8
Ki67 (%)	40	30	15	30
Escore de imunorreatividade para a SOAT1	4	2	2	4
Expressão proteica da SOAT1	Forte	Fraca	Fraca	Forte
Recorrência da doença		Sim	Sim	Sim
Óbito por causas relacionadas à doença	Não	Não	Não	Sim
Sobrevida livre de recorrência (meses)		5	41	3
Sobrevida livre de progressão (meses)				
Sobrevida global (meses)	0	90	56	19

*Óbito por complicações da cirurgia para ressecção do carcinoma do córtex suprarrenal (primeiro dia pós-operatório)

Tabela 12. Características dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H (Casos E-H)).

	Caso E	Caso F	Caso G	Caso H
Sexo	F	F	M	F
Idade ao diagnóstico	61	17	25	30
Hipercortisolismo	Sim	Sim	Sim	Sim
ENSAT	4	4	4	3
Escore de Weiss	9	8	8	7
Ki67 (%)	30	40	50	ND
Escore de imunorreatividade para a SOAT1	4	4	4	4
Expressão proteica da SOAT1	Forte	Forte	Forte	Forte
Recorrência da doença				Sim
Óbito por causas relacionadas à doença	Sim	Sim	Sim	Sim
Sobrevida livre de recorrência (meses)				5
Sobrevida livre de progressão (meses)	6	6	3	
Sobrevida global (meses)	9	7	6	36

Figura 7. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia dos casos do subgrupo de pacientes com a variante alélica germinativa c.1010G>A no gene *TP53* (p.Arg337His, R337H; subgrupo 3) (A) Escore de imunorreatividade 4; expressão proteica forte da SOAT1 (400x). (B) Escore de imunorreatividade 2; expressão fraca da SOAT1 (400x). (C) Escore de imunorreatividade 2; expressão fraca da SOAT1 (400x). (D-H) Escore de imunorreatividade 4; expressão proteica forte da SOAT1 (400x).

4.2 Metástases de carcinomas do córtex suprarrenal

Quarenta e duas metástases localizadas em diferentes sítios foram avaliadas. Estas metástases referem-se a casos de dezenove pacientes que evoluíram com recorrência da doença, localmente ou à distância, e nos quais a metastasectomia foi uma alternativa terapêutica (associada ou não ao tratamento com mitotano e/ou quimioterapia sistêmica).

A mediana do tempo entre a ressecção do tumor primário e a metastasectomia foi de 28,7 meses (2,4 anos). Cada uma destas quarenta e duas metástases refere-se a lesões diferentes. A tabela 13 e o gráfico 9 ilustram as características destas metástases.

Tabela 13. Caracterização das 42 metástases incluídas na micromatriz tecidual das metástases (TMA₃).

	Metástases de carcinoma do córtex suprarrenal n = 42
Número de pacientes, <i>n</i>	19
Sexo (F : M)	2,8 : 1
Número de pacientes de acordo com o número de metástases, <i>n</i> (%)	
1 metástase	11 (58)
2 metástases	4 (21)
3 metástases	3 (16)
>3 metástases*	1 (5)
Funcionalidade da metástase, <i>n</i> (%)	
Produção de cortisol	4 (10)
Não funcionante	38 (90)
Tempo entre a ressecção do tumor primário e a ressecção da metástase (meses) ^(A)	28,7 (5,6-103,7)
Tamanho da metástase (cm) ^(A)	3,2 (0,8-14)
Escore de Weiss ^(B) , <i>n</i> (%)	
Conhecidos	29 (69)
2-5	17 (59)
>5	12 (41)
Ki67, <i>n</i> (%)	
≤ 10%	25 (60)
>10%	17 (40)

(A): mediana; (B): escore de Weiss adaptado para metástases

*Uma única paciente realizou 7 metastasectomias em tempos diferentes (as metástases ressecadas localizavam-se em diferentes sítios).

Gráfico 9. Localização das 42 metástases incluídas na micromatriz tecidual das metástases (TMA₃)

4.2.1 Expressão proteica da SOAT1

Nas metástases de CCS também se observou uma heterogeneidade na imunorreatividade para a SOAT1. A expressão proteica forte da SOAT1 foi encontrada em 15 casos (36%) e a expressão fraca ou ausente da proteína SOAT1 foi encontrada em 27 casos (64%) (Tabela 14).

Tabela 14. Frequência dos escores de imunorreatividade (0 - 4) para a SOAT1 dentre as 42 metástases de carcinoma do córtex suprarrenal e categorização dos casos de acordo com a expressão proteica.

Escore de imunorreatividade para a proteína SOAT1							
Expressão fraca ou ausente (escore ≤ 2)					Expressão forte (escore > 2)		
	0	0,5	1	1,5	2	3	4
n (%)	5 (12)	0 (0)	1 (2)	2 (5)	19 (45)	4 (10)	11 (26)
n (%)	27 (64)					15 (36)	

A expressão da SOAT1 nas metástases de CCS não se correlacionou de forma estatisticamente significativa com as características clínicas e histológicas (Tabela 15).

Tabela 15. Relação entre a expressão proteica da SOAT1 e as características clínicas e histopatológicas de 42 metástases de carcinoma do córtex suprarrenal.

Característica	Expressão proteica da SOAT1		<i>p</i>
	Fraca ou ausente (≤ 2)	Forte (> 2)	
<i>n</i> (%)	27 (64%)	15 (35%)	
Sítio, <i>n</i> (%)			
Pulmão	12 (44)	6 (40)	0,238*
Fígado	0 (0)	3 (20)	
Recorr. local ou intra-abdominal	8 (30)	3 (20)	
SNC	3 (11)	2 (13)	
Outros	4 (15)	1 (7)	
Funcionalidade, <i>n</i> (%)			
Presente	1 (4)	4 (27)	0,088**
Ausente	26 (26)	11 (73)	
Tempo entre a ressecção do tumor primário e a ressecção da metástase (meses) ^(A)	29,8 (5-99,1)	27,6 (5,6-103,7)	0,572***
Tamanho (cm)			
Mediana	4,1 (0,8-14)	3,2 (1,7-4,5)	0,927***
Escore de Weiss ^(B) , <i>n</i> (%)			
Conhecidos	18 (67)	11 (67)	0,438*
2-5	12 (77)	5 (45)	
>5	6 (33)	6 (56)	
Ki67 (%)			
Mediana	8 (0-70)	10 (0-80)	0,367***
Ki67 (%)			
>10%	10 (37)	7 (47)	0,779**
≤10%	17 (63)	8 (53)	

(A): mediana; (B): escore de Weiss adaptado para metástases

*Teste exato de Fisher; **teste de qui-quadrado com correção de continuidade; ***Teste U de Mann-Whitney

Obs.: o termo “outros” engloba as metástases pleurais, pericárdicas e para a mama

É importante salientar que estes resultados devem ser avaliados com a premissa de que a maioria dos pacientes, quando da metastasectomia, vinha realizando tratamento quimioterápico e/ou com terapia citotóxica sistêmica e de que não há um protocolo bem estabelecido no nosso centro (assim como na literatura) em relação a quais pacientes

devem ser avaliados para esta modalidade terapêutica (metastasectomia) e em que momento este procedimento deve ser considerado¹¹.

4.2.1.1 Expressão proteica da SOAT1 no tumor primário *versus* a expressão proteica da SOAT1 na metástase

Dentre as 42 metástases avaliadas neste estudo (TMA₃), 36 delas são de pacientes cujo tumor primário foi também avaliado e está incluído nos TMAs de tumores primários (TMA₁ e TMA₂). Considerando estas 36 metástases, a expressão proteica da SOAT1 enquadrou-se na mesma categoria de expressão do que o tumor primário em 26 delas (72%). Nas 10 lesões remanescentes, a categoria de expressão da proteína SOAT1 divergiu em relação a do tumor primário. As figuras abaixo exemplificam casos em que o tumor primário e a metástase enquadraram-se na mesma categoria de expressão da SOAT1 (Figuras 8 e 9) e casos em que categorias diferentes foram observadas (Figuras 10 e 11).

Figura 8. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do carcinoma do córtex suprarrenal (tumor primário) e da metástase intra-abdominal ressecados em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 1,5 e, portanto, expressão proteica fraca da SOAT1 (100x). (B) Metástase intra-abdominal ressecada após 37,2 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 2 e expressão proteica fraca da SOAT1 (100x).

CCS, carcinoma do córtex suprarrenal

Figura 9. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do carcinoma do córtex suprarrenal (tumor primário) e da metástase hepática ressecados em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e, portanto, expressão proteica forte da SOAT1 (100x). (B) Metástase hepática ressecada após 20,4 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x).

CCS, carcinoma do córtex suprarrenal

Figura 10. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do tumor primário e de metástases em diferentes sítios e ressecados em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e, portanto, expressão proteica forte da SOAT1 (100x). (B e C) Metástases pulmonares (dois nódulos diferentes) ressecadas após 27 meses da ressecção do tumor primário (100x). (B) Escore de imunorreatividade 3 e expressão forte da SOAT1 (100x). (C) Escore de imunorreatividade 0 e expressão ausente da SOAT1 (100x). (D) Metástase para SNC ressecada após 30 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x).

Figura 11. Imunorreatividade para a SOAT1 à microscopia do tumor primário e de metástases pulmonares ressecadas em momentos diferentes pertencentes ao mesmo caso. (A) Tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 1,5 e, portanto, expressão proteica fraca da SOAT1 (100x). (B e C) Metástases pulmonares (dois nódulos diferentes) ressecadas após 20 meses da ressecção do tumor primário (100x). (B) Escore de imunorreatividade 4 e expressão forte da SOAT1 (100x). (C) Escore de imunorreatividade 3 e expressão forte da SOAT1 (100x). (D) Metástase pulmonar ressecada após 30 meses da ressecção do tumor primário exibindo escore de imunorreatividade 4 e expressão proteica forte da SOAT1 (100x).

4.2.2 Outras características das metástases

Os 36 casos de pacientes nos quais pudemos avaliar tanto o tumor primário quanto pelo menos uma metástase (do mesmo caso), foram avaliados também em relação à concordância no que se refere ao escore de Weiss e ao índice Ki67.

Em 65% dos casos foi demonstrado uma semelhança na pontuação do escore de Weiss entre o tumor primário e a metástase, ou seja, quando a pontuação no escore de Weiss no tumor primário foi de 3-6 e na metástase foi de 2-5 ou > 6 no tumor primário e > 5 na metástase. Em 35% dos casos houve divergência nas pontuações; observando-se casos em que o tumor primário apresentava pontuação mais baixa (3-6) e, a metástase, pontuação mais alta (> 5), ou vice-e-versa.

Em relação ao índice Ki67, todos os tumores primários destes 36 casos apresentavam índice Ki67 $> 10\%$ e, em 14 (39%) destes, a metástase originada deste tumor primário também demonstrou índice Ki67 $> 10\%$. Em 22 casos (61%), apesar do tumor primário apresentar índice Ki67 $> 10\%$, nas metástases observou-se um índice $\leq 10\%$; nestes, a mediana do índice Ki67 na metástase foi de 5%.

Os diferentes sítios de acometimento metastático não interferiram na concordância entre o tumor primário e a metástase tanto no que se refere ao escore de Weiss quanto no que se refere ao índice Ki67.

Mais uma vez é importante reforçar que estes resultados devem ser avaliados com a premissa de que a maioria dos pacientes, quando da metastasectomia, vinha realizando tratamento quimioterápico com mitotano e/ou com terapia citotóxica sistêmica e que não se tem nenhuma validação até o momento para a utilização do escore de Weiss e do Ki67 neste contexto.

4.3 Expressão proteica do SF-1

Todos os carcinomas primários e metástases foram avaliados em relação à expressão do SF-1. Além da revisão de todos os relatórios anatomopatológicos bem como da revisão dos dados clínicos, laboratoriais e radiológicos, esta avaliação contribuiu para maior certificação da origem adrenocortical das lesões primárias e metastáticas.

Um escore > 2 foi considerado e utilizado para definir a expressão proteica forte do SF-1, um escore igual a 1 ou 2 (inclusive) foi utilizado para definir a expressão fraca e um escore igual a zero caracterizou a expressão ausente deste marcador. A distribuição dos escores de imunorreatividade encontrados dentre os carcinomas primários e as metástases estão demonstrados na Tabela 16 e na Figura 12.

Tabela 16. Distribuição dos escores de imunorreatividade para o SF-1 nas suprarrenais normais, carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários) e nas metástases.

Tecido		Expressão SF-1		
		n, (%)		
		Negativo (escore = 0)	Fraco (escore ≤ 2)	Forte (escore > 2)
Glândulas suprarrenais normais	3	0 (0)	0 (0)	3 (100)
ACC	154			
Tumores primários	112	9 (8)	49 (44)	54 (48)
Recorrências locais	6	1 (17)	1 (17)	4 (66)
Metástases à distância	36	10 (28)	11 (30)	15 (42)
Pulmão	18	5	4	9
Fígado	3	0	2	1
Intra-abdominal	5	2	2	1
SNC	5	1	1	3
Outros	5	2	2	1

Figura 12. Imunorreatividade para o SF-1 em carcinomas do córtex suprarrenal (amostras tumorais derivadas da ressecção cirúrgica do tumor primário). (A) Escore de imunorreatividade ausente para o SF-1 (escore = 0) (400x). (B) Imunorreatividade fraca para o SF-1 (escore = 1) (400x). (C) Imunorreatividade fraca para o SF-1 (escore = 2) (400x). (D) Imunorreatividade forte para o SF-1 (escore = 3). (E) Imunorreatividade forte para o SF-1 (escore = 4) (400x).

Dentre os 112 tumores primários, 103 (92%) apresentaram expressão positiva do SF-1 (fraca ou forte). Os nove casos cuja expressão do SF-1 se mostrou ausente dizem respeito a casos variados em relação a gênero, idade ao diagnóstico, apresentação clínica e hormonal ao diagnóstico, estadiamento, escore de Weiss e índice Ki67.

Dentre as recorrências locais (n = 6), em apenas um caso a expressão do SF-1 não foi demonstrada. Em relação às metástases à distância (n = 36), em todos os sítios a expressão positiva do SF-1 (fraca ou forte) foi mais frequente que a ausência de expressão deste marcador (72% *versus* 28%). O tempo decorrido entre a ressecção cirúrgica do tumor primário e a ressecção da metástase (recorrência local ou metástase à distância) não se correlacionou com a expressão do SF-1.

4.3.1 A relação entre a expressão proteica da SOAT1 e a expressão proteica do SF-1

Uma vez que *SOAT1* é um gene alvo do fator de transcrição SF-1⁵² e que o valor prognóstico do SF-1 no CCS está bem estabelecido¹⁷, comparamos a expressão da SOAT1 com a expressão do SF-1 na nossa coorte, incluindo a série de carcinomas primários e, também, a série de metástases.

Quando consideramos os carcinomas primários com expressão proteica forte da SOAT1 (escore > 2, n = 42), 30 (71%) pacientes também apresentaram expressão forte do SF-1, enquanto 12 (29%) apresentaram expressão fraca ou ausente deste marcador. Quando consideramos as metástases de CCS com expressão proteica forte da SOAT1 (escore > 2, n = 15), 11 (73%) pacientes também apresentaram expressão forte do SF-1, enquanto 4 (27%) apresentaram expressão fraca ou ausente deste marcador.

4.4 Expressão proteica da SOAT1 e resposta ao tratamento com mitotano

Duzentos e trinta e um pacientes de doze centros participantes, onze deles de países europeus (5 centros da Itália, 2 centros da Alemanha, 1 centro de Portugal, 1 centro da Inglaterra, 1 centro da Polônia 1 centro da Holanda) e um do Brasil (HC-FMUSP) constituíram a casuística deste estudo multicêntrico retrospectivo.

Analisando todos os pacientes conjuntamente ($n = 231$), a expressão forte da proteína SOAT1 correlacionou-se de forma significativa com um tempo de sobrevida livre de recorrência e com um tempo de sobrevida livre de progressão menor do que a expressão fraca desta proteína (mediana de 8 meses (1-216) *versus* 13 meses (1-153); $p = 0,049$) – Gráfico 10.

Gráfico 10. Curva de Kaplan-Meier demonstrando o impacto da expressão proteica da SOAT1 na sobrevida livre de recorrência e progressão em 231 pacientes adultos com carcinoma do córtex suprarrenal provenientes de doze centros.

*o gráfico acima encontra-se na língua inglesa uma vez que este resultado em especial foi obtido por meio do trabalho colaborativo no estudo multicêntrico internacional.

4.4.1 Mitotano adjuvante

No grupo adjuvante, não foram observadas diferenças na SLR entre pacientes com CCSs com expressão fraca ou ausente de SOAT1 e aqueles com expressão forte da SOAT1 (mediana de 22 meses (1-153) *versus* mediana de 12 meses (1,5-216; $p = 0,12$). A SG também não foi estatisticamente diferente (mediana de 51 meses (1-252) *versus* 31 meses (2-216; $p = 0,23$) para os pacientes com expressão fraca ou ausente de SOAT1 e para os pacientes com expressão forte da proteína SOAT1, respectivamente.

4.4.2 Mitotano paliativo

De forma semelhante ao grupo acima, no grupo paliativo, nenhuma diferença significativa na SLP foi observada entre pacientes com expressão fraca ou ausente da SOAT1 e pacientes com expressão forte (mediana de 5 meses (1-59) *versus* mediana de 4 meses (1-25; $p = 0,66$). A SG também não foi estatisticamente diferente (mediana de 22 meses (4-180) *versus* 21 meses (2-83; $p = 0,47$) para os pacientes com expressão fraca ou ausente de SOAT1 e para os pacientes com expressão forte da proteína SOAT1, respectivamente.

4.4.3 Correlação entre a expressão da SOAT1 e as concentrações de mitotano

Não observamos associação entre a expressão proteica da SOAT1 e as concentrações plasmáticas de mitotano. As concentrações plasmáticas de mitotano não diferiram significativamente após 3 e 6 meses do início do uso da medicação entre pacientes com CCSs com expressão fraca ou ausente da SOAT1 e expressão forte da SOAT1.

Da mesma forma, a expressão proteica da SOAT1 não influenciou a capacidade de se alcançar concentrações plasmáticas de mitotano ≥ 14 mg/L. Quando analisamos apenas os pacientes que atingiram concentrações plasmáticas de mitotano ≥ 14 mg/L após 3 meses, pacientes que apresentavam tumores com expressão forte da proteína SOAT1 apresentaram maior incidência de recorrência da doença e, portanto, menos pacientes responderam ao tratamento com mitotano adjuvante ($p = 0,0017$); aos seis meses esta diferença não mais foi observada (Gráfico 11).

Gráfico 11. Correlação entre a expressão proteica da SOAT1 e a recorrência da doença quando apenas os pacientes que atingiram concentrações plasmáticas de mitotano ≥ 14 mg/L após 3 meses (A) e após 6 meses (B) do início da droga foram analisados.

*o gráfico acima encontra-se na língua inglesa uma vez que este resultado em especial foi obtido por meio do trabalho colaborativo no estudo multicêntrico internacional.

5 DISCUSSÃO

Durante o processo de tumorigênese, as células cancerosas adquirem diversas alterações metabólicas com a finalidade de superar os desafios metabólicos resultantes da rápida proliferação celular e de sobrevivência em condições inóspitas⁶⁸. Evidências recentes demonstram que a reprogramação do metabolismo lipídico, a qual inclui alterações na lipogênese *de novo*, alterações na oxidação de ácidos graxos e alterações na metabolização e reciclagem de lipídeos, seja essencial em vários aspectos da tumorigênese⁶⁹. O impacto de uma maior expressão da proteína SOAT1 no prognóstico de diferentes neoplasias malignas já foi demonstrado e está bem estabelecido, sugerindo que o metabolismo lipídico e a formação das “*lipid droplets*” ou, partículas de gordura, desempenham um papel essencial na progressão e agressividade tumoral⁷⁰.

A proteína SOAT1 é muito expressa nas células do córtex suprarrenal sendo responsável pela esterificação do colesterol a partir de moléculas de ácidos graxos livres e de colesterol livre presentes no meio intracelular. Ao mesmo tempo em que os *pools* de colesterol esterificado protegem as células contra os efeitos tóxicos causados pelo colesterol livre em excesso, estes podem ser rapidamente liberados pela ação da lipase hormônio sensível após estímulo do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH)³⁹.

Em 2015, Sbiera *et al.* demonstraram que a expressão da proteína SOAT1 é mais variável e heterogênea nos CCSs quando comparada à expressão em glândulas suprarrenais normais e em adenomas do córtex suprarrenal³⁹. No entanto, a correlação entre a expressão da SOAT1 e as características dos carcinomas e os desfechos clínicos dos pacientes não foi investigada no estudo supracitado.

Desta forma, este foi o primeiro estudo a explorar a correlação entre a expressão da proteína SOAT1 e as características clínicas, bioquímicas, histológicas e, principalmente, os desfechos recorrência, progressão e óbito. No presente estudo fomos pioneiros ao demonstrar que a expressão proteica forte da SOAT1 foi significativamente mais frequente em carcinomas que apresentam características clínicas e histológicas sabidamente relacionadas a um prognóstico menos favorável como hipercortisolismo (associado ou não a outras produções hormonais), estágio da doença mais avançado ao diagnóstico (ENSAT III e IV *versus* ENSAT I e II) e maior proliferação celular (índice Ki67 mais elevado). Demonstramos também o impacto da expressão forte da SOAT1 na evolução dos pacientes com CCS, já que esta expressão se correlacionou de forma independente com uma menor SG e com uma menor SLR, sugerindo assim um papel prognóstico deste marcador, também, no CCS.

É questionado na literatura se a deficiência e a menor expressão da SOAT1 e/ou o comprometimento da função desta proteína poderiam estar implicados na patogênese de alguns casos de insuficiência adrenal, tanto pela menor disponibilidade de colesterol para esteroidogênese, como pela possível destruição das células adrenocorticais em decorrência das moléculas de colesterol livre intracelular em excesso⁵². Por conseguinte, a correlação entre a expressão forte da SOAT1 com tumores funcionantes, e sobretudo com tumores produtores de cortisol, vai de encontro à função e importância da proteína. A maior capacidade de esterificação do colesterol com consequente redução das concentrações de colesterol livre intracelular também protegeria as células do estresse do RE (este, quando mantido, culminaria em apoptose celular) e aumentaria a viabilidade celular. Esta maior viabilidade celular, por sua vez, justifica a correlação entre a expressão proteica forte da SOAT1 e tumores com comportamento mais agressivo como aqueles com estágio mais avançado ao diagnóstico e índice Ki67 mais elevado.

A importância do índice de proliferação celular Ki67 na estratificação prognóstica dos pacientes com CCS é muito bem estabelecida e inquestionável, sendo este o marcador prognóstico mais amplamente utilizado na prática clínica¹⁸. Na nossa casuística foi demonstrado que a SOAT1 se comportou como marcador prognóstico independente do Ki67. Assim sendo, questionamos se a utilização da informação da expressão proteica da SOAT1, aliada à informação do Ki67, poderia auxiliar no refinamento da estratificação prognóstica e em uma melhor predição do risco de recorrência e óbito destes pacientes. A utilização aliada destas duas informações, de fato, se mostrou promissora; pacientes com CCSs que apresentam expressão forte da SOAT1 e índice Ki67 > 10% apresentaram uma menor SLR e menor SG em relação àqueles que apresentam apenas um índice Ki67 > 10%, mas expressão fraca ou ausente da SOAT1.

Avaliamos também o impacto da expressão da SOAT1 nos pacientes com Ki67 ≤ 10%. Sabe-se que pacientes com tumores com Ki67 ≤ 10% apresentam recorrência em cerca de 30% dos casos¹⁸. Neste grupo de pacientes da nossa casuística, no entanto, a expressão forte da SOAT1 *versus* a expressão fraca ou ausente da SOAT1 não impactou o prognóstico de forma significativa, tanto em relação ao desfecho recorrência como em relação ao desfecho óbito.

Estes achados inéditos, bastante consistentes, nos chamaram a atenção para avaliarmos um subgrupo específico de pacientes com CCS que, nas regiões sul e sudeste do Brasil, assume uma importância relevante, o subgrupo formado por adultos que

apresentam variantes alélicas germinativas no gene *TP53*⁶⁷. Dentre os oito casos, seis apresentaram escores de imunorreatividade > 2 para a proteína SOAT1, enquadrando-se na categoria de expressão forte da SOAT1; todos estes seis casos evoluíram a óbito. Os dois casos que apresentaram escore de imunorreatividade ≤ 2 e enquadraram-se na categoria de expressão fraca ou ausente da SOAT1 são pacientes que apresentaram uma SG significativamente maior (90 e 56 meses) que a mediana do subgrupo, que foi de 14 meses. A alta prevalência da expressão forte da SOAT1 neste subgrupo reforçou a importância desta variável como marcador prognóstico no CCS.

As quarenta e duas metástases para diferentes sítios avaliadas neste estudo indicaram que a expressão da proteína SOAT1 se comportou de maneira parecida aos tumores primários; em ambas as séries a prevalência da expressão proteica forte foi de aproximadamente 35%. Em relação às metástases não se observou correlação estatisticamente significativa entre a categoria de expressão da SOAT1 na metástase e o sítio da metástase, o tempo entre a ressecção do tumor primário e a ressecção da metástase, o tamanho da lesão metastática, o escore de Weiss adaptado e o Ki67.

É importante destacar o fato de termos tido a possibilidade de comparar a expressão proteica da SOAT1 e outras características na metástase com aquelas no tumor primário que a originou. Das 42 metástases avaliadas, 36 metástases eram de pacientes participantes do estudo que contribuíram com amostras do tumor primário e também com amostras de pelo menos uma metástase (recorrência local ou à distância).

Considerando estas 36 metástases, a expressão proteica da SOAT1 enquadrou-se na mesma categoria de expressão do que o tumor primário em 26 delas (72%) e, nas 10 lesões remanescentes, a categoria de expressão da proteína SOAT1 divergiu em relação a do tumor primário. Em relação às características escore de Weiss e Ki67, em 65% dos casos foi demonstrado uma semelhança na pontuação do escore de Weiss entre o tumor primário e a metástase (escore de Weiss adaptado); para o Ki67, esta semelhança foi observada em 39% dos casos.

Consideramos os resultados em relação às metástases interessantes; todavia, reforçamos que estes devem ser avaliados sob a ótica de que a maioria dos pacientes, quando da metastasectomia, vinha realizando tratamento quimioterápico com mitotano e/ou com terapia citotóxica sistêmica. Ainda não se tem o conhecimento em relação à influência ou não das drogas usadas no manejo oncológico do paciente com CCS na expressão gênica e proteica da SOAT1 e, no caso de haver alguma influência, qual seria

a sua magnitude. Chamamos a atenção também para a aplicabilidade questionável e não estabelecida do escore de Weiss e do Ki67 para metástases de CCS, sobretudo no contexto de tratamento quimioterápico, em que benefícios oncológicos são esperados como o de menor proliferação celular, menor índice mitótico, menor capacidade de invasão das células tumorais, maior extensão de necrose, entre outros.

Em 2010, nosso grupo demonstrou uma expressão aumentada do SF-1 nos tumores adrenocorticais, sobretudo no grupo pediátrico²⁰. No mesmo ano, Sbiera *et al.* demonstraram que o SF-1, além de representar um excelente marcador da origem adrenocortical do tumor, tem papel prognóstico no CCS¹⁷. Em 2011, Ferraz-de-Souza *et al.* publicaram que o *SOAT1* é um gene alvo do SF-1⁵². Uma vez que o gene *SOAT1* é alvo do fator de transcrição SF-1 e que o valor prognóstico do SF1 no CCS está bem estabelecido¹⁷, comparamos a expressão da *SOAT1* com a expressão do SF-1 na nossa casuística, incluindo a série de carcinomas primários e a série de metástases.

Como esperado, observamos que expressão do SF-1 foi positiva na imensa maioria dos tumores primários, em poucos casos (n = 9; 8%) tal expressão não foi identificada. Nas recorrências locais e nas metástases à distância, a expressão deste marcador também foi positiva na maioria dos pacientes. No entanto, em uma porcentagem maior de casos esta expressão não foi detectada, em 17% das recorrências locais e em 28% das metástases à distância. Estes resultados são muito semelhantes àqueles do estudo principal envolvendo este marcador¹⁷; uma possível explicação para maior prevalência da expressão negativa do SF-1 nas recorrências locais e, principalmente, nas metástases à distância, é o menor grau de diferenciação celular que se espera nestas lesões em relação à glândula suprarrenal normal e ao tumor primário.

A expressão proteica da *SOAT1* e do SF-1 foi forte em aproximadamente 70% dos pacientes em ambas as séries. Poderíamos questionar se a expressão da *SOAT1* seria apenas um reflexo da expressão do SF-1 e se os efeitos pleiotrópicos deste fator de transcrição na expressão gênica seriam, na verdade, os responsáveis pela maior agressividade dos tumores exibindo expressão forte da *SOAT1* e do SF-1. No entanto, o um terço remanescente dos casos que não apresentou este paralelismo na expressão da *SOAT1* e do SF-1, demonstrando expressão forte apenas da *SOAT1*, reforça a importância do metabolismo lipídico no processo de tumorigênese suprarrenal e seu valor prognóstico, não apenas nas neoplasias malignas já citadas, mas também no CCS.

Incontestavelmente esforços de diversos centros e várias colaborações multicêntricas têm sido realizados com o objetivo de se obter um maior conhecimento da patogênese molecular envolvida no desenvolvimento e progressão do CCS e, em última análise, espera-se que tais conhecimentos sejam revertidos em novas propostas e alternativas terapêuticas direcionadas. Nos últimos anos e, sobretudo na última década, avanços importantes foram observados neste sentido; no entanto, estes avanços ainda não foram revertidos, na prática, em novas opções de tratamento.

O mitotano, desde a sua aprovação para o tratamento do CCS metastático em 1959, permanece sendo a única droga aprovada para o tratamento desta doença⁷¹. Apesar do longo tempo de uso e experiência com esta droga, muitas áreas de incerteza existem como em quais pacientes usá-lo, o que esperar em termos de eficácia e por quanto tempo usar esta droga. Outras questões relevantes relacionadas a esta droga são a toxicidade e a alta frequência de eventos adversos e efeitos colaterais, a necessidade de utilizar um regime complexo de reposição de glicocorticoides e mineralocorticoides nos pacientes em uso desta medicação, a interação medicamentosa com outras drogas, incluindo drogas que podem vir a ser usadas no tratamento desta doença (como inibidores da tirosina-quinase)⁷² e a necessidade de monitorizar as concentrações séricas do mitotano, o que não é amplamente disponível. Considerando todas estas questões, a seleção dos pacientes para o tratamento com mitotano a partir de fatores preditivos da eficácia da droga representaria um grande avanço na abordagem terapêutica dos pacientes.

Após estudo publicado em 2015 que sugeriu que a SOAT1 é o alvo de ação do mitotano³⁹, nos interessamos em avaliar a influência da expressão da SOAT1, também, na resposta ao tratamento com mitotano. De acordo com este conhecimento, esperaríamos que uma expressão forte da SOAT1 fosse um pré-requisito para a resposta a esta droga. Desta forma, pacientes com carcinomas que apresentassem uma maior expressão da SOAT1 apresentariam melhor resposta ao mitotano com consequente impacto positivo nos desfechos SG, SLR e SLP.

Os resultados do estudo multicêntrico no qual o nosso grupo participou e que incluiu grande parte dos pacientes contidos nesta casuística foram negativos em relação a esta hipótese, já que evidenciaram a ausência de correlação entre a expressão da SOAT1 e a resposta ao mitotano, tanto no contexto adjuvante quanto no contexto paliativo. Este resultado evoca algumas considerações e questionamentos:

- 1) questionamos se a SOAT1 é realmente o alvo de ação do mitotano e, assim sendo, aventamos a possibilidade de outros mecanismos de ação desta droga somarem-se à inibição da SOAT1, ou seja, de este não ser o único;
- 2) uma reflexão também importante diante destes achados é acerca da real eficácia do mitotano. Os estudos demonstram um controle da doença avançada em cerca de 25% dos casos e, no contexto adjuvante, uma SLR superior quando o uso do mitotano é comparado à conduta expectante (42 meses *versus* 25 meses), mas não há impacto significativo da terapia adjuvante e paliativa em relação à sobrevida global³⁶.
- 3) aventamos também a possibilidade de a expressão forte da SOAT1 como característica e marcador de agressividade tumoral no CCS se sobressair sobre qualquer impacto desta expressão na resposta ao tratamento com mitotano, assumindo que a inibição desta enzima seja, de fato, o principal mecanismo de ação desta droga. Desta forma, a inibição da SOAT1 não seria suficiente para anular o pior prognóstico dos casos com expressão forte desta proteína.

Reforçamos, portanto, a relevância do papel da expressão da SOAT1 como marcador prognóstico, mas não como fator de predição de resposta ao tratamento com mitotano.

Diante de tantas incertezas e dúvidas em relação a esta droga, somadas ao resultado deste objetivo específico do nosso estudo, reforçamos a importância de que novas alternativas terapêuticas sejam desenvolvidas e venham a se tornar disponíveis para o tratamento e manejo dos pacientes com CCS.

A inibição da SOAT1 como alternativa terapêutica no câncer já foi estudada no GBM, com resultados promissores⁷³. No CCS, um ensaio clínico fase 1 (NCT01898715) com o inibidor da SOAT1 nevanimibe (ATR-101), um inibidor da SOAT1 suprarrenal-específico de administração oral, foi publicado recentemente (após a publicação dos resultados principais do nosso estudo). Este estudo demonstrou a segurança da medicação nas várias posologias avaliadas, mas a posologia necessária para expor os pacientes aos efeitos apoptótico e adrenolítico da droga (com base em estudos não clínicos) foi passível de ser oferecida apenas a uma minoria dos pacientes, dado o grande número de comprimidos necessários para tal (aproximadamente 24 comprimidos por dia)⁷¹.

O desenvolvimento de outros inibidores da SOAT1 suprarrenal-específicos, com formulação mais favorável será de grande importância para dar continuidade na investigação de tratamentos cujo alvo de ação seja, exclusivamente, a inibição desta enzima.

Os pontos positivos deste trabalho são o tamanho da casuística, tendo em vista a raridade desta doença, o longo tempo de seguimento dos pacientes e a abrangência dos dados de acompanhamento disponíveis para todos os pacientes e a metodologia detalhada e completa utilizada para responder os seus objetivos. Ainda, o uso da tecnologia do arranjo em micromatrizes teciduais, o qual inequivocamente favorece a uniformidade das condições experimentais, e da técnica de IHQ, a qual tem um tempo de execução curto, baixo custo e está amplamente disponível, também são pontos fortes do estudo. A possibilidade de avaliarmos, além dos tumores primários, as metástases de CCS, indubitavelmente enriqueceu os resultados.

As limitações do estudo às quais devemos nos atentar são a natureza retrospectiva e unicêntrica do trabalho (foi realizada uma colaboração multicêntrica internacional apenas para avaliar a correlação entre a expressão proteica da SOAT1 e a resposta ao mitotano). Apesar do grande número de casos disponíveis para a construção dos TMAs e para a realização da IHQ, um menor número de amostras tumorais armazenadas em nitrogênio líquido e, portanto, disponíveis para os estudos moleculares, foi avaliado quanto à expressão gênica. Esta avaliação nos permitiu correlacionar a maior expressão do gene *SOAT1* com parâmetros de maior agressividade, mas não nos permitiu correlacioná-la com uma menor SG e menor SLR no CCS. Neste estudo, a população pediátrica com tumores adrenocorticais não foi incluída dadas as diferenças existentes no diagnóstico, manejo e evolução desta população em relação à população adulta com CCS. Certamente será enriquecedor conhecer o padrão de expressão da SOAT1, também, nos tumores adrenocorticais de crianças.

6 CONCLUSÕES

- A expressão proteica forte da SOAT1 correlacionou-se com parâmetros clínicos e histopatológicos estabelecidos de maior agressividade nos carcinomas do córtex suprarrenal.
- A expressão proteica forte da SOAT1 associou-se a uma menor sobrevida livre de recorrência e a uma menor sobrevida global no CCS, sendo um fator preditivo independente de evolução para óbito e para recorrência nesta casuística.
- A combinação de uma expressão proteica forte da SOAT1 com um índice Ki67 > 10% associou-se a uma menor sobrevida global e a uma menor sobrevida livre de recorrência em relação à presença isolada de um Ki67 > 10%. Estes dois marcadores podem ser considerados fatores prognósticos complementares e definiram um subgrupo de pacientes com prognóstico ainda mais desfavorável.
- Nas metástases, a expressão proteica da SOAT1 enquadrou-se na mesma categoria de expressão do que o tumor primário em 72% dos casos, mas não se correlacionou com as características clínicas, bioquímicas e histológicas.
- A expressão proteica da SOAT1 no tumor primário, isoladamente, não predisse a resposta ao tratamento com mitotano, tanto no contexto adjuvante quanto no contexto paliativo.
- Os resultados deste estudo são inéditos ao demonstrar o valor prognóstico da SOAT1 no CCS e reforçam a importância de que a SOAT1 seja investigada como alvo terapêutico no CCS.

Anexo I. Escore de Weiss e escore de Weiss modificado.

a - Escore de Weiss¹⁵.

Tabela 17. Escore de Weiss para diferenciar neoplasias benignas e malignas do córtex suprarrenal.

Alto grau nuclear (grau 3 ou 4 de acordo com os critérios de *Fuhrman et al.*)⁷⁴

Índice mitótico maior que 5 por 50 campos de grande aumento

Mitose atípicas

Células claras compreendendo 25% ou menos do tumor

Arquitetura difusa (maior que um terço do tumor)

Necrose

Invasão de estruturas venosas

Invasão de estruturas sinusoidais

Invasão da cápsula tumoral

Observação: a presença de 3 ou mais critérios define malignidade em adultos com neoplasias do córtex suprarrenal

b - Escore de Weiss Modificado¹⁵.

Tabela 18. Escore de Weiss modificado para diferenciar neoplasias benignas e malignas do córtex suprarrenal.

Índice mitótico maior que 5 por 50 campos de grande aumento

Mitose atípicas

Células claras compreendendo 25% ou menos do tumor

Necrose

Invasão da cápsula tumoral

Observação: a presença de 3 ou mais critérios define malignidade em adultos com neoplasias do córtex suprarrenal

Anexo II. Sistema de estadiamento do carcinoma do córtex suprarrenal de acordo com o sistema de classificação TNM de classificação dos tumores malignos e de acordo com a ENSAT²¹.

Tabela 19. Estadiamento do carcinoma do córtex suprarrenal.	
ENSAT	TNM
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1-2, N1, M0
	T3-4, N0-1, M0
IV	T1-4, N0-1, M1
Observação: T1= tumor $\leq$ 5 cm; T2= tumor $>$ 5 cm; T3= infiltração tumoral de tecidos adjacentes; T4= invasão tumoral de órgãos adjacentes e/ou trombo tumoral na veia cava e/ou veia renal; N0= ausência de linfonodos acometidos; N1= presença de linfonodos acometidos; M0= ausência de metástases à distância; M1= presença de metástases à distância.	

Anexo III. Parecer Consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA SOAT1 E DA RRM1 NO CARCINOMA DO CÓRTEX DA SUPRARRENAL E SEU IMPACTO NA RESPOSTA AO MITOTANO E NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO TUMOR

Pesquisador: MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES FRAGOSO

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 73921517.0.0000.0068

Instituição Proponente: HOSPITAL DAS CLINICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA U S P

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio
FUNDACAO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SAO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.291.546

Apresentação do Projeto:

O estudo pretende investigar o comportamento biológico do tumor e sua resposta ao mitotano em amostras coletadas anteriormente.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos deste estudo são: 1) Avaliar a influência das variações no padrão de imunoexpressão das proteínas SOAT1 e RRM1 na resposta ao tratamento com mitotano, no contexto adjuvante e no contexto do tratamento da doença avançada; 2) Investigar o padrão da imunoexpressão das proteínas SOAT1 e RRM1 em amostras parafinizadas de tumores primários e de lesões metastáticas de CCS em diferentes sítios e sua associação com o comportamento biológico do tumor; 3) Comparar a expressão proteica da SOAT1 e RRM1 com o índice de proliferação Ki67 e correlacioná-la com a sobrevida livre de doença e sobrevida global.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos diretos. Não há benefício imediato para os pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo pretende avaliar os pacientes no acompanhamento ambulatorial, e ao mesmo tempo avaliar amostras do tumor já coletadas realizando novos experimentos. Serão estudados todos os

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.291.546

pacientes com diagnóstico de CCS realizado entre 1979 e 2012 em acompanhamento atual ou passado nos ambulatórios de endocrinologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo que estão incluídos no arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray; TMA) de tumores adrenocorticais já confeccionado previamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequada.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_930088.pdf	18/08/2017 13:47:28		Aceito
Outros	Cadastro_Online_AFassinada.pdf	18/08/2017 13:46:37	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES	Aceito
Outros	Cappesq_AF.pdf	18/08/2017 13:45:57	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_AFassinada.pdf	18/08/2017 13:44:15	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	Projeto_Detalhado_Amanda_Ferreira2.docx	11/07/2017 13:24:50	MARIA CANDIDA BARISSON	Aceito

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar

Bairro: Cerqueira Cesar

CEP: 05.403-010

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2661-7585

Fax: (11)2661-7585

E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Continuação do Parecer: 2.291.546

Investigador	Projeto_Detalhado_Amanda_Ferreira2.docx	11/07/2017 13:24:50	FRAGOSO	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	11/07/2017 13:18:34	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES FRAGOSO	Aceito
Outros	Cartas_de_Anuencia.pdf	07/07/2017 13:52:19	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES	Aceito
Cronograma	Cronograma.docx	25/05/2017 22:51:24	MARIA CANDIDA BARISSON VILLARES	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 22 de Setembro de 2017

Assinado por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Anexo IV. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.**DADOS DE IDENTIFICAÇÃO (OU ETIQUETA INSTITUCIONAL DE IDENTIFICAÇÃO) DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL**

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

 Rubrica do Pesquisador

 Rubrica do(a) participante

HOSPITAL DAS CLÍNICAS
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Estudo: “Análise da expressão da SOAT1 e da RRM1 no carcinoma do córtex da suprarrenal e seu impacto na resposta ao mitotano e no comportamento biológico do tumor”.

Pesquisador principal:

Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Instituição:

**Departamento de Clínica Médica, Disciplina de Endocrinologia e Metabologia - Unidade de Suprarrenal
Departamento de Anatomia Patológica, Laboratório de Investigação em Patologia Hepática (LIM-14)**

Convidamos o (a) Sr (a). para participar do estudo “Análise da expressão da SOAT1 e da RRM1 no carcinoma do córtex da suprarrenal e seu impacto na resposta ao mitotano e no comportamento biológico do tumor”. **Você é livre para decidir se quer participar ou não do estudo.**

Este estudo consiste numa pesquisa sobre novos fatores preditivos da resposta ao tratamento com mitotano e da evolução e prognóstico do carcinoma do córtex suprarrenal (CCS) e tem como objetivo identificar características do tumor que possam direcionar a melhor estratégia terapêutica para cada paciente.

Para isso, este estudo avaliará a expressão de duas proteínas (SOAT1 e RRM1) no tecido tumoral que já foi obtido quando da ressecção cirúrgica do tumor. Este estudo será realizado em pacientes com carcinoma do córtex suprarrenal em acompanhamento prévio ou atual no ambulatório de Suprarrenal/Endocrinologia. A análise das amostras teciduais (tumores primários e/ou metastáticos) dos pacientes será realizada no laboratório de investigação em patologia hepática (LIM-14) do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP.

O estudo será bastante simples e durante as consultas de rotina no ambulatório de endocrinologia será oferecida aos pacientes que continuam em seguimento a análise adicional da expressão destas duas proteínas nas amostras teciduais que já se encontram arquivadas no Departamento de Anatomia Patológica. Para os pacientes que ainda não foram submetidos ao tratamento cirúrgico, este estudo não alterará a indicação do tratamento e, caso o tratamento cirúrgico seja indicado, também será oferecida a oportunidade de avaliação destas duas proteínas além das avaliações já estabelecidas e realizadas rotineiramente.

Não há qualquer desconforto da pesquisa assim como não há risco de morbidade ao paciente.

O principal benefício desta pesquisa é avaliar se a resposta ao tratamento mitotano, caso este tenha sido indicado, é influenciada pela maior ou menor expressão destas proteínas. Um segundo objetivo é avaliar se a evolução da sua doença é influenciada ou não pela expressão destas duas proteínas no tumor.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgado a identificação de nenhum paciente.

Em qualquer momento você poderá ser atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas que sejam do conhecimento dos pesquisadores.

Você não terá despesas pessoais para participar do estudo incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do(a) participante

O material biológico (amostras parafinizadas do tumor) utilizado para esta pesquisa não sofrerá danos e continuará disponível para futuras análises. É compromisso do pesquisador utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. No futuro, caso surjam novas pesquisas, o material somente será avaliado após o seu consentimento e a assinatura de um novo consentimento. Toda nova pesquisa só será realizada com aprovação do sistema CEP – CONEP, que são os órgãos que fiscalizam a ética em pesquisa.

Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de dúvidas. O principal investigador é a Dra Maria Candida Barisson Villares Fragoso, que pode ser encontrada no endereço Av Dr Enéas de Carvalho Aguiar, 155 (Sala de Estudos Endocrinologia – entre o 4º e o 5º andar do PAMB), no telefone 26617512 (horário comercial) e e-mail mariafragoso@uol.com.br

Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 255 – 5º andar – tel: (11) 2661-7585 (11) 2661-1548; (11) 2661-1549; email: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “Análise da expressão da SOAT1 e da RRM1 no carcinoma do córtex da suprarrenal e seu impacto na resposta ao mitotano e no comportamento biológico do tumor”. Eu discuti as informações acima com a Pesquisadora Responsável Dra Maria Candida B V Fragoso ou pessoa (s) por ela delegada (s) (.....) sobre a minha decisão em participar neste estudo. Ficaram claros para mim os objetivos, os procedimentos, os potenciais desconfortos e riscos e as garantias. Concordo voluntariamente em participar deste estudo, assino este termo de consentimento e recebo uma via rubricada pelo pesquisador.

Assinatura do (a) Participante da Pesquisa / Responsável Legal

Data

Assinatura do (a) Responsável pelo estudo

Data

Rubrica do Pesquisador

Rubrica do(a) participante

Anexo V. Estudos piloto para a análise da imuno-histoquímica da SOAT1 e para a análise da imuno-histoquímica do SF-1.

Definições Estudo Piloto (SOAT1) – 18/01/2018

Profª Dra Maria Cláudia Nogueira Zerbini; Dr Iberê Cauduro Soares; Profª Dra Maria Candida Barisson Villares Fragoso; Aluna Amanda Meneses Ferreira Lacombe

Pontos discutidos:

1. A proteína SOAT1
2. Controle Negativo
3. Estruturas a serem avaliadas em relação à imunorreação
4. Graduação da intensidade da imunorreatividade
5. Graduação da extensão da imunorreatividade

1. A proteína SOAT

- Proteína codificada pelo gene *SOAT1*
- Membro da família das aciltransferases
- Expressa principalmente em órgãos endócrinos – suprarrenal; próstata; trato gastrointestinal; ovários e testículos
- Presente no retículo endoplasmático e catalisa a formação de ésteres de colesterol (partículas de colesterol esterificado) a partir do colesterol livre, sendo fundamental para a manutenção da homeostase intracelular do colesterol

2. Controle Negativo

- Controle negativo adequado

3. Estruturas celulares a serem analisadas em relação à imunorreatividade

Citoplasma

4. Graduação da intensidade

Intensidade	Pontuação
Ausente	0
Fraca/intermediária	0,5
Forte	1

5. Graduação da extensão

Extensão	Pontuação
0%	0
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Definições Estudo Piloto (SF1) – 21/01/2020

Profª Dra Maria Cláudia Nogueira Zerbini; Aluna Amanda Meneses Ferreira Lacombe

Pontos discutidos:

1. A proteína SF1
2. Controle Negativo
3. Estruturas a serem avaliadas em relação à imunorreação
4. Graduação da intensidade da imunorreatividade
5. Graduação da extensão da imunorreatividade

1. A proteína SF1

- Proteína codificada pelo gene *NR5A1*
- Essencial para a diferenciação sexual e formação dos tecidos envolvidos na esteroidogênese
- Marcador com alto valor diagnóstico na origem adrenocortical de uma neoplasia
- Marcador com alto valor prognóstico nas neoplasias adrenocorticais

2. Controle Negativo

- Controle negativo adequado

* O controle positivo está na própria amostra

3. Estruturas celulares a serem analisadas em relação à imunorreatividade

Núcleo

4. Graduação da Extensão

Extensão	Pontuação
0%	0 → Negativo
1-25%	1
26-50%	2
51-75%	3
76-100%	4

Anexo VI. Interpretação do coeficiente de concordância Kappa e do coeficiente de concordância intraclasse.

a - Tabela 20. Interpretação do coeficiente de concordância Kappa⁷⁵.

Valor do Coeficiente	Interpretação
< 0	Ausência de concordância
0 – 0,19	Concordância pobre
0,20 – 0,39	Concordância razoável
0,40 – 0,59	Concordância moderada
0,60 – 0,79	Concordância substancial
0,80 – 1,00	Concordância praticamente perfeita

b - Tabela 21. Interpretação do coeficiente de concordância intraclasse⁷⁶.

Valor do Coeficiente	Interpretação
< 0,5	Concordância pobre
0,5 < x < 0,75	Concordância moderada
0,75 < x < 0,9	Concordância alta
> 0,9	Concordância excelente

Anexo VII. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imunohistoquímica para o antígeno esterol O-acilcoenzima A: colesterol aciltransferase 1 (SOAT1).

a - Lâminas do TMA₁ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

b - Lâminas do TMA₂ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

c - Lâmina do TMA₃ de metástases de carcinoma do córtex suprarrenal

Anexo VIII. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imunohistoquímica para o antígeno Ki67.

a - Lâminas do TMA₁ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

b - Lâminas do TMA₂ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

c - Lâmina do TMA₃ de metástases de carcinoma do córtex suprarrenal

Anexo IX. Lâminas dos blocos das micromatrizes teciduais após reação de imunohistoquímica para o antígeno fator esteroidogênico 1 (SF-1).

a - Lâminas do TMA₁ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

b - Lâminas do TMA₂ de carcinomas do córtex suprarrenal (tumores primários)

c - Lâmina do TMA₃ de metástases de carcinoma do córtex suprarrenal

Anexo X. Planilhas dos dados

a - Planilha dos dados dos tumores primários

Nº caso	Data do diagnóstico/cirurgia	Sexo	Idade ao diagnóstico	Hipercortisolismo	Mutação TP53	Lado tumor	ENSAT	Peso tumor (g)	Tamanho tumor (cm)
278	13/10/2014	Masculino	83,18	Sim	Não	Direito	II	293,1	12
304	19/12/2016	Masculino	37,54	Sim	Não	Esquerdo	II		12
253	17/05/2013	Feminino	30,31	Sim	Não	Esquerdo	II		5,5
228	23/08/2010	Feminino	22,38	Não	Não	Direito	II		11
279	10/11/2014	Feminino	40,42	Sim	Não	Direito	IV	380	14
295	07/03/2016	Masculino	30,59	Sim	Sim	Esquerdo	IV	758,4	14,5
269	19/05/2014	Feminino	54,25	Sim	Não	Esquerdo	IV	1212	12
275	04/07/2014	Feminino	23,94	Não	Não	Esquerdo	III		
300	13/06/2016	Feminino	32,93	Sim	Não	Esquerdo	I	50,5	4,7
309	02/10/2017	Feminino	67,87	Sim	Sim	Direito	III		7
305	13/02/2017	Masculino	25,67	Sim	Sim	Esquerdo	IV	2629	19
290	31/08/2015	Masculino	61,25	Sim	Não	Esquerdo	III	148,5	15,7
223	08/10/2009	Masculino	53,96	Sim	Não	Esquerdo	IV		15
287	07/04/2015	Masculino	49,15	Sim	Não	Esquerdo	II	4400	27
221	16/07/2007	Masculino	80,36	Sim	Não	Esquerdo	II	110	7
289	24/08/2015	Feminino	35,01	Sim	Não	Direito	II	538,8	12,2
245	06/06/2012	Feminino	38,85	Não	Sim	Esquerdo	III		11
306	04/03/2016	Feminino	53,44	Sim	Não	Direito	IV	312,3	11,3
243	05/05/2012	Feminino	30,00	Não	Não	Esquerdo	II	91	7,8
220	26/02/2007	Feminino	61,29	Sim	Não	Esquerdo	II	1590	21
247	02/12/2012	Feminino	64,15	Sim	Não	Direito	III	210	12,5
310	27/11/2017	Feminino	49,83	Sim	Não	Direito	III	2480	18

Nº caso	Data do diagnóstico/cirurgia	Sexo	Idade ao diagnóstico	Hipercortisolismo	Mutação <i>TP53</i>	Lado tumor	ENSAT	Peso tumor (g)	Tamanho tumor (cm)
259	09/12/2013	Feminino	54,47	Sim	Não	Esquerdo	II		9,5
283	17/03/2015	Feminino	44,65	Sim	Sim	Direito	II		8
254	01/08/2013	Masculino	25,62	Sim	Não	Esquerdo	IV	423,7	15
308	10/08/2015	Masculino	30,04	Sim	Não	Direito	III	542	13
249	04/02/2013	Masculino	60,99	Sim	Não	Esquerdo	III	757	14
298	09/05/2016	Feminino	60,86	Não	Não	Direito	I		2,5
257	18/11/2013	Masculino	38,91	Sim	Sim	Esquerdo	III	850	14,5
286	03/08/2015	Feminino	61,69	Sim	Sim	Direito	IV	1677	18,4
14	04/02/1985	Feminino	49,41	Sim	Não	Esquerdo	III	150	10,5
198	24/10/2011	Feminino	31,68	Sim	Sim	Direito	IV	1270	16
189	23/08/2010	Feminino	22,38	Não	Não	Direito	II	316	11
135	04/09/2004	Feminino	58,76	Não	Não	Esquerdo	II	365	10
214	01/11/2011	Feminino	36,52	Sim	Não	Esquerdo	IV		
213	03/05/2011	Feminino	60,82	Não	Não	Esquerdo	II		8
77	21/03/2000	Feminino	33,27	Sim	Não	Esquerdo	IV	1900	22,5
201	19/12/2011	Masculino	66,51	Sim	Não	Esquerdo	II	2469	20
125	01/11/2000	Masculino	36,54	Não	Não	Esquerdo	II		
156	23/07/2007	Feminino	57,40	Não	Não	Direito	I	65	3,7
210	04/06/2012	Masculino	65,64	Sim	Não	Esquerdo	IV	489,4	13,5
130	06/09/2003	Feminino	51,43	Não	Não	Esquerdo	III	2370	23
43	23/11/1993	Masculino	30,02	Sim	Não	Direito	IV	665	19
178	31/01/2009	Masculino	23,27	Não	Não	Esquerdo	II		10
158	10/12/2007	Masculino	36,11	Não	Não	Direito	II	205,2	11
131	24/08/2001	Feminino	51,47	Sim	Não		II		6,5
136	19/10/2004	Feminino	29,70	Sim	Não		II		8
165	17/06/2008	Feminino	52	Não	Não	Esquerdo	II	180	12,5

Nº caso	Data do diagnóstico/cirurgia	Sexo	Idade ao diagnóstico	Hipercortisolismo	Mutação <i>TP53</i>	Lado tumor	ENSAT	Peso tumor (g)	Tamanho tumor (cm)
209	03/04/2012	Feminino	23,38	Sim	Não	Esquerdo	III	1038	11
72	26/11/1998	Feminino	23,57	Sim	Não	Direito	II	35	6,2
133	06/12/2003	Feminino	40,45	Sim	Não	Esquerdo	III	10	5,5
117	04/12/2006	Feminino	29,71	Não	Não	Direito	II	1370	20
176	02/03/2009	Feminino	30,90	Sim	Sim	Direito	III	310	12
203	01/02/2012	Feminino	79,57	Sim	Não	Direito	III		6,5
79_123	15/03/2000	Feminino	72,24	Não	Não	Esquerdo	III	1996	21
112	20/10/2003	Masculino	17,55	Sim	Não	Direito	II	165	9
109	09/04/2002	Feminino	15,37	Sim	Não	Direito	IV	1230	20
8	01/07/1983	Feminino	36,06	Sim	Sim	Direito	IV	2000	21
108	07/08/2001	Feminino	35,72	Sim	Sim	Esquerdo	I	40	2,2
82	18/07/2000	Masculino	30,75	Não	Não	Direito	III	330	11
179	08/10/2009	Feminino	55,59	Sim	Não	Direito	III	176	10,5
206	11/05/2009	Masculino	54,14	Sim	Não	Esquerdo	III	351,8	8,5
37	16/04/2012	Feminino	19,73	Sim	Não	Direito	II	360	11
168	03/12/1991	Feminino	22,61	Não	Não	Esquerdo	II	325	13
74	22/07/2008	Feminino	45,81	Sim	Sim	Direito	III	280	10
208	13/04/1999	Feminino	30,37	Não	Não	Direito	II	900	15
170	04/04/2012	Feminino	23,13	Sim	Não	Esquerdo	III	38	6
93_126	26/02/2007	Feminino	19,28	Sim	Não	Direito	I	15	2,5
163	18/08/2008	Feminino	17,71	Sim	Sim	Esquerdo	IV	117	10
157	02/07/2002	Feminino	63,37	Não	Não	Direito e Esquerdo	IV		9
95	19/05/2008	Masculino	46,68	Não	Não	Direito	III	1570	20
7	01/10/2007	Masculino	38,69	Sim	Sim	Esquerdo	II	810	15

Nº caso	Data do diagnóstico/cirurgia	Sexo	Idade ao diagnóstico	Hipercortisolismo	Mutação TP53	Lado tumor	ENSAT	Peso tumor (g)	Tamanho tumor (cm)
90	30/10/2001	Masculino	42,89	Não	Não	Esquerdo	III	1850	21
60	15/09/1997	Feminino	49,34	Sim	Não	Esquerdo	II	930	15,5
118	06/04/1993	Feminino	19,56	Sim	Não	Direito	III	1000	13
80	04/04/2020	Feminino	23,13	Sim	Não	Direito	IV	555	14
181	14/09/2009	Feminino	65,33	Sim	Não	Esquerdo	II	104,2	7
11	21/06/1979	Feminino	18,08	Sim	Não	Direito	III		21
194	30/05/2011	Feminino	43,8	Sim	Não	Esquerdo	I		4
41	30/03/1993	Feminino	29,28	Sim	Não	Esquerdo	III	550	12
212	11/07/2012	Feminino	66,19	Não	Não	Esquerdo	II	637	15
199	01/05/2010	Feminino	30,39	Sim	Não		II	364	10,5
129	02/08/2003	Feminino	21,33	Sim	Não	Direito	I		3,5
216	10/09/2012	Feminino	69,14	Sim	Não	Direito	I		4,5
164	26/05/2008	Feminino	37,65	Sim	Não	Direito	II		6
141	08/01/2005	Feminino	58,68	Não	Não	Direito	II	720	12
200	16/11/2011	Feminino	55,72	Sim	Não		II		10
153	21/12/2006	Feminino	49,66	Não	Não	Esquerdo	II		6,5
134	10/03/2004	Masculino	56,75	Sim	Não	Direito	IV	705	14
121	04/08/1997	Feminino	26,48	Sim	Não	Esquerdo	IV		16,3
105	10/10/2005	Masculino	66,97	Não	Não	Direito	II	55	6
21	13/11/1986	Feminino	46,02	Sim	Não	Esquerdo	IV	640	18
6	16/01/1981	Feminino	41,12	Sim	Não	Direito	II	445	11
124	03/10/2000	Masculino	43,4	Não	Não	Direito	III	1420	17,5
78	08/09/2008	Feminino	37,41	Não	Não	Direito	II		31,96
195	01/11/2006	Masculino	44,7	Não	Não	Direito	II	220,5	8,2

Nº caso	Data do diagnóstico/cirurgia	Sexo	Idade ao diagnóstico	Hipercortisolismo	Mutação <i>TP53</i>	Lado tumor	ENSAT	Peso tumor (g)	Tamanho tumor (cm)
56	24/03/1997	Feminino	17,32	Não	Não	D	IV	825	15
59	28/07/1997	Feminino	28,76	Não	Não	D	II	150	6,5
207	23/04/2012	Masculino	53,51	Sim	Não	E	III	1713	17
187	14/06/2010	Masculino	53,94	Sim	Não	D	I	15	3
139	16/12/2004	Feminino	27,59	Sim	Não	E	IV	935	13
149	23/06/1992	Feminino	36,49	Sim	Não	D	II	2600	12
106	26/04/2005	Feminino	40,41	Sim	Não	E	IV	1080	17
217	08/06/2005	Feminino	37,44		Não	D	II		12
38	31/03/1992	Feminino	37,31	Sim	Não	D	II	320	10
196	14/06/2011	Feminino	81	Sim	Não	E	II		14
114	31/05/2004	Feminino	44,05	Não	Não	E	IV	810	18
185	03/05/2010	Masculino	51,15	Não	Não	E	II	12,3	6
312	27/03/2013	Feminino	32,83	Sim	Não	D	II	2044	20,2
314	19/08/2015	Masculino	39,79	Não	Não	D	I		4,7
313	15/04/2015	Feminino	56,27	Não	Não	E	II	670	14
315	26/10/2016	Masculino	52,06	Não	Não	E	II		11,5
316	18/01/2011	Feminino	62,80	Não	Não	D	III		11
318	16/07/2018	Feminino	50,60	Sim	Não	E	IV		20
319	25/02/2019	Feminino	23,86	Sim	Não	E	II		7

Nº caso	Escore Weiss	Escore Weiss modificado	Ki67 (%)	Recorrência/ progressão da doença	Tempo para recorrência/ Progressão (m)	Óbito decorrente do CCS	Sobrevida global (m)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão gênica SOAT1	Expressão SF-1 (escore IHQ)
278	>6	>5	10	Não		Sim	0,6	1	0,356	1
304	3-6	3-5	20	Sim	11	Sim	18,63	4	0,595	3
253	>6	>5	40	Sim	7	Sim	24,5	4		1
228	3-6	3-5	14	Sim	26	Sim	86,06	4		2
279	>6	>5	40	Sim	0,9	Sim	0,93	4	0,774	4
295	>6	>5	35	Sim	2	Sim	16,83	3	0,767	4
269	>6	>5	75	Sim	2	Sim	16,66	2		1
275	3-6	3-5	25	Sim	4	Sim	27,5	2		1
300	3-6	3-5	5	Não			39,9	2	0,035	4
309	3-6	3-5		Não		Sim	0	4		2
305	>6	>5	50	Sim	3	Sim	6,06	4	2,161	1
290	>6	>5	30	Sim	8	Sim	33,16	0	0,146	4
223	>6	>5	60	Não	2	Sim	4,86	4		1
287	>6	>5	20	Sim	15	Sim	27,2	2		3
221	3-6	3-5	2,5	Não		Não	93,66	4		1
289	>6	>5	40	Sim	21	Sim	44,16	4	0,605	3
245	>6	>5	30	Sim	5	Não	89,83	2		3
306	>6	>5	30	Não		Não	11,96	0,5	0,23	4
243	3-6	3-5	5	Não		Não	48,9	2		2
220	3-6	3-5	20	Sim	18	Sim	32,46	0		1
247	>6	>5	30	Sim	13	Sim	69,2	1,5		3
310	>6	>5	80	Sim	7	Não	56,03	4		4
259	3-6	>5	20	Sim	6	Não	11,43	0	0,261	4
283	3-6	3-5	15	Sim	41	Não	37,2	2		1

Nº caso	Escore Weiss	Escore Weiss modificado	Ki67 (%)	Recorrência/progressão da doença	Tempo para recorrência/Progressão (m)	Óbito decorrente do CCS	Sobrevida global (m)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão gênica SOAT1	Expressão SF-1 (escore IHQ)
254	>6	>5	50	Sim	2	Sim	11,43	4		4
308	3-6	3-5	10	Não		Não	37,2	2		2
249	3-6	>5	60	Sim	2	Sim	28,86	4	0,567	4
298	>6	3-5	2,4	Não		Não	42	0	0,471	0
257	>6	>5	15	Sim	3	Sim	19,06	4	0,514	4
286	>6	>5	30	Não		Sim	9,53	4	0,299	4
14	>6	>5	5	Sim	9	Sim	35,66	0		0
198	>6	>5	80	Sim	2	Sim	12,63	4	0,324	4
189	3-6	3-5	15	Sim	25	Sim	86,06	2		3
135	3-6	3-5	2	Não		Não	183,76	0		0
214	>6	>5	30	Sim	3	Sim	27	4		4
213	3-6	>5	1	Sim	14	Sim	15,9	2		4
77	>6	>5				Sim	3,43	0		1
201	>6	>5	40	Sim	7	Sim	18,3	2		4
125				Sim	3	Sim	190,9	2	0,236	0
156	3-6		5	Não		Não	45,96	0		0
210	3-6		15	Sim	2	Sim	9,63	4	1,1	4
130	>6		10	Sim	12	Sim	17,06	3		2
43	>6		5	Não		Sim	3,56	2	0,268	2
178	3-6	3-5	20	Sim	60	Sim	104,23	2		3
158	>6	>5	40	Sim	21	Não	142,93	4		4
131	3-6	3-5	10	Sim	24	Sim	30,23	4		4
136	3-6		10	Sim	6	Sim	9,96	2		1
165	>6	>5	20	Sim	4	Sim	11,23	0		1

Nº caso	Escore Weiss	Escore Weiss modificado	Ki67 (%)	Recorrência/progressão da doença	Tempo para recorrência/Progressão (m)	Óbito decorrente do CCS	Sobrevida global (m)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão gênica SOAT1	Expressão SF-1 (escore IHQ)
209	3-6	>5	15	Não		Não	4,4	4		2
72	>6	3-5	2,5	Não		Não	253,3	2		1
133	3-6	3-5	2,5	Não		Não	51,16	4		2
117	3-6	3-5	1	Não		Não	156,93	2	0,344	2
176	>6	3-5	10	Sim	5	Sim	36,03	4	0,623	1
203	3-6	3-5	1	Não		Não	55,53	0		0
79_123	>6	3-5	15	Sim	14	Sim	31,9	0		1
112	>6	3-5	10			Não	60,93	0		1
109	>6	>5	50			Sim	21,83	0,5	0,427	3
8	>6	>5		Sim	2	Sim	4,1	4		1
108	3-6	3-5	2,5	Não		Não	210,73	4		3
82	3-6	3-5	15	Sim	3	Sim	12,16	3	0,543	3
179	>6	>5	50	Sim	8	Sim	35,63	4	1,509	4
206	3-6	3-5	1	Sim		Não	81,96	1		4
37	3-6	>5	10	Não		Não	102,7	0	1,931	1
168	3-6	>5	8	Não		Não	134,6	1		3
74	>6	>5	15	Não		Não	236,6	2		1
208	>6	>5	40	Não		Não	41,96	2		3
170	3-6	3-5	15	Sim	7	Sim	123,06	2	0,756	3
93_126	3-6	3-5	5	Não		Não	200,36	4	0,747	3
163	>6	>5	40	Sim	6	Sim	7,06	4	0,505	4
157	3-6	3-5	20	Sim	10	Sim	23,2	1,5		1
95	3-6	3-5	2,5	Não		Não	200,36	0		1
7	>6	>5		Sim	20	Sim	31,46	0,5		1

Nº caso	Escore Weiss	Escore Weiss modificado	Ki67 (%)	Recorrência/ progressão da doença	Tempo para recorrência/ Progressão (m)	Óbito decorrente do CCS	Sobrevida global (m)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão gênica SOAT1	Expressão SF-1 (escore IHQ)
90	3-6	3-5	2,5	Sim	11	Sim	21,03	0		1
60	3-6		15	Não		Não	252,46	2		1
118	>6	>5	70	Sim	8	Sim	18,4	4		4
80	>6	3-5	10	Sim	4	Sim	15,4	3		3
181	3-6	3-5	10	Não		Sim	13,53	0		1
11	>6	>5	5	Sim	48	Sim	60,53	4		3
194	3-6	3-5	5	Não		Sim	24,1	2	0,96	4
41	3-6			Sim	15	Sim	30,8	0	0,051	1
212	3-6	3-5	15	Não		Não	23,33	0	1,137	2
199	3-6	3-5	2,5	Não		Não	27,43	2		1
129	3-6	3-5	2,5	Não		Não	185,8	4		3
216	3-6	3-5	5	Não		Não	79,86	0,5	2,105	4
164	3-6	>5	15	Sim	7	Sim	33,93	1	0,017	2
141	3-6	3-5	2	Não		Não	170,7	2		3
200	3-6	3-5	5	Não		Não	94,7	0		3
153	3-6		2,5	Não		Não	147,66	2		1
134	3-6	3-5	70	Não		Sim	0,9	4		4
121	>6	3-5	15	Sim	4	Sim	7,26	4	1,852	1
105	3-6	3-5	2,5	Não		Não	169	4		4
21	3-6		1	Não		Não	385,6	0		0
6	3-6	3-5		Não		Não	381,66	0	0,044	0
124	>6		10	Sim	3	Sim	4,5	0		1
78	3-6	3-5	5	Não		Não	128,4	2		4
195	>6	>5	15	Sim	33	Sim	88,16	0		2

Nº caso	Escore Weiss	Escore Weiss modificado	Ki67 (%)	Recorrência/progressão da doença	Tempo para recorrência/Progressão (m)	Óbito decorrente do CCS	Sobrevida global (m)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão gênica SOAT1	Expressão SF-1 (escore IHQ)
56	3-6	3-5	10	Não		Sim	126,53	2	0,055	1
59	3-6	3-5	5	Não		Não	24,56	0		2
207	>6	>5	70	Sim	9	Sim	9,96	2	0,101	1
187	3-6	3-5	1	Não		Não	104,83	4		4
139	>6	>5	40	Sim	4	Sim	9,93	3	0,542	3
149				Sim	5	Sim	12,53	2		2
106	>6	>5	15	Sim	6	Sim	37,2	2		3
217			5	Não		Não	173,06	0		0
38	3-6	>5		Sim	14	Sim	21,66	2	0,393	2
196	3-6	3-5	10	Sim	21	Sim	35,73	4		3
114	>6		15	Sim	7	Sim	35,83	1,5	2,366	3
185	3-6	3-5	2,5	Não		Não	115,26	4		4
312	3-6	>5	30	Sim	24	Sim	73,95	2		3
314	3-6	3-5		Sim	25	Não	50,2	0		1
313	3-6	3-5	15	Sim	37	Não	54,66	1,5		1
315	>6	>5	60	Sim	7	Não	31,9	4		3
316	>6	>5		Sim	9	Sim	14,06		0,217	
318	>6	>5	40	Sim	8	Não	15,76		0,197	
319	3-6	3-5	15	Não		Não	8		1,022	

b - Planilha dos dados das metástases

Nº caso	Sítio da metástase	Tempo entre a ressecção do tumor primário e da metástase (m)	Tamanho Metástase (cm)	Escore de Weiss adaptado	Ki67 (%)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão SF-1 (escore IHQ)
M98a	Recorrência local	15,96	6,5		0	2	0
M137a	Fígado	5,64	3,2		5	4	1
M158a	Recorrência local	20,64	14		70	2	4
M164a	Recorrência local	8,04	8		60	2	3
M170a	Pulmão	51,84		6	10	2	3
M170b1	Pulmão	80,28		6	5	4	1
M170b2	Pulmão	80,28		6	5	2	3
M170c	Pulmão	52,32		6	5	2	0
M170d	SNC	91,44		3	15	2	4
M170e1	Pulmão	85,8		3	5	1,5	2
M170e2	Pulmão	85,8		3	0	3	3
M170e3	Pulmão	85,8		3	5	1	0
M170e4	Pleura/pericárdio	85,8		4	5	2	2
M170e5	Pleura/pericárdio	85,8		4	0	4	4
M170f	SNC	103,68		5	10	4	4
M170g1	Mama	99,12		2	0	0	0
M170g2	Mama	99,12			0	2	0
M170g3	Mama	99,12		4	0	2	2
M178a	Intra-abdominal não local	59,52			5	2	0
M204a	Intra-abdominal não local	16,08			15	3	3
M204b	Intra-abdominal não local	26,04			30	0	2
M223a1	SNC	5,04			25	2	1

Nº caso	Sítio da metástase	Tempo entre a ressecção do tumor primário e da metástase (m)	Tamanho Metástase (cm)	Escore de Weiss adaptado	Ki67 (%)	Expressão proteica SOAT1 (escore IHQ)	Expressão SF-1 (escore IHQ)
M247a1	Pulmão	21,24		4	15	4	4
M247a2	Pulmão	21,24		6	10	3	3
M247b	Pulmão	29,76		4	8	4	4
M289a1	Pulmão	27,72	1,7	6	25	3	2
M289a2	Pulmão	27,72	1,7	5	30	0	3
M289b	SNC	36,12	2,5	7	80	4	4
M302a	Fígado	20,4		7	80	4	4
M312a	Recorrência local	23,52			20	1,5	2
M312b	Intra-abdominal não local	36,48		5	15	2	0
M313a	Intra-abdominal não local	37,2		5	10	2	2
M314a	Pulmão	24,36	0,8	4	8	2	0
M314b	Pulmão	29,88		6	15	2	1
M318a	Pulmão	6,96	1		5	2	0
M319a1	Recorrência local	12,24	4,5		20	4	4
M319a2	Recorrência local	12,24	4,5		20	4	4
							1
M321a	Fígado	30,48		6	8	4	2
M322a1	Pulmão	16,2		6	5	0	3
M322a2	Pulmão	16,2		5	0	0	0
M322a3	Pulmão	16,2		3	8	2	4
M323a	SNC	14,28		8	70	2	0

8 REFERÊNCIAS

1. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(12):4551–4564.
2. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(6):2027–2037.
3. Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis and treatment. *Front Cell Dev Biol.* 2015;3(45):1–8.
4. Wajchenberg BL, Pereira MAA, Medonca BB et al. Adrenocortical carcinoma clinical and laboratory observations. *Cancer.* 2000;88(4):711–736.
5. de Sousa GR, Ribeiro TC, Faria AM et al. Low DICER1 expression is associated with poor clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Oncotarget.* 2015;6(26):22724–22733.
6. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2009;23(2):273–289.
7. Bancos I, Artl W. Diagnosis of a malignant adrenal mass: the role of urinary steroid metabolite profiling. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2017;24(3):200–207.
8. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. 1997;82(7):2027–2031). *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2027–2031.
9. Scollo C, Russo M, Trovato MA et al. Prognostic factors for adrenocortical carcinoma outcomes. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2016;7(99):1–6.
10. Fassnacht M, Artl W, Bancos I et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2016;175(2):1–34.
11. Fassnacht M, Dekkers O, Else T et al. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol.* 2018;179(4):1–46.
12. Berruti A, Baudin E, Gelderblom H et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2012;23(7):131–8.
13. Deandreis D, Leboulleux S, Caramella C et al. FDG PET in the management of patients with adrenal masses and adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer.* 2011;2(6):354–362.
14. Baudin E, Takeuchi S, Balachandran A et al. Impact of 18F-FDG PET/CT on the

- management of adrenocortical carcinoma: analysis of 106 patients. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*. 2014;41(11):2066–2073.
15. Lau SK, Weiss LM. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum Pathol*. 2009;40(6):757–768.
 16. Assié G, Jouinot A, Bertherat J. The “omics” of adrenocortical tumours for personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol*. 2014;10(4):215–228.
 17. Sbiera S, Schmull S, Assie G et al. High diagnostic and prognostic value of Steroidogenic Factor-1 expression in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(10):161–171.
 18. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W et al. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):841–849.
 19. Goldblum JR, Shannon R, Kaldjian EP et al. Immunohistochemical assessment of proliferative activity in adrenocortical neoplasms. *Mod Pathol*. 1999;6(6):663–638.
 20. Faria AM; Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Molecular Cell Endocrinol*. 2012;351(1):52–57.
 21. Zini L, Porpiglia F, Fassnacht M. Contemporary management of adrenocortical carcinoma. *Eur Assoc Urol*. 2011;60(5):1055–1065.
 22. Vanbrabant T, Fassnacht M, Assie G et al. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(6):429–436.
 23. Berruti A, Fassnacht M, Haak H et al. Prognostic role of overt hypercortisolism in completely operated patients with adrenocortical cancer. *Eur Urol*. 2014;65(4):832–838.
 24. Duregon E, Cappellesso R, Maffei V et al. Validation of the prognostic role of the “Helsinki Score” in 225 cases of adrenocortical carcinoma. *Hum Pathol*. 2017;62:1–7.
 25. de Reynies A, Assie G, Rickman DS et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1108–1115.
 26. Gudmundsson KO, Thorsteinsson L, Sigurjonsson OE et al. Gene expression

- analysis of hematopoietic progenitor cells identifies Dlg7 as a potential stem cell gene. *Stem Cells*. 2007;25(6):1498–1506.
27. Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzuco TL et al. Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients. *Eur J Endocrinol / Eur Fed Endocr Soc*. 2012;166(1):61–67.
 28. Mohan DR, Lerario AM, Else T et al. Targeted assessment of G0S2 methylation identifies a rapidly recurrent, routinely fatal molecular subtype of adrenocortical carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2019;25(11):3276–3288.
 29. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet*. 2014;46(6):607–612.
 30. Maharjan R, Backman S, Akerstrom T et al. Comprehensive analysis of CTNNB1 in adrenocortical carcinomas: Identification of novel mutations and correlation to survival. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–10.
 31. Jouinot A, Assie G, Libe R et al. DNA methylation is an independent prognostic marker of survival in adrenocortical cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(3):923–932.
 32. Rechache NS, Wang Y, Stevenson HS et al. DNA methylation profiling identifies global methylation differences and markers of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(6):1004–1012.
 33. Fonseca AL, Kugelberg J, Starker LF et al. Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. *Genes Chromosom Cancer*. 2012;51(10):949–960.
 34. Barreau O, Assié G, Wilmot-Roussel H et al. Identification of a CpG island methylator phenotype in adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):174–184.
 35. Assie G, Jounot A, Fassnacht M et al. Value of molecular classification for prognostic assessment of adrenocortical carcinoma. *JAMA Oncol*. 2019.
 36. Berruti A, Grisanti S, Pulzer A et al. Long-term outcomes of adjuvant mitotane therapy in patients with radically resected adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(4):1358–1365.
 37. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M et al. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Eng J Med*. 2007;356(23):2372–2380.

38. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Eng J Med*. 2012;366(23):2189–2197.
39. Sbiera S, Leich E, Liebisch G et al. Mitotane inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 triggering lipid-mediated endoplasmic reticulum stress and apoptosis in adrenocortical carcinoma cells. *Endocrinology*. 2015;156(11):3895–3908.
40. Bergenstal DM, Lipsett MB, Moy R et al. Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in man by o,p'-DDD. *Trans Assoc Am Physicians*. 1959;72:341-350.
41. Hescot S, Slama A, Lombès A et al. Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(3):371–381.
42. Terzolo M, Zaggia B; Allasino B et al. Practical treatment using mitotane for adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014;21(3):159–165.
43. Poli G, Guasti D, Rapizzi E et al. Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(4):537-550.
44. Germano A, Rapa I, Volante M et al. RRM1 modulates mitotane activity in adrenal cancer cells interfering with its metabolism. *Molecular Cell Endocrinol*. 2015;401:105–110.
45. Volante M, Terzolo M, Fassnacht M et al. Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3452-3461.
46. Cerquetti L, Sampaoli C, Amendola D et al. Mitotane sensitizes adrenocortical cancer cells to ionizing radiations by involvement of the cyclin B1/CDK complex in G2 arrest and mismatch repair enzymes modulation. *Int J Oncol*. 2010;37(2):493–501.
47. Gharzai LA, Green MD, Griffith KA et al. Adjuvant radiation improves recurrence-free survival and overall survival in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019;104(9):3743–3750.
48. Jasin S, Habra MA. Management of adrenocortical carcinoma. *Curr Oncol Rep*. 2019;21(3):1-11.
49. Consentini D, Grisanti S, Dalla Volta A. Immunotherapy failure in adrenocortical

- cancer: where next? *Endocr Connect*. 2018;7(12):5-8.
50. Costa de Freitas RM, Caldas JGMP, Verst SM et al. Crossed-Probes cryoablation for the treatment of a sclerotic vertebral metastasis abutting the spinal canal. *J Vasc Interv Radiol*. 2020;31(2):284–285.
 51. Berruti A, Terzolo M, Sperone P et al. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):657–666.
 52. Ferraz-de-Souza B, Hudson-Davies RE, Lin L et al. Sterol O-Acyltransferase 1 (SOAT1, ACAT) is a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NRSA1, Ad4BP) in the human adrenal. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(4):663–668.
 53. Yang J, Wang L, Jia R. Role of de novo cholesterol synthesis enzymes in cancer. *J Cancer*. 2020;11(7):1761–1767.
 54. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000.
 55. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674.
 56. Cruz ALS, Barreto EA, Fazolini NPB et al. Lipid droplets: platforms with multiple functions in cancer hallmarks. *Cell Death Dis*. 2020;11(2):105.
 57. Geng F, Cheng X, Wu X et al. Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth via blocking SREBP-1-mediated lipogenesis. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21):5337–5348.
 58. Jiang Y, Sun A, Zhao Y et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*. 2019;**567(7747)**:257–261.
 59. Saaron P, Cretu D, Musrap N et al. Quantitative proteomics reveals that enzymes of the ketogenic pathway are associated with prostate cancer progression. *Proteomics, Mol Cell*. 2013;12(6):1589–1601.
 60. Li J, Gu D, Lee SS et al. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene*. 2016;35(50):6378–6388.
 61. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998;4(7):844–847.
 62. Andrade VP, Cunha IW, Silva EM et al. O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J Bras Patol Med Lab*. 2007;43(1):55–60.
 63. Hassan S, Ferrario C, Mamo A, Basik M. Tissue microarrays: Emerging standard

- for biomarker validation. *Curr Opin Biotechnol.* 2008;19(1):19–25.
64. Camp RL, Neumesiter V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress in the discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol.* 2008;26(34):5630–5637.
 65. Livak JK, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402–408.
 66. Eisenhauer E, Therasse P, Bogaerts J et al. New response evaluation criteria in solid tumours: revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur J Cancer.* 2009;45(2):228-247.
 67. Ferreira AM, Brondani VB, Helena VP et al. Clinical spectrum of Li-Fraumeni syndrome/Li-Fraumeni-like syndrome in Brazilian individuals with the TP53 p.R337H mutation. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2019;190:250–255.
 68. Petan T, Jarc E, Jusovic M. Lipid droplets in cancer: guardians of fat in a stressful world. *Molecules.* 2018;23(8):1941.
 69. Maan M, Peters JM, Dutta M et al. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2018;504(3):582–589.
 70. Tirinato L, Pagliari F, Limongi T et al. An overview of lipid droplets in cancer and cancer stem cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:1656053.
 71. Smith DC, Kroiss M, Kebebew E et al. A phase 1 study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma. *Invest New Drugs.* 2020.
 72. Kroiss M, Quinkler M, Lutz WK et al. Drug interactions with mitotane by induction of CYP3A4 metabolism in the clinical management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2011;75(5):585–591.
 73. Geng F, Cheng X, Wu X et al. Inhibition of SOAT1 suppresses glioblastoma growth via blocking SREBP-1-mediated lipogenesis. *Clin Cancer Res.* 2016;22(21):5337–5348.
 74. Fuhrman SA, Lasky LC LC. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1982;6:655–666.
 75. McHugh ML. Interrater reliability: the kappa statistic. *Biochem Med.* 2012;22(3):276–282.
 76. Koo TK, Li MY. A guideline of selecting and reporting intraclass correlation

coefficients for reliability research. *J Chiropr Med.* 2016;15(2):155–163.

APÊNDICE

Article

Sterol O-Acyl Transferase 1 as a Prognostic Marker of Adrenocortical Carcinoma

Amanda Meneses Ferreira Lacombe ¹ , Iberê Cauduro Soares ², Beatriz Marinho de Paula Mariani ¹, Mirian Yumie Nishi ¹, João Evangelista Bezerra-Neto ³ , Helaine da Silva Charchar ¹, Vania Balderrama Brondani ¹, Fabio Tanno ⁴, Victor Srougi ⁴, José Luiz Chambo ⁴, Ricardo Miguel Costa de Freitas ⁵, Berenice Bilharinho Mendonça ¹, Ana O. Hoff ⁶, Madson Q. Almeida ^{1,6}, Isabel Weigand ⁷, Matthias Kroiss ⁷, Maria Claudia Nogueira Zerbini ⁸ and Maria Candida Barisson Villares Fragoso ^{1,6,*}

- ¹ Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Serviço de Endocrinologia e Metabolgia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo, SP 05403-900, Brazil; amflacombe@usp.br (A.M.F.L.); beatrizmariani@usp.br (B.M.d.P.M.); minishi@usp.br (M.Y.N.); helaine.charchar@hc.fm.usp.br (H.d.S.C.); vbbondani@usp.br (V.B.B.); beremen@usp.br (B.B.M.); madson.a@hc.fm.usp.br (M.Q.A.)
- ² Serviço de Anatomia Patológica, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, São Paulo, SP 01246-000, Brazil; ibere.soares@hc.fm.usp.br
- ³ Serviço de Oncologia Clínica, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, São Paulo, SP 01246-000, Brazil; joao.evangelista@hc.fm.usp.br
- ⁴ Serviço de Urologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, São Paulo, SP 05403-000, Brazil; fabio.tanno@hc.fm.usp.br (F.T.); victor.srougi@usp.br (V.S.); chambojl@uol.com.br (J.L.C.)
- ⁵ Serviço de Radiologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, São Paulo, SP 01246-000, Brazil; ricardo.freitas@hc.fm.usp.br
- ⁶ Serviço de Endocrinologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, São Paulo, SP 01246-000, Brazil; ana.hoff@hc.fm.usp.br
- ⁷ Departamento de Medicina Interna, Unidade de Endocrinologia e Diabetes, Hospital da Universidade de Würzburg, Josef-Schneider-Straße, 97080 Würzburg, Germany; weigand_i@ukw.de (I.W.); Kroiss_M@ukw.de (M.K.)
- ⁸ Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo, SP 01246-903, Brazil; czerbini@usp.br
- * Correspondence: mariafragoso@uol.com.br or maria.villares@hc.fm.usp.br; Tel.: +55-11-266-133-58

Received: 24 December 2019; Accepted: 14 January 2020; Published: 19 January 2020

Abstract: Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare endocrine malignancy with an unfavorable prognosis. Despite the poor prognosis in the majority of patients, no improvements in treatment strategies have been achieved. Therefore, the discovery of new prognostic biomarkers is of enormous interest. Sterol-O-acyl transferase 1 (SOAT1) is involved in cholesterol esterification and lipid droplet formation. Recently, it was demonstrated that SOAT1 inhibition leads to impaired steroidogenesis and cell viability in ACC. To date, no studies have addressed the impact of SOAT1 expression on ACC prognosis and clinical outcomes. We evaluated SOAT1 expression by quantitative real-time polymerase chain reaction and immunohistochemistry in a tissue microarray of 112 ACCs (Weiss score ≥ 3) from adults treated in a single tertiary center in Brazil. Two independent pathologists evaluated the immunohistochemistry results through a semiquantitative approach (0–4). We aimed to evaluate the correlation between SOAT1 expression and clinical, biochemical and anatomopathological parameters, recurrence-free survival (RFS), progression-free survival (PFS), and overall survival (OS). SOAT1 protein expression was heterogeneous in this cohort, 37.5% of the ACCs demonstrated a strong

SOAT1 protein expression (score > 2), while 62.5% demonstrated a weak or absent protein expression (score ≤ 2). Strong SOAT1 protein expression correlated with features of high aggressiveness in ACC, such as excessive tumor cortisol secretion ($p = 0.01$), an advanced disease stage [European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) staging system 3 and 4 ($p = 0.011$)] and a high Ki67 index ($p = 0.002$). In multivariate analysis, strong SOAT1 protein expression was an independent predictor of a reduced OS (hazard ratio (HR) 2.15, confidence interval (CI) 95% 1.26–3.66; $p = 0.005$) in all patients ($n = 112$), and a reduced RFS (HR 2.1, CI 95% 1.09–4.06; $p = 0.027$) in patients with localized disease at diagnosis ($n = 83$). Our findings demonstrated that SOAT1 protein expression has prognostic value in ACC and reinforced the importance of investigating SOAT1 as a possible therapeutic target for patients with ACC.

Keywords: adrenocortical carcinoma; prognostic factors; SOAT1; target therapies

1. Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare neoplasia with an estimated incidence of 0.5–2.0/million/year in adults [1,2]. A significant number of patients already present with metastatic disease at diagnosis and have a median overall survival (OS) of 12–15 months and limited therapeutic options. Even after complete resection in cases of localized disease at diagnosis, ACC harbors a significant risk for recurrence and metastatic spread [2,3]; however, this risk is not easily predictable [4]. The exploration of new prognostic biomarkers with possible implications for better decision-making about how to use the available therapies and the development of new therapeutic alternatives is therefore of great interest.

Sterol-O-acyl transferase 1 (SOAT1) is a target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1) in the human adrenal [5] and encodes SOAT1 protein. SOAT1 is ubiquitously expressed in most cell types and tissues, but its highest expression is observed in adrenocortical cells (www.proteinatlas.org). SOAT1 is an enzyme present in sub-domains of the endoplasmic reticulum (ER) and catalyzes the formation of cholesterol esters from free cholesterol into lipid droplets (LDs) [6]. This protein is essential for providing intracellular cholesterol homeostasis, maintaining appropriate concentrations of unesterified cholesterol within cells for membrane stability, and protecting adrenal cells from the potentially harmful effects of excess free cholesterol [7].

Emerging evidence demonstrates that lipid metabolism undergoes reprogramming in cancer cells. In glioblastoma (GBM), cholesterol esterification and lipid droplet formation are a hallmark of the neoplasia, correlate with its aggressive behavior, and inversely correlate with OS [8]. In hepatocellular carcinoma, a subgroup of patients characterized by disrupted cholesterol homeostasis present the lowest overall rate of survival and the greatest risk for a poor prognosis; interestingly, the signature of this subgroup is also high SOAT1 expression [9]. In addition, the Human Pathology Atlas data (www.proteinatlas.org/pathology) show that the upregulation of SOAT1 is also significantly correlated with OS in thyroid cancer ($n = 501$, $p = 0.047$), head and neck cancer ($n = 499$, $p = 0.002$), stomach cancer ($n = 354$, $p = 0.005$), and renal cancer ($n = 877$, $p = 0.007$) [10]. Consistently, high levels of SOAT1 expression have also previously been reported to be associated with a poor prognosis in prostate and pancreatic cancer [11,12]. Taken together, these results strongly suggest that the elevated expression of SOAT1 may be a general feature of diverse cancers, and that this protein might be widely used as a prognosis biomarker and therapeutic target for multiple tumors.

In 2015, Sbiera et al. demonstrated that in vitro SOAT1 inhibition led to impaired steroidogenesis and cell viability in ACC, mostly due to ER stress triggered by a reduction in cholesterol esters and an increase in free cholesterol and fatty acids in the intracellular environment. The perpetuation of ER stress led to an increased expression of proapoptotic genes and a reduction in antiapoptotic genes, resulting in cellular apoptosis. In addition, this process resulted in the reduced expression of

sterol-responsive genes and, consequently, in reduced steroidogenesis. This same study described SOAT1 as a prominent molecular target for mitotane, the most widely used drug for ACC [6].

To date, no studies have addressed the impact of SOAT1 expression on ACC prognosis and clinical outcomes. The aims of our study were to investigate the expression of SOAT1 at the messenger and protein levels in a large cohort of ACCs in adults and to evaluate the correlation between SOAT1 expression and clinical, biochemical and anatomopathological parameters, recurrence-free survival (RFS), progression-free survival (PFS), and OS.

2. Results

2.1. SOAT1 Protein Expression

Significant heterogeneity in SOAT1 protein expression was observed in our cohort. Strong SOAT1 expression was found in 42 out of 112 carcinomas (37.5%), and a weak or absent SOAT1 protein expression was observed in the remaining cases (Table 1 and Figure 1). Strong SOAT1 protein expression was significantly more frequent in cortisol-producing ACCs, in patients with more advanced disease stage at diagnosis (according to the European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) staging system), and in carcinomas exhibiting a higher Ki67 index (Table 2).

Table 1. Frequency of immunoreactivity scores (0–4) for Sterol-O-acyl transferase 1 (SOAT1) protein in 112 adrenocortical carcinomas and categorization of cases according to protein expression.

Cases	SOAT1 Immunoreactivity Score						
	Weak or Absent Protein Expression (Score ≤ 2)					Strong Protein Expression (Score > 2)	
	0	0.5	1	1.5	2	3	4
<i>n</i> (%)	26 (23.2)	4 (3.6)	4 (3.6)	4 (3.6)	32 (28.5)	5 (4.5)	37 (33)
<i>n</i> (%)	70 (62.5)					42 (37.5)

Figure 1. (A) Strong immunoreactivity (score 4) for SOAT1 in a cortisol-producing metastatic adrenocortical carcinoma (ACC) in a 30-year-old man presenting an unfavorable outcome with an overall survival of 16 months (400 $\times$). (B) Absent immunoreactivity (score 0) for SOAT1 in a non-functioning ACC in a 61-year-old woman presenting a favorable outcome after 42 months of follow-up (400 $\times$).

Table 2. Relationship between SOAT1 protein expression and baseline clinical and biochemical parameters, and surgical specimen histological characteristics from 112 adult patients with ACC (only tumor samples derived from primary surgery).

Characteristic	SOAT1 Protein Expression		<i>p</i> *
	Weak or Absent (≤ 2)	Strong (> 2)	
<i>n</i> (%)	70 (62.5)	42 (37.5)	
Sex— <i>n</i> (%)			
Female	53 (75.7)	26 (61.9)	0.181
Male	17 (24.3)	16 (38.1)	
Age (years)			
Median	43.6 (15.38–83.19)	36.32 (17.71–81)	0.32 **
Tumor size (cm)			
Median	11.15 (2.5–27)	12.2 (2.2–23)	0.792 **
Hormonal status— <i>n</i> (%)			
Cushing	40 (58)	35 (83.3)	0.01
Non-Cushing	29 (42)	7 (16.7)	
Stage (ENSAT)— <i>n</i> (%)			
1–2	45 (64.3)	15 (35.7)	0.011
3–4	25 (35.7)	27 (64.3)	
Weiss score			
3–6	42 (62.7)	18 (42.9)	0.068
>6	25 (37.3)	24 (57.1)	
Ki67 index (%)			
Median	10 (1–75)	17.5 (1–80)	0.002 **

ENSAT, European Network for the Study of Adrenal Tumors. * Independence test (chi-square test with continuity correction or chi-square test). ** Student's *t*-Test for independent samples.

2.2. Survival Analysis

Strong SOAT1 protein expression was significantly correlated with reduced OS ($p = 0.0061$) in ACCs (Figure 2). The 112 cases were separated into two different groups according to ENSAT stage at diagnosis, and we evaluated the impact of SOAT1 protein expression on PFS in the subgroup of patients with metastatic disease at diagnosis (ENSAT 4; $n = 22$), and on RFS in the subgroup of patients with localized disease at diagnosis who underwent complete surgical resection of the primary tumor (resection status R0 ($n = 83$)). In addition, strong SOAT1 protein expression solely correlated with a reduced PFS ($p = 0.019$) but did not correlate with a reduced RFS ($p = 0.25$) (Figure 3).

Figure 2. Impact of SOAT1 protein expression on overall survival in 112 adult patients with ACC (tumor samples derived from primary surgery).

Figure 3. Impact of SOAT1 protein expression on (A) recurrence-free survival and (B) progression-free survival in adult patients with ACC. For recurrence-free survival analysis, only patients with localized disease at diagnosis who underwent complete resection of the primary tumor (status of resection R0) have been analyzed, and for progression-free survival, only metastatic patients at diagnosis have been analyzed.

Regarding OS, Cushing's syndrome ($p = 0.013$), an ENSAT 3/4 stage ($p < 0.0001$), a Weiss score > 6 ($p < 0.0001$), a Ki67 index $> 10\%$ ($p < 0.0001$), and strong SOAT1 protein expression ($p = 0.007$), were associated with reduced OS. In multivariate analysis, only an ENSAT 3/4 stage (hazard ratio (HR) 2.93, 95% confidence interval (CI) 1.68–5.13; $p < 0.0001$), a Ki67 index $> 10\%$ (HR 3.11, 95% CI 1.71–5.67; $p < 0.0001$), and strong SOAT1 protein expression (HR 2.15, 95% CI 1.26–3.66; $p = 0.005$) remained predictors of reduced OS.

When focusing on completely resected ACC (status of resection R0), an ENSAT 3 stage ($p = 0.014$), Weiss score > 6 ($p < 0.0001$), and Ki67 index $> 10\%$ ($p < 0.0001$) were associated with reduced RFS

(Table 3). Strong SOAT1 expression did not, in the univariate analysis, correlate with reduced RFS ($p = 0.24$). However, when considering features of established importance in ACC prognosis, we did show that this is an important predictor of recurrence in the multivariate analysis—a Ki67 index $> 10\%$ (HR 9.87, 95% CI 4.39–22.2; $p < 0.0001$) and strong SOAT1 protein expression (HR 2.1, 95% CI 1.09–4.06; $p = 0.027$) were predictors of reduced RFS.

PFS was not evaluated through a multivariate analysis since the number of patients with metastatic disease at diagnosis was small ($n = 22$).

Table 3. Prognostic factors for overall survival, recurrence-free survival, and progression-free survival in adult patients with ACC (only tumor samples derived from primary surgery).

Variables	Univariate Analysis			Multivariate Analysis		
	Overall Survival					
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% IC	<i>p</i>
Cushing's syndrome	2.019	1.16–3.5	0.013			
ENSAT 3/4 stage	3.48	2.11–5.75	<0.0001	2.93	1.68–5.13	<0.0001
Weiss Score > 6	3.47	2.08–5.77	<0.0001			
Ki67 > 10%	3.67	2.04–6.59	<0.0001	3.11	1.71–5.67	<0.0001
Strong SOAT1 protein expression	1.94	1.19–3.15	0.007	2.15	1.26–3.66	0.005
	Recurrence-Free Survival					
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% IC	<i>p</i>
Cushing's syndrome	1.16	0.64–2.11	0.619			
ENSAT 3 stage	14	1.85–105.5	0.014			
Weiss Score > 6	3.33	1.8–6.15	<0.0001			
Ki67 > 10%	9.05	4.12–19.81	<0.0001	9.87	4.39–22.2	<0.0001
Strong SOAT1 protein expression	1.44	0.78–2.67	0.241	2.1	1.09–4.06	0.027
	Progression-Free Survival					
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% IC	<i>p</i>
Cushing's syndrome	1.64	0.37–7.26	0.514			
Weiss Score > 6	2.45	0.52–11.43	0.252			
Ki67 > 10%	3.37	0.44–25.64	0.24			
Strong SOAT1 protein expression	4.1	1.14–14.7	0.03			

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; ENSAT, European Network for the Study of Adrenal Tumors.

2.3. SOAT1 Protein Expression and Ki67 Index

Since the Ki67 proliferation index is the most widely used prognostic factor for ACC in clinical practice, we evaluated the impact of the combination of the Ki67 index and SOAT protein expression on OS and RFS (Ki67 index available for 102 and 76 patients, respectively). The combination of a Ki67 index $> 10\%$ with strong expression of the SOAT1 protein (score > 2) significantly indicated worse outcomes compared to the presence of a Ki67 index $> 10\%$ associated with weak or absent SOAT1 expression (score ≤ 2) (HR 2.65, 95% CI 1.43–4.9; $p = 0.002$ for OS; HR 2.24, 95% CI 1.02–4.95; $p = 0.044$ for RFS), suggesting that these two prognostic markers may be complementary and may define a subgroup of patients with an even more unfavorable prognosis (Figure 4).

When the subgroup of patients with Ki67 $\leq 10\%$ was analyzed, strong SOAT1 protein expression did not significantly impact OS (HR 1.27, CI 0.46–3.5; $p = 0.64$) and RFS (HR 2.53, 95% CI 0.68–9.43; $p = 0.166$).

Figure 4. Impact of Ki67 index and SOAT1 protein expression on (A) overall survival and (B) recurrence-free survival in adult patients with ACC. For recurrence-free survival analysis, only patients with complete resection (status of resection R0) have been analyzed.

2.4. SOAT1 Gene Expression

Similarly, high *SOAT1* gene expression was more frequent in patients with a more advanced disease stage at diagnosis (ENSAT 3 and 4, 62% (13 out of 21) versus ENSAT 1 and 2, 24%, (5 out of 21); $p = 0.006$), and in carcinomas exhibiting a higher Ki67 index (Ki67 > 10%, 76% (16 out of 21) versus Ki67 ≤ 10%, 29% (6 out of 21); $p = 0.005$). *SOAT1* gene expression did not correlate with either survival or recurrence, probably because the tumor cohort available for gene expression analysis was smaller than that for immunohistochemistry; nevertheless, the occurrence of post-translational events being responsible or contributing to this finding cannot be excluded.

3. Discussion

During tumorigenesis, cancer cells acquire various metabolic alterations to overcome the metabolic challenges of rapid proliferation and survival under inhospitable conditions [13]. Recent evidence has revealed that the reprogramming of lipid metabolism, including changes in de novo lipogenesis, FA oxidation, and lipid mobilization and recycling, is essential for various aspects of tumorigenesis [14]. The impact of *SOAT1* overexpression on cancer prognosis has already been demonstrated in several malignancies, suggesting a pivotal role of lipid metabolism and lipid droplet formation in tumor progression and aggressiveness [15].

SOAT1 expression in the adrenal cortex is very high, as cholesterol pools in LDs protect cells against the toxic effects caused by free cholesterol but at the same time, can be rapidly released by the action of sensitive hormone lipase after stimulation of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) stimulation for steroidogenesis [5]. In ACC, the overexpression of *SOAT1* would result in an even better ability to convert excess free cholesterol into the overexpression esters that are stored in LDs, thus protecting cancer cells from cholesterol accumulation and ER stress initiation and enhancing cell viability and steroidogenesis capacity through less feedback inhibition on pathways involved in steroid synthesis and tumor growth.

In 2015, Sbiera et al. demonstrated that *SOAT1* protein expression in ACCs was more variable and heterogeneous than that in normal adrenal glands and adrenocortical adenomas [7]. However, the correlation of *SOAT1* protein expression with ACC features and with clinical outcomes was not investigated in detail in that study.

To the best of the authors' knowledge, this is the first study to explore the correlation between *SOAT1* expression and clinical, biochemical, and histopathological features of ACC and, mainly, with the clinical outcomes of recurrence, progression, and survival. Our findings are pioneering in

demonstrating that SOAT1 expression was higher in ACCs harboring features of high aggressiveness and that strong SOAT1 protein expression correlated independently with reduced RFS and OS.

The importance of the Ki67 proliferation index in the prognosis of patients with ACC is well established and unquestionable [16]. In this study, we were able to demonstrate that SOAT1 protein expression is a Ki67-independent prognostic factor and therefore may be useful in refining the risk for recurrence and death. This association is confirmed by our finding of shorter OS and RFS in patients with both Ki67 > 10% and strong expression of SOAT1. In our cohort, 18% of the patients with ACCs presenting a Ki67 index $\leq 10\%$ still developed recurrence after complete resection of the primary tumor. In 2015, Beuschlein et al. also demonstrated that a portion of ACC patients who presented tumors with a Ki67 index < 10% evolved to have recurrence and death [16]. An analysis of the impact of SOAT1 protein expression among tumors exhibiting a Ki67 index $\leq 10\%$ was also performed in this study; however, SOAT1 protein expression did not significantly impact OS and RFS in this subgroup. This suggests that the development of recurrence and death in these patients were not due to the strong expression of SOAT1.

The strengths of this study were the large cohort size in the context of a rare disease, the long follow-up, and the comprehensive follow-up data available for all patients. In addition, the use of tissue microarray technology, which favored uniformity of the experimental conditions, and the use of immunohistochemistry techniques, which have short execution times and low costs and are widely available, are also strengths of our study. Nonetheless, the present study has a few limitations that should be considered: this is a retrospective study, and the patients included in this study are from a single center. Heterogeneity of SOAT1 expression within a single tumor may be underestimated by using tissue microarray. Finally, response to specific treatments was not evaluated in this study. Despite the large cohort size for immunohistochemistry, the small number of cases available for gene expression analysis did not permit the correlation of *SOAT1* gene overexpression with reduced OS and RFS.

The results found here along with the results found by important previous studies raise some interesting questions to be evaluated by further studies. We did not assess the impact of SOAT1 protein expression on response to mitotane treatment. A multicentric study of patients treated with mitotane monotherapy is required and underway to answer this question. Another interesting question to be evaluated is the comparison between SOAT1 expression and SF-1 expression, considering that *SOAT1* is a target gene of SF-1 transcription factor and SF-1 expression also has prognostic value in ACC [17].

The discovery of SOAT1 protein expression as a new prognostic biomarker of ACC greatly aids professionals treating ACC in clinical practice. Since well-established treatment alternatives are limited both in terms of availability and efficacy, a refined prediction of the patients' risk for recurrence, progression, or death is very important. A marker representing a therapeutic target is even more promising, as it allows for further efforts regarding targeted treatment strategies for this dismal malignancy.

In a previous ACC Symposium (Fifth International Adrenocortical Carcinoma Symposium, Ann Harbor, USA, 2015), data showing the efficacy of ATR-101, an orally available SOAT1 inhibitor, in preclinical models of ACC were presented. A phase I clinical trial for the safety and tolerability of ATR-101 was recently completed, but its results have not yet been published (<https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01898715>). According to our results, we suggest to further validate SOAT1 as a prognostic biomarker and to revisit SOAT1 as a possible therapeutic target in ACC.

4. Materials and Methods

One hundred and twelve tissue samples were collected between 1979 and 2017. The samples comprised 112 ACCs from 112 independent patients who had been followed or are being followed in a unique tertiary center (Faculty of Medicine from University of São Paulo (Table 4)). All patients donating adrenocortical carcinoma tissue gave written informed consent for tissue and clinical data collection, and the study was approved by the ethics committee of the University of São Paulo

(Approval code: 73921517.0.0000.0068; Date: 22 September 2017). Detailed clinical data, including clinical and hormonal presentation, and follow-up and survival data, in addition to histopathological data, were collected for all patients.

Table 4. Clinical and tumor characteristics of 112 adult patients with ACC included in the study.

Characteristic	Adrenocortical Carcinomas <i>n</i> = 112
Age (years) ^(A)	40 (15–83)
Sex (Female:Male)	2.4:1
Clinical syndrome, <i>n</i> (%)	
Cushing syndrome	26 (23)
Virilizing syndrome	10 (9)
Cushing and virilizing syndrome	51 (46)
Non-functioning	20 (18)
Not available	5 (4)
ENSAT, <i>n</i> (%)	
1	10 (9)
2	50 (45)
3	27 (24)
4	25 (22)
Weiss score, <i>n</i> (%)	
3–6	63 (56)
>6	49 (44)
Ki67, <i>n</i> (%)	
Known	102 (91)
≤10%	47 (46)
>10%	55 (54)
Follow-up (months) ^(A)	35 (0.6–381)

A: median (range).

4.1. Tissue Microarray and Immunohistochemical Analysis

Representative areas of the ACCs (viable tumor tissue without necrosis) were identified on hematoxylin- and eosin-stained slides and marked on paraffin donor blocks. The spotted areas of the donor blocks were punched (1.0 mm punch) and mounted into three paraffin blocks using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA), with a total of 3 cores per ACC sample/patient. One slide from each of the three TMA paraffin blocks of the triplicate set was used for staining with anti-SOAT1 rabbit polyclonal antibody (titer 1:4000; ab39327; Abcam; Cambridge, MA, USA). An immunoperoxidase immunohistochemical modified method with humid heat antigen retrieval was used, as previously described [18]. The SOAT1 immunostaining was blindly evaluated by two independent observers (I.C.S. and M.C.N.Z.), and the mode of the two evaluations was taken for statistical analysis. The interobserver agreement coefficient (kappa) for the SOAT1 staining evaluation was 0.779 ($p < 0.0001$). A kappa coefficient > 0.6 is considered substantial agreement.

TMA samples were included in the analysis only if two or more evaluable cores were available after the staining procedure. Cytoplasmic staining was evaluated according to intensity as negative (0), low (0.5), or strong (1). The percentage of positive tumor cells was visually scored as follows: 0 if 0% of tumor cells were positive; 1 if 1%–25%, 2 if 26%–50%, 3 if 51%–75%, and 4 if 76%–100%. A semiquantitative score was then calculated by multiplying the staining intensity by the percentage of positively stained tumor cells, and the final score ranged from 0 to 4. A cut-off of 2 discriminated absent/weak staining from strong staining, a score > 2 defined tumors with high SOAT1 staining, and a score ≤ 2 defined tumors with absent or low SOAT1 staining.

Nuclear staining for Ki67 in our cohort was also evaluated. Another set of three slides was stained with mouse monoclonal anti-human Ki67 antigen (titer 1:40; clone MIB-1; code M7240; Dako, Denmark).

The stained slides were scanned by the Scanner of histological slides through the Pannoramic Viewer 1:15 software (3DHISTECH, Budapest, Hungary). All the images were processed with the Image Pro Plus 4.5 software (MediaCybernetics, Rockville, MD, USA), and the positive and total nuclei were automatically counted.

4.2. Quantitative Real-Time PCR (qRT-PCR)

After surgical resection of the primary tumor, tumor fragments were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until total RNA extraction using the AllPrep DNA/RNA Minikit (Qiagen, Hilden, Germany). RNA samples from 42 tumors from 42 independent patients were treated with DNase using standard procedures. Complementary DNA was generated from 1 μg of total RNA using the commercial Superscript III Reverse Transcriptase kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Quantitative real-time polymerase chain reaction was performed in the AriaMx (Agilent; Santa Clara, CA, USA) using TaqMan gene expression assays according to the manufacturer's instructions (Applied Biosystems; Carlsbad, CA, USA). The PCR cycling conditions were as follows: 10 min at 95°C , 40 cycles of 95°C for 15 s, and 60°C for 1 min. The assay for the target gene was SOAT1 (Hs00922322_m1). β -glucuronidase (β -GUS, Hs 99999908_m1) and cyclophilin A (CYC-A, Hu_4326316E) were used as endogenous genes for normalization.

4.3. Statistical Analysis

Fisher's exact test or chi-square test was applied to assess possible associations between qualitative variables. Comparisons of quantitative variables in relation to two independent groups were performed by the nonparametric Mann–Whitney U test or, when there was evidence of a normal distribution, by the *t*-test for unpaired samples (the Shapiro–Wilk test was applied to assess the normality of the data).

OS was defined as the time between the date of ACC diagnosis and the date of disease-related death or last follow-up visit. RFS was defined as the time between the date of complete tumor resection and the date of the first radiological evidence of local or distant recurrence. PFS was defined as the time between the date of diagnosis and the date of the first radiological evidence of disease progression [according to the response evaluation criteria in solid tumors (RECIST) [19]. Regarding the analysis in which the time to death, recurrence, and progression were of interest, the survival analysis technique was employed. This consisted of determining a cut-off point that best discriminated the survival curves. The cut-off values were estimated by maximizing the standardized log-rank statistic. Once the cut-off was estimated, the survival function was estimated using the Kaplan–Meier estimator, and the estimated survival curves were compared using the log-rank test. In addition, a Cox proportional hazards model was fitted to the data to describe the relationship between independent variables and time to death, recurrence, and progression. Among the variables with *p*-values less than 0.05 in the simple Cox regression model and the variables with substantial clinical importance, variables were selected for multiple Cox regression. This selection was made with a stepwise backward method with an input *p*-value of 0.25 to obtain the final model. In all adjusted models, the proportionality assumption was evaluated by Schoenfeld residuals.

The significance level adopted was 5%; that is, the results with *p*-values less than 0.05 were considered significant. Data analysis was performed using R software, version 3.5, and Statistical Package for Social Sciences (SPSS) software, version 24.

5. Conclusions

In conclusion, SOAT1 overexpression was an independent and significant risk factor for poor prognosis in patients with ACC in our cohort. Strong SOAT1 protein expression correlated with known features of high aggressiveness in ACC, was significantly associated with reduced overall survival and recurrence-free survival, and was an independent predictor of death and recurrence in ACC patients. These findings demonstrated that SOAT1 protein expression is a marker with prognostic value for ACC.

As SOAT1 is a drug-targetable protein, our findings reinforce the importance of investigating SOAT1 as a therapeutic target in ACC. Ultimately, these results provide a powerful tool for identifying patients with ACC with poor prognosis, and who might benefit from further targeted treatment. Validation of the results found in this study in other cohorts and using data from publicly available sources, such as The Cancer Genome Atlas, are necessary to confirm the results found in this cohort and should be the subject of subsequent studies involving this theme.

Author Contributions: A.M.F.L. and M.C.B.V.F. designed the study. A.M.F.L., H.d.S.C., and V.B.B. acquired the clinical data and patient information. A.M.F.L. and I.C.S. performed the pathological review of all cases and selected representative areas of the ACCs for tissue microarray construction. I.C.S. and M.C.N.Z. performed the immunohistochemical scoring. A.M.F.L., B.M.d.P.M., and M.Y.N. performed the RNA extraction, cDNA synthesis, and qRT-PCR studies. A.M.F.L. and M.C.B.V.F. wrote the manuscript. A.M.F.L., I.C.S., J.E.B.-N., F.T., V.S., J.L.C., R.M.C.d.F., B.B.M., A.O.H., M.Q.A., I.W., M.K., M.C.N.Z., and M.C.B.V.F. performed critical revision of the article. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, grant number 2017/26345-5 to M.C.B.V.F. and in part by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, grant number 2018/140242 (CNPq, Brazil).

Acknowledgments: We are grateful to Vinicius Calsavara for his statistical support. In addition, we thank the American Journal Experts for editing the manuscript.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Allolio, B.; Fassnacht, M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: Clinical update. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 2027–2037. [\[CrossRef\]](#)
2. Else, T.; Kim, A.C.; Sabolch, A.; Raymond, V.M.; Kandathil, A.; Caoili, E.M.; Jolly, S.; Miller, B.S.; Giordano, T.J.; Hammer, G.D. Adrenocortical carcinoma. *Endocr. Rev.* **2014**, *35*, 282–326. [\[CrossRef\]](#)
3. Fassnacht, M.; Kroiss, M.; Allolio, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2013**, *98*, 4551–4564. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Duregon, E.; Cappellesso, R.; Maffei, V.; Zaggia, B.; Ventura, L.; Berruti, A.; Terzolo, M.; Fassina, A.; Volante, M.; Papotti, M. Validation of the prognostic role of the “Helsinki Score” in 225 cases of adrenocortical carcinoma. *Hum. Pathol.* **2017**, *62*, 1–7. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. de Souza, B.F.; Hudson-Davies, R.E.; Lin, L.; Parnai, R.; Hubank, M.; Dattani, M.T.; Achermann, J.C. Sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1, ACAT) is a novel target of steroidogenic factor-1 (SF-1, NR5A1, Ad4BP) in the human adrenal. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, 663–668. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Chang, T.-Y.; Chang, C.C.; Ohgami, N.; Yamauchi, Y. Cholesterol Sensing, Trafficking, and Esterification. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **2006**, *22*, 129–157. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Sbiera, S.; Leich, E.; Liebisch, G.; Sbiera, I.; Schirbel, A.; Wiemer, L.; Matysik, S.; Eckhardt, C.; Gardill, F.; Gehl, A.; et al. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology* **2015**, *156*, 3895–3908. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Geng, F.; Cheng, X.; Wu, X.; Yoo, J.Y.; Cheng, C.; Guo, J.Y.; Mo, X.; Ru, P.; Hurwitz, B.; Kim, S.-H.; et al. Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1-Mediated Lipogenesis. *Clin. Cancer Res.* **2016**, *22*, 5337–5348. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Jiang, Y.; Sun, A.; Zhao, Y.; Ying, W.; Sun, H.; Yang, X.; Xing, B.; Sun, W.; Ren, L.; Hu, B.; et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature* **2019**, *567*, 257–261. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Uhlen, M.; Zhang, C.; Lee, S.; Sjöstedt, E.; Fagerberg, L.; Bidkhori, G.; Benfantes, R.; Arif, M.; Liu, Z.; Edfors, F.; et al. A pathology atlas of the human cancer transcriptome. *Science* **2017**, *357*, eaan2507. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Yue, S.; Li, J.; Lee, S.Y.; Shao, T.; Song, B.; Cheng, L.; Masterson, T.A.; Liu, X.; Ratliff, T.L.; Cheng, J.X. Cholesterol ester accumulation induced by PTEN loss and PI3K/AKT activation underlies human prostate cancer aggressiveness. *Cell Metab.* **2014**, *19*, 393–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

12. Li, J.; Gu, D.; Lee, S.S.-Y.; Song, B.; Bandyopadhyay, S.; Chen, S.; Konieczny, S.F.; Ratliff, T.L.; Liu, X.; Xie, J.; et al. Abrogating cholesterol esterification suppresses growth and metastasis of pancreatic cancer. *Oncogene* **2016**, *35*, 6378–6388. [[CrossRef](#)]
13. Petan, T.; Jarc, E.; Jusović, M. Lipid Droplets in Cancer: Guardians of Fat in a Stressful World. *Molecules* **2018**, *23*, 1941. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Maan, M.; Peters, J.M.; Dutta, M.; Patterson, A.D. Lipid metabolism and lipophagy in cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *504*, 582–589. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Tirinato, L.; Pagliari, F.; Limongi, T.; Marini, M.; Falqui, A.; Seco, J.; Candeloro, P.; Liberale, C.; Di Fabrizio, E. An Overview of Lipid Droplets in Cancer and Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2017**, *2017*, 1656053. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Beuschlein, F.; Weigel, J.; Saeger, W.; Kroiss, M.; Wild, V.; Daffara, F.; Libé, R.; Ardito, A.; Al Ghuzlan, A.; Quinkler, M.; et al. Major Prognostic Role of Ki67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 841–849. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Sbiera, S.; Schull, S.; Assie, G.; Voelker, H.U.; Kraus, L.; Beyer, M.; Ragazzon, B.; Beuschlein, F.; Willenberg, H.S.; Hahner, S.; et al. High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogeni Factor-1 Expression in Adrenal Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, E161–E171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Shi, S.R.; Key, M.E.; Kalra, K.L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* **1991**, *39*, 741–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Eisenhauer, E.; Therasse, P.; Bogaerts, J.; Schwartz, L.; Sargent, D.; Ford, R.; Dancey, J.; Arbuck, S.; Gwyther, S.; Mooney, M.; et al. New response evaluation criteria in solid tumours: Revised RECIST guideline (version 1.1). *Eur. J. Cancer* **2009**, *45*, 228–247. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

ACCEPTED MANUSCRIPT

Expression of SOAT1 in adrenocortical carcinoma and response to mitotane monotherapy: an ENSAT multicenter study

Isabel Weigand, Barbara Altieri, Amanda M F Lacombe, Vittoria Basile, Stefan Kircher, Laura-Sophie Landwehr, Jochen Schreiner, Maria C N Zerbini, Cristina L Ronchi, Felix Megerle ... [Show more](#)

The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, dgaa293,
<https://doi.org/10.1210/clinem/dgaa293>

Published: 25 May 2020 **Article history ▾**

Received: 25 March 2020

Published: 25 May 2020

“ Cite Permissions Share ▾

Abstract

ENDOOnline2020
HAS STARTED!

Expression of SOAT1 in adrenocortical carcinoma and response to mitotane monotherapy: an ENSAT multicenter study

Isabel Weigand¹, Barbara Altieri¹, Amanda M. F. Lacombe², Vittoria Basile³, Stefan Kircher⁴, Laura-Sophie Landwehr¹, Jochen Schreiner¹, Maria C. N. Zerbini², Cristina L. Ronchi^{1,5,6}, Felix Megerle¹, Alfredo Berruti⁷, Letizia Canu⁸, Marco Volante⁹, Isabel Paiva¹⁰, Silvia Della Casa¹¹, Silviu Sbiera¹, Martin Fassnacht^{1,12}, Maria Candida B. V. Fragoso², Massimo Terzolo³, Matthias Kroiss^{1,12}

¹Department of Internal Medicine I, Division of Endocrinology and Diabetes, University Hospital, University of Würzburg, 97080 Würzburg, Germany

² Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM42, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Hospital de Clínicas; Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Brazil, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 05403-900, Brazil

³Department of Clinical and Biological Sciences, University of Turin at San Luigi Hospital, 10043 Orbassano, Italy

⁴Institute of Pathology, University of Würzburg, 97080 Würzburg, Germany

⁵Institute of Metabolism and System Research, University of Birmingham, Birmingham B15 2TT, UK

⁶Centre for Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Birmingham Health Partners Birmingham B15 2TT, UK

⁷Medical Oncology Unit, Department of Medical and Surgical Specialties, Radiological Sciences and Public Health, University of Brescia at ASST Spedali Civili, 25123 Brescia, Italy

⁸Endocrinology Unit, Department of Experimental and Clinical Biomedical Sciences, University of Florence, 50139 Florence, Italy

⁹Department of Oncology, University of Turin, 10043 Orbassano, Turin, Italy

¹⁰ Department of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Centro Hospitalar e Universitário of Coimbra, 3000-075 Coimbra, Portugal

¹¹ Division of Endocrinology and Metabolism, Fondazione Policlinico Gemelli, Catholic University, 00168 Rome, Italy

¹²Comprehensive Cancer Center Mainfranken, University of Würzburg, 97080 Würzburg, Germany

Correspondence and request for reprints to:

Matthias Kroiss, MD, PhD

Division of Endocrinology and Diabetology,

University Hospital of Würzburg,

Oberdürrbacher Str. 6

97080 Würzburg (Germany)

Telephone: +49-931-201-39740

Email: Kroiss_m@ukw.de

Disclosure:

The authors have nothing to disclose.

Financial support:

This work has been supported by grants from the DFG German Research Foundation (grant KR-4371/1-2 to M.K, FA-466/4-2 to M.F. and RO-5435/3-3 to C.L.R.), project 314061271- TRR 205 (M.F. & M.K.), from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP grant 2017/26345-5 to M.C.B.V.F.), Else Kröner-Fresenius-Stiftung (Grant 2016_A96 to S.S. and M.K) and from Deutsche Krebshilfe (grant 70112969 to C.L.R. & M. F.).

Precis

Mitotane is a cornerstone of adrenal cancer treatment. In this international study, expression of putative mitotane target SOAT1 in tissue did not predict treatment response to mitotane monotherapy.

Abstract

Context Objective response rate to mitotane in advanced adrenocortical carcinoma (ACC) is approximately 20% and adverse drug effects are frequent. To date there is no marker established that predicts treatment response. Mitotane has been shown to inhibit sterol-O-acyl transferase 1 (SOAT1) which leads to endoplasmic reticulum stress and cell death in ACC cells.

Objective To investigate SOAT1 protein expression as a marker of treatment response to mitotane.

Patients 231 ACC patients treated with single agent mitotane as adjuvant (n=158) or advanced disease therapy (n=73) from twelve ENSAT centers were included. SOAT1 protein expression was determined by immunohistochemistry on formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens.

Setting Retrospective study at 12 ACC referral centers

Main outcome measure: recurrence-free survival (RFS), progression-free survival (PFS), disease-specific survival (DSS)

Results 61/135 patients (45%) with adjuvant mitotane treatment had recurrences and 45/68 patients (66%) with mitotane treatment for advanced disease had progressive disease. After multivariate adjustment for sex, age, hormone secretion, tumour stage and Ki67 index, RFS (HR=1.07, 95% CI 0.61-1.85, p=0.82) and DSS (HR=1.30, 95% CI 0.58-2.93, p=0.53) in adjuvantly treated ACC patients did not differ significantly between tumors with high and low SOAT1 expression. Similarly, in the advanced stage setting, PFS (HR=1.34, 95% CI 0.63-2.84, p=0.45) and DSS (HR=0.72, 95% CI 0.31-1.70, p=0.45) were comparable and response rates not significantly different.

Conclusions SOAT1 expression was not correlated with clinical endpoints RFS, PFS and DSS in ACC patients with mitotane monotherapy. Other factors appear to be relevant for mitotane treatment response and ACC patient survival.

Key words: adrenal cancer, chemotherapy, treatment, prognosis

Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy with a generally poor prognosis (1) and limited effective treatment options (1,2). Mitotane is the only approved drug for metastatic disease (3) but efficacy is very limited and the observed objective response rate is only approximately 20% (4-6). Controversy exists regarding adjuvant use which is supported by a large retrospective study (6,7) and advocated by current guidelines (2) in patients at moderate or high risk of recurrence after complete resection. Adverse drug effects like adrenal insufficiency, diarrhea, nausea and other gastrointestinal symptoms but also central nervous symptoms such as dizziness and speech disturbance may be severe and disabling (8-10) and must be balanced against potential treatment benefits. Mitotane efficacy is correlated with plasma concentrations above 14 mg/l (11). Therapeutic drug monitoring (TDM) is therefore recommended (2). Some patients for unknown reasons fail to achieve mitotane plasma concentrations within the therapeutic window which is associated with decreased efficacy (5,12). To date, few markers have been suggested for the prediction of response (13,14), but they have not been validated in a large series. Establishment of such a marker would be a major advancement in ACC treatment and enable tailored treatment of potential responders and avoidance of unnecessary mitotane exposure in non-responders.

We have provided evidence that mitotane inhibits sterol-O-acyl transferase 1 (SOAT1) also known as ACAT1 (15) (not to be mistaken with acetyl-CoA acetyltransferase known under the same name), an enzyme catalyzing the esterification of cholesterol in the adrenal cortex (16). This leads to the accumulation of toxic lipids and endoplasmic reticulum (ER) stress which results in apoptosis of adrenocortical cells (15). Accordingly, a SOAT1 inhibitor has been tested in a phase I clinical trial as a treatment for advanced ACC (17).

SOAT1 is strongly expressed in adrenocortical cell lines, normal adrenal glands and different adrenocortical tumor entities, with the highest variation among ACC, while it is only weakly to moderately expressed in non-adrenal tissues (15). Despite strong evidence of an inhibitory effect on SOAT1, other mechanisms such as impaired mitochondrial respiration and function (18-20) may contribute to the relatively tissue-specific toxicity of mitotane.

In a small cohort of patients with advanced ACC, it has been shown that SOAT1 expression was correlated with the response to mitotane treatment (15).

Here, we aimed to validate in a large multicenter study whether SOAT1 expression is a predictive marker for mitotane efficacy by investigating the association of SOAT1 tissue expression with recurrence free survival (RFS) in patients with adjuvant mitotane treatment, progression-free survival (PFS) after mitotane monotherapy administered to patients with advanced disease and disease-specific survival (DSS) for both cases.

Patients and Methods

Setting and data acquisition

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tumor specimens of 231 ACC were included from 12 centers belonging to the European Network for the Study of Adrenocortical Tumors (ENSAT; www.ensat.org). Only adult patients with histologically confirmed ACC were included (21). Patients that have been included in our previous analyses of SOAT1 expression (15) have been excluded from this analysis. All patients started mitotane treatment as first medical therapy no later than 3 months after complete resection in the adjuvant setting (n=158) or diagnosis of irresectable or recurrent or metastatic ACC in the advanced stage setting (n=73). Enrollment of patients is presented in a CONSORT diagram (Fig. S1) (22). Mitotane plasma levels were determined according to local standard of care (2). This retrospective study was conducted as part of the ENSAT registry, has been approved by the ethics committee at each participating institution and was conducted in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. All patients gave informed written consent.

Clinical and pathological data, including sex, age at diagnosis, date of diagnosis, tumor stage according to the ENSAT staging system (23), hormone secretion, Weiss score (21), Ki67 proliferation index, mitotane plasma concentrations after three and six months and response to treatment during follow-up were either provided by the participant center or collected through the ENSAT registry (<https://registry.ensat.org/>). Hormone excess was defined as any form of autonomous hormone secretion (glucocorticoids, androgens, aldosterone or mixed hormone secretion). Recurrence and progression were pre-defined to be based on routine local clinical judgement based on cross sectional imaging and death as ACC-related death.

Chromogenic immunohistochemistry

Full FFPE sections mounted on slides were deparaffinised, rehydrated and antigen retrieval was performed in 10mM citric acid monohydrate buffer (pH 6.5) under pressure for 13 min. Blocking of unspecific binding sites occurred with 20% human AB serum at room temperature (RT) for 1 h and the primary antibody (SOAT1; ab39327 Abcam) was incubated in a 1:1000 dilution for 1h at RT as previously described (15). The N-Universal negative control anti-rabbit (Dako) was used and signal amplification was achieved by the Advance HRP Link Kit for 40 min and developed for 10 min with the DAB+ Liquid Kit (Dako). Nuclei were counterstained using Mayer's hematoxylin for 3 min and blued for 5 min in running tap water. To ensure specificity of the antibody used (24), we overexpressed human SOAT1 in ACC cells which resulted in an increase of both detected SOAT1 bands and SOAT1 WB of 5 normal adrenal glands also resulted only in the two specific bands (Fig. S2) (22).

Semi-quantitative analysis of SOAT1 immunoreactivity

Chromogenic staining intensities were determined by two independent investigators blinded to clinical outcome (I.W. and B.A. or L.-S.L.) and graded as 0 (negative), 1 (low), 2 (medium) and 3 (high). The proportion of positive tumor cells was calculated for each slide and scored 0 if 0% were positive, 0.1 if 1-9% were positive, 0.5 if 10-49% were positive and 1 if $\geq 50\%$ were positive (25,26). A semi quantitative H-Score was then calculated by multiplying the staining intensity grading score with the proportion score. Where discrepancies were observed, results were jointly assessed by

both investigators and the final score was formed by consensus. The Spearman's correlation for inter-observer agreement for each staining was high ($r>0.85$).

Statistical analysis

RFS and PFS were considered as the time between diagnosis and documented recurrence and progression (based on cross sectional imaging), respectively. DSS was calculated from the time of diagnosis until disease-related death or censored at last follow-up. RFS, PFS and DSS were analysed using the Kaplan–Meier method and groups were compared by using the log-rank test. Assessment of prognostic factors (ENSAT stage, Ki67, age, sex, hormone secretion and for the group with advanced disease additionally: preM-TTP (pre mitotane time to progression= time between diagnosis and progress before initiation of mitotane treatment) was performed with the Cox proportional hazard regression model. The Chi-square test was used to investigate dichotomic variables, whereas non-parametric Kruskal-Wallis test was used for comparison among groups for non-normal distributed variables. Correlations between H-Score and prognostic factors were evaluated by Spearman's correlation. P values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analyses were performed with IBM SPSS Version 23 and GraphPad Prism Version 6.

Results

Patient characteristics

Clinical characteristics of 231 ACC patients are summarised in Table 1. Median age at diagnosis was 54.2 years (range 17-83) in the adjuvant group and 51 years (range 16-80) in the group with advanced disease. In both groups, approximately 60% of the patients were female and 40% were male. At diagnosis, the majority of patients treated with mitotane monotherapy in the adjuvant setting had an ENSAT tumor stage of I-II (62.3%), whereas, in the advanced stage setting, most of the patients had a tumor stage of IV (55.6%). The remaining patients with advanced disease had a localized tumor at diagnosis and started mitotane therapy only after developing local recurrence or metastases. Data regarding Ki67 index were available in 91.2% and 83.5% of patients in the adjuvant and advanced stage setting, respectively. 31 patients (21%) of the adjuvant group and 18 patients (27.3%) of the advanced stage group had Ki67 index staining below 10% ($p=0.35$, chi-square=0.88). Median Weiss score was 6 (range 1-9) in both groups. In both arms, about 70% of the tumors were hormonally active. Median time to start mitotane were one month in the adjuvant group and less than one month in the group with advanced disease. Median mitotane plasma levels at three months of therapy were 9.3 mg/l and 10 mg/l, after six months 13.5 mg/l and 12.8 mg/l in the adjuvant and advanced stage cohort, respectively. In the advanced stage group, preM-TTP was <365 days in 51/63 patients (81%) for DSS and <365 days in 52/67 patients (78%) for PFS.

No recurrence was observed in 74/135 patients within a median follow-up of 18.5 months (range 1-216 months) in patients treated in adjuvant setting. Best response to advanced stage mitotane was complete ($n=1$) or partial response ($n=9$), stable disease in 13 and progressive disease in 45 patients. Median follow up of patients still alive ($n=18$) was 19.5 months (range 2-180 months) in this setting.

SOAT1 expression and correlation with known prognostic factors of ACC

Tissue SOAT1 expression differed widely in tumors of both the adjuvant and the group with advanced disease and exhibited different intra-tumoral patterns between homogeneous and heterogeneous staining intensity (Fig. 1). Semiquantitative H-score accounts for this heterogeneity as it takes into account both the staining intensity and percentage of cells being stained and ranged from 0 to 3. Scores from 0 to <2 were designated low expression (Fig. 1J-L) while scores ≥ 2 were indicative of high expression (Fig. 1A-I). No difference in SOAT1 expression was found between hormone producing and endocrine inactive ACC with mean staining intensities of 1.53 ± 0.9 in inactive vs. 1.48 ± 0.9 in hormonally active ACC, $p=0.76$. No correlation of SOAT1 H-score was observed with Ki67, ENSAT stage, Weiss score and age at diagnosis neither in the adjuvant, nor in the advanced stage setting.

SOAT1 expression as factor of survival and response to mitotane treatment in ACC

In the adjuvant setting (Fig. 2A), we did not observe significant differences of RFS between ACC patients with low SOAT1 expression in comparison to those with high SOAT1 expression (median 22 months, range 1-153 vs. median 12 months, range 1.5-216 log rank $p=0.12$). When we only included patients with $Ki67 \geq 10\%$ to analyse RFS, we did not observe significant differences between SOAT1 low and high expressing ACC either (log rank $p=0.73$). DSS (Fig. 2B) did not significantly differ between patients whose tumors expressed low levels of SOAT1 compared to those with high SOAT1 expression (median 51 months, range 1-252 vs. 31 months, range 2-216 log rank $p=0.23$). Similarly, in the group with advanced disease, no significant difference in PFS (Fig. 2C) between patients with low SOAT1 expression and those with high SOAT1 expression (median PFS 5 months, range 1-59 vs. median 4 months, range 1-25 log rank $p=0.66$) was observed. Median DSS (Fig. 2D) was likewise not different in tumors with low vs. high SOAT1 (median 22 months, range 4-180 vs. 21 months, range 2-83 months, log rank $p=0.47$). To increase numbers, we additionally analysed all patients together (Fig. S3A). Low SOAT1 expression was associated with a significantly longer median recurrence-/progression-free survival of 13 months (range 1-153 months vs 8 months (range 1-216 months, log rank $p=0.049$). We did not observe a significant difference in DSS (Fig. S3B) between tumors with low SOAT1 vs high SOAT1 expression (median: 41 months, range 1-252 vs. median: 28 months, range 2-216, log rank $p=0.41$) (22).

The proportion of tumors with low and high SOAT1 expression did not differ between patients in the adjuvant cohort without recurrence (low, $n=44$; high, $n=30$) and with recurrence (low, $n=35$; high, $n=26$) (Fig. 3A). Similarly, in the cohort with advanced disease, there were no differences between tumors with low and high SOAT1 regarding objective response to mitotane (low, $n=6$; high, $n=4$) vs. stable disease (low, $n=6$; high, $n=7$) and progressive disease (low, $n=25$; high, $n=20$), respectively (Fig. 3B).

We next aimed at multivariable adjustment for known clinical/histopathological ACC prognostic factors. In the adjuvant arm, univariate analysis revealed only a Ki67-Index $<10\%$ as significantly associated with improved DSS and RFS (Table 2). In patients with advanced disease the following factors were significantly associated with improved DSS: male sex, Ki67-Index $<10\%$ and preM-TTP >365 days. After multivariate analysis of all factors, including SOAT1 expression, only preM-TTP >365 days retained statistical significance (Table 3).

SOAT1 expression is not related to mitotane plasma concentrations

We next examined the potential association of SOAT1 expression with mitotane plasma concentrations. Mitotane plasma levels after three months of treatment did not significantly differ between patients whose tumors showed high vs low expression of SOAT1 both in the adjuvant (median mitotane levels: 10.3 mg/l vs 9.1 mg/l) and in the advanced disease setting (median mitotane levels: 11.7 mg/l vs 9.1 mg/l) (Fig. 4A). SOAT1 expression was not associated with mitotane plasma concentrations above 14 mg/l neither in the adjuvant (Fig. 4B) nor in the advanced disease arm (Fig. 4C). Similar results were observed after six months of mitotane treatment (median mitotane levels 14.2 mg/l vs 13 mg/l in the adjuvant group and 11.9 mg/l vs 12.8 mg/l in the group with advanced disease). When analyzing only patients reaching the mitotane target level of 14 mg/l after three months, significantly fewer patients with high SOAT1 expression responded to therapy (Fig. 4D) while this difference was no longer observed when considering the six months time point (Fig. 4E).

Median dose of mitotane intake was 4 g/daily (range 1-12 g) in the adjuvant arm and 5 g/daily (range 2-12 g/daily) in patients treated for advanced disease and did not significantly differ between the SOAT1 high and low expressing group ($p=0.6$ (adjuvant) and $p=0.4$ (advanced disease)).

Discussion

Mitotane is the only approved drug for the treatment of ACC, however, objective response rates are only approximately 20% (5,6). In addition to its limited therapeutic potential, adverse events occur frequently and reliable markers predicting response to therapy are currently not established. Therefore, it is crucial to define a particular subgroup of patients that will take advantage from treatment and to avoid toxicity in patients unlikely to respond.

At present, this topic has been addressed only in a limited number of patients (13,14) and very recently a study demonstrated mitotane sensitivity only in a very specific sub-group of patients (27). Although mitotane has been used in the clinic for decades, its precise mechanism of action and molecular target remained unknown for decades, despite intense research including several different “omics” approaches (18-20,28). We have demonstrated that mitotane inhibits SOAT1, leading to ER-stress and cell death of adrenocortical cells (15). It was also shown that SOAT1 is predominantly expressed in adrenocortical cells, compared to cells of non-adrenal origin (15), possibly explaining the specific adrenolytic toxicity of mitotane. In addition, in glioblastoma, inhibition of SOAT1 has been proposed as a novel treatment (29,30).

In hepatocellular carcinoma high SOAT1 expression was associated with a worse prognosis (31) and has previously been described in prostate cancer as well (32). An adverse outcome of SOAT1 expression in ACC was recently demonstrated (33). These results suggest that the elevated expression of SOAT1 could be a prognostic feature of diverse cancers. In a small single center series of patients ($n=25$) with advanced ACC (15), we had previously shown that SOAT1 expression is associated with improved progression-free survival. This ENSAT multicenter retrospective study aimed at validating the value of SOAT1 as a histologic marker for mitotane response. Our results disprove our initial hypothesis, as no significant differences in response to mitotane treatment could be observed between ACC tissue samples with high and low levels of SOAT1 protein neither in an adjuvant setting nor in patients treated with advanced disease.

Our study has the strength of a large collection of tissue samples from specialized ACC centers. SOAT1 expression was histologically determined in a centralized manner. All patients received mitotane monotherapy, no additional therapies were used during mitotane treatment. However, our study has several limitations. First, the clinical data and samples collection were retrospectively retrieved from twelve different and specialized ENSAT centers (11 European and one from Brazil) which likely is associated with different treatment strategies. This not only comprises surgery and medical treatment but also documentation and follow-up. Second, mitotane treatment itself is cumbersome and different dosing regimens are in use at different centers (34-36). In addition, patient-specific factors that are only partially understood lead to a high heterogeneity of mitotane plasma concentrations (37-39). Accordingly, mitotane plasma concentrations in our cohort after three and six months of treatment were highly variable. When considering only patients who reached mitotane plasma concentrations of >14 mg/L after three or six months, SOAT1 expression was not correlated to clinical response. Furthermore, established RNA or DNA markers predict prognosis in ACC but were not investigated in this work. Just to mention several miRNAs (40,41), and also the methylation status of several genes (42,43) were shown to be associated with prognosis in ACC.

The lack of an association of SOAT1 expression with survival endpoints and response implicates that additional target molecules different from SOAT1 may be relevant for its toxic effect in adrenal cortical cells. *In vitro*, SOAT1 expression was shown to not be a predictor as demonstrated in few ACC primary cultures (24) which would support the theory that additional targets might be of greater importance. One such potential mechanism includes inhibition of mitochondrial respiratory chain. The novel compound nevanimibe (previously known as ATR101) which has been developed as a new treatment for ACC has been shown to be a potent SOAT1 inhibitor by one group (44) but was also shown to inhibit mitochondrial respiration by a different group (45) similar to mitotane.

Importantly, we found pronounced heterogeneity of SOAT1 expression in approximately 20 % of tumor samples. It is conceivable that this tissue heterogeneity was not completely accounted for in the monocentric study by Ferreira Lacombe *et al.* (33) in which a tissue microarrays were used to evaluate SOAT1 expression whereas we used full sections. Relationship of SOAT1 with Ki67 index and cortisol secretion was demonstrated in the previous study but not in ours. However, in our study Ki67 value was provided by the various participating centers and thus a uniform analysis of this index is not guaranteed.

In an adjuvant setting, several other known factors such as resection status or Ki67 index (46), are important to predict tumor recurrence, since even after complete resection, recurrence rates are high (47-49). In line with previous studies, Ki67-index below 10% (Table 2) was significantly associated with a better DSS and RFS in our cohort of patients treated with mitotane in this setting. Our study could further not clearly demonstrate ENSAT stage to have prognostic value in this setting, where we observed only a trend toward a better RFS for patients with ENSAT stage I-II compared to those with stage III-IV as already showed in a previous study (27). This might be due to most patients were classified as either ENSAT tumor stage II or III and different centers might have looked for lymph nodes more or less thoroughly, which could result in a misclassification. Similarly, in advanced ACC, Ki67 index, resection status, mutational burden but also clinical factors like age or presence of symptoms, as well as preM-TTP have been identified to predict patient outcome independently of mitotane treatment (27,50-53). In our cohort of patients with advanced disease, Ki67-Index below

10% was also associated with a better DSS (Table 3), which retained significance after multivariate adjustment, but was not observed for PFS in a univariate analysis (Table 3). This may be due to the relatively small cohort but is in line with a previous study in which only the DSS, but not the PFS correlated with a Ki67-Index below 10% in advanced ACC (5) In conclusion, in this multicenter study, we could not confirm SOAT1 expression to be a clinically useful marker to predict treatment response to mitotane.

Contributors:

The following scientists contributed tissue samples and clinical data in addition to those listed as co-authors:

Marcus Quinkler (Berlin), Masanori Murakami (Munich), Felix Beuschlein (Munich, Zurich), Harm R. Haak (Eindhoven), Marcin Motyka (Krakow), Vasileois Chortis (Birmingham) and Annamaria Colao (Naples).

Acknowledgment

We are grateful to Michaela Haaf and Martina Zink for sample and data administration and Kerstin Lenz for expert technical assistance.

References

1. Fassnacht M, Kroiss M, Allolio B. Update in adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4551-4564.
2. Fassnacht M, Dekkers O, Else T, Baudin E, Berruti A, de Krijger RR, Haak HR, Mihai R, Assie G, Terzolo M. European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the Management of Adrenocortical Carcinoma in Adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol*. 2018.
3. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):667-680.
4. Reidy-Lagunes DL, Lung B, Untch BR, Raj N, Hrabovsky A, Kelly C, Gerst S, Katz S, Kampel L, Chou J, Gopalan A, Saltz LB. Complete Responses to Mitotane in Metastatic Adrenocortical Carcinoma-A New Look at an Old Drug. *Oncologist*. 2017;22(9):1102-1106.
5. Megerle F, Herrmann W, Schloetelburg W, Ronchi CL, Pulzer A, Quinkler M, Beuschlein F, Hahner S, Kroiss M, Fassnacht M, German ACCSG. Mitotane Monotherapy in Patients With Advanced Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(4):1686-1695.
6. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci L, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med*. 2007;356(23):2372-2380.
7. Berruti A, Grisanti S, Pulzer A, Claps M, Daffara F, Loli P, Mannelli M, Boscaro M, Arvat E, Tiberio G, Hahner S, Zaggia B, Porpiglia F, Volante M, Fassnacht M, Terzolo M. Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients With Radically Resected Adrenocortical Carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(4):1358-1365.
8. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2009;23(2):273-289.
9. Else T, Kim AC, Sabolch A, Raymond VM, Kandathil A, Caoili EM, Jolly S, Miller BS, Giordano TJ, Hammer GD. Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev*. 2014;35(2):282-326.
10. Daffara F, De Francia S, Reimondo G, Zaggia B, Arosio E, Porpiglia F, Volante M, Termine A, Di Carlo F, Dogliotti L, Angeli A, Berruti A, Terzolo M. Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly. *Endocr Relat Cancer*. 2008;15(4):1043-1053.
11. Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Leboulleux S, Daffara F, Berruti A, Chadarevian R, Schlumberger M, Allolio B, Haak HR, Baudin E. Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2011;96(6):1844-1851.
12. Terzolo M, Baudin AE, Ardito A, Kroiss M, Leboulleux S, Daffara F, Perotti P, Feelders RA, deVries JH, Zaggia B, De Francia S, Volante M, Haak HR, Allolio B, Al Ghuzlan A, Fassnacht M, Berruti A. Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(3):263-270.
13. Ronchi CL, Sbiera S, Volante M, Steinhauer S, Scott-Wild V, Altieri B, Kroiss M, Bala M, Papotti M, Deutschbein T, Terzolo M, Fassnacht M, Allolio B. CYP2W1 is highly expressed in adrenal glands and is positively associated with the response to mitotane in adrenocortical carcinoma. *PLoS One*. 2014;9(8):e105855.
14. Volante M, Terzolo M, Fassnacht M, Rapa I, Germano A, Sbiera S, Daffara F, Sperone P, Scagliotti G, Allolio B, Papotti M, Berruti A. Ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) gene expression may predict efficacy of adjuvant mitotane in adrenocortical cancer. *Clin Cancer Res*. 2012;18(12):3452-3461.

15. Sbiera S, Leich E, Liebisch G, Sbiera I, Schirbel A, Wiemer L, Matysik S, Eckhardt C, Gardill F, Gehl A, Kendl S, Weigand I, Bala M, Ronchi CL, Deutschbein T, Schmitz G, Rosenwald A, Allolio B, Fassnacht M, Kroiss M. Mitotane Inhibits Sterol-O-Acyl Transferase 1 Triggering Lipid-Mediated Endoplasmic Reticulum Stress and Apoptosis in Adrenocortical Carcinoma Cells. *Endocrinology*. 2015;156(11):3895-3908.
16. Lee HT, Roark WH, Picard JA, Sliskovic DR, Roth BD, Stanfield RL, Hamelehle KL, Bousley RF, Krause BR. Inhibitors of acyl-CoA:cholesterol O-acyltransferase (ACAT) as hypocholesterolemic agents: synthesis and structure-activity relationships of novel series of sulfonamides, acylphosphonamides and acylphosphoramidates. *Bioorg Med Chem Lett*. 1998;8(3):289-294.
17. Smith DC, Kroiss M, Kebebew E, Habra MA, Chugh R, Schneider BJ, Fassnacht M, Jafarinasabian P, Ijzerman MM, Lin VH, Mohideen P, Naing A. A phase 1 study of nevanimibe HCl, a novel adrenal-specific sterol O-acyltransferase 1 (SOAT1) inhibitor, in adrenocortical carcinoma. *Invest New Drugs*. 2020.
18. Hescot S, Slama A, Lombes A, Paci A, Remy H, Leboulleux S, Chadarevian R, Trabado S, Amazit L, Young J, Baudin E, Lombes M. Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells. *Endocr Relat Cancer*. 2013;20(3):371-381.
19. Poli G, Guasti D, Rapizzi E, Fucci R, Canu L, Bandinelli A, Cini N, Bani D, Mannelli M, Luconi M. Morphofunctional effects of mitotane on mitochondria in human adrenocortical cancer cells. *Endocr-Relat Cancer*. 2013;20(4):537-550.
20. Hescot S, Amazit L, Lhomme M, Travers S, DuBow A, Battini S, Boulate G, Namer IJ, Lombes A, Kontush A, Imperiale A, Baudin E, Lombes M. Identifying mitotane-induced mitochondria-associated membranes dysfunctions: metabolomic and lipidomic approaches. *Oncotarget*. 2017;8(66):109924-109940.
21. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1989;13(3):202-206.
22. Weigand I AB, Lacombe AMF, Basile V, Kircher S, Landwehr LS, Schreiner J, Zerbini MCN et al. Supplementary Information- Expression of SOAT1 in adrenocortical carcinoma and response to mitotane monotherapy: an ENSAT multicenter study 2020. DOI 10.17605/OSF.IO/BEVW2
23. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucszy P, Willenberg HS, Beuschlein F, Terzolo M, Mueller HH, Hahner S, Allolio B, German Adrenocortical Carcinoma Registry G, European Network for the Study of Adrenal T. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer*. 2009;115(2):243-250.
24. van Koetsveld PM, Creemers SG, Dogan F, Franssen GJH, de Herder WW, Feelders RA, Hofland LJ. The Efficacy of Mitotane in Human Primary Adrenocortical Carcinoma Cultures. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019.
25. Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, Andre F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper HH, Stahel R, Sabatier L, Pignon JP, Tursz T, Le Chevalier T, Soria JC, Investigators IB. DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med*. 2006;355(10):983-991.
26. Weigand I, Ronchi CL, Rizk-Rabin M, Dalmazi GD, Wild V, Bathon K, Rubin B, Calebiro D, Beuschlein F, Bertherat J, Fassnacht M, Sbiera S. Differential expression of the protein kinase A subunits in normal adrenal glands and adrenocortical adenomas. *Sci Rep*. 2017;7(1):49.
27. Altieri B, Sbiera S, Herterich S, De Francia S, Della Casa S, Calabrese A, Pontecorvi A, Quinkler M, Kienitz T, Mannelli M, Canu L, Angelousi A, Chortis V, Kroiss M, Terzolo M, Fassnacht M, Ronchi CL. Effects of Germline CYP2W1*6 and CYP2B6*6 Single Nucleotide Polymorphisms on Mitotane Treatment in Adrenocortical Carcinoma: A Multicenter ENSAT Study. *Cancers (Basel)*. 2020;12(2).

28. Zsippai A, Szabo DR, Tombol Z, Szabo PM, Eder K, Pallinger E, Gaillard RC, Patocs A, Toth S, Falus A, Racz K, Igaz P. Effects of mitotane on gene expression in the adrenocortical cell line NCI-H295R: a microarray study. *Pharmacogenomics*. 2012;13(12):1351-1361.
29. Geng F, Cheng X, Wu X, Yoo JY, Cheng C, Guo JY, Mo X, Ru P, Hurwitz B, Kim SH, Otero J, Puduvalli V, Lefai E, Ma J, Nakano I, Horbinski C, Kaur B, Chakravarti A, Guo D. Inhibition of SOAT1 Suppresses Glioblastoma Growth via Blocking SREBP-1-Mediated Lipogenesis. *Clin Cancer Res*. 2016;22(21):5337-5348.
30. Geng F, Guo D. Lipid droplets, potential biomarker and metabolic target in glioblastoma. *Intern Med Rev (Wash D C)*. 2017;3(5).
31. Jiang Y, Sun A, Zhao Y, Ying W, Sun H, Yang X, Xing B, Sun W, Ren L, Hu B, Li C, Zhang L, Qin G, Zhang M, Chen N, Zhang M, Huang Y, Zhou J, Zhao Y, Liu M, Zhu X, Qiu Y, Sun Y, Huang C, Yan M, Wang M, Liu W, Tian F, Xu H, Zhou J, Wu Z, Shi T, Zhu W, Qin J, Xie L, Fan J, Qian X, He F, Chinese Human Proteome Project C. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma. *Nature*. 2019;567(7747):257-261.
32. Stopsack KH, Gerke TA, Andren O, Andersson SO, Giovannucci EL, Mucci LA, Rider JR. Cholesterol uptake and regulation in high-grade and lethal prostate cancers. *Carcinogenesis*. 2017;38(8):806-811.
33. Lacombe AMF, Soares IC, Mariani BMP, Nishi MY, Bezerra-Neto JE, Charchar HDS, Brondani VB, Tanno F, Srougi V, Chambo JL, Costa de Freitas RM, Mendonca BB, Hoff AO, Almeida MQ, Weigand I, Kroiss M, Zerbini MCN, Fragoso M. Sterol O-Acyl Transferase 1 as a Prognostic Marker of Adrenocortical Carcinoma. *Cancers (Basel)*. 2020;12(1).
34. Kerkhofs TM, Baudin E, Terzolo M, Allolio B, Chadarevian R, Mueller HH, Skogseid B, Leboulleux S, Mantero F, Haak HR, Fassnacht M. Comparison of two mitotane starting dose regimens in patients with advanced adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(12):4759-4767.
35. Mauclere-Denost S, Leboulleux S, Borget I, Paci A, Young J, Al Ghuzlan A, Deandreis D, Drouard L, Tabarin A, Chanson P, Schlumberger M, Baudin E. High-dose mitotane strategy in adrenocortical carcinoma: prospective analysis of plasma mitotane measurement during the first 3 months of follow-up. *Eur J Endocrinol*. 2012;166(2):261-268.
36. Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, Schlumberger M. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer*. 2001;92(6):1385-1392.
37. Kerkhofs TM, Derijks LJ, Ettaieb H, den Hartigh J, Neef K, Gelderblom H, Guchelaar HJ, Haak HR. Development of a pharmacokinetic model of mitotane: toward personalized dosing in adrenocortical carcinoma. *Ther Drug Monit*. 2015;37(1):58-65.
38. Arshad U, Taubert M, Kurlbaum M, Frechen S, Herterich S, Megerle F, Hamacher S, Fassnacht M, Fuhr U, Kroiss M. Enzyme autoinduction by mitotane supported by population pharmacokinetic modelling in a large cohort of adrenocortical carcinoma patients. *Eur J Endocrinol*. 2018;179(5):287-297.
39. Puglisi S, Calabrese A, Basile V, Ceccato F, Scaroni C, Simeoli C, Torlontano M, Cannavo S, Arnaldi G, Stigliano A, Malandrino P, Saba L, Altieri B, Della Casa S, Perotti P, Berchialla P, De Filipo G, Canu L, Loli P, Reimondo G, Terzolo M. Mitotane Concentrations Influence the Risk of Recurrence in Adrenocortical Carcinoma Patients on Adjuvant Treatment. *J Clin Med*. 2019;8(11).
40. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, Yeh MW, Wong SG, Clifton-Bligh RJ, Robinson BG, Sidhu SB. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res*. 2009;15(24):7684-7692.
41. Perge P, Butz H, Pezzani R, Bancos I, Nagy Z, Paloczi K, Nyiro G, Decmann A, Pap E, Luconi M, Mannelli M, Buzas EI, Toth M, Boscaro M, Patocs A, Igaz P. Evaluation and diagnostic potential of circulating extracellular vesicle-associated microRNAs in adrenocortical tumors. *Sci Rep*. 2017;7(1):5474.

42. Jouinot A, Assie G, Libe R, Fassnacht M, Papathomas T, Barreau O, de la Villeon B, Faillot S, Hamzaoui N, Neou M, Perlemoine K, Rene-Corail F, Rodriguez S, Sibony M, Tissier F, Dousset B, Sbiera S, Ronchi C, Kroiss M, Korpershoek E, de Krijger R, Waldmann J, K D, Bartsch, Quinkler M, Haissaguerre M, Tabarin A, Chabre O, Sturm N, Luconi M, Mantero F, Mannelli M, Cohen R, Kerlan V, Touraine P, Barrande G, Groussin L, Bertagna X, Baudin E, Amar L, Beuschlein F, Clauser E, Coste J, Bertherat J. DNA Methylation Is an Independent Prognostic Marker of Survival in Adrenocortical Cancer. *J Clin Endocrinol Metab*. 2017;102(3):923-932.
43. Assie G, Jouinot A, Fassnacht M, Libe R, Garinet S, Jacob L, Hamzaoui N, Neou M, Sakat J, de la Villeon B, Perlemoine K, Ragazzon B, Sibony M, Tissier F, Gaujoux S, Dousset B, Sbiera S, Ronchi CL, Kroiss M, Korpershoek E, De Krijger R, Waldmann J, Quinkler M, Haissaguerre M, Tabarin A, Chabre O, Luconi M, Mannelli M, Groussin L, Bertagna X, Baudin E, Amar L, Coste J, Beuschlein F, Bertherat J. Value of Molecular Classification for Prognostic Assessment of Adrenocortical Carcinoma. *JAMA Oncol*. 2019.
44. LaPensee CR, Mann JE, Rainey WE, Crudo V, Hunt SW, 3rd, Hammer GD. ATR-101, a Selective and Potent Inhibitor of Acyl-CoA Acyltransferase 1, Induces Apoptosis in H295R Adrenocortical Cells and in the Adrenal Cortex of Dogs. *Endocrinology*. 2016;157(5):1775-1788.
45. Cheng Y, Kerppola RE, Kerppola TK. ATR-101 disrupts mitochondrial functions in adrenocortical carcinoma cells and in vivo. *Endocr Relat Cancer*. 2016;23(4):1-19.
46. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, Libe R, Ardito A, Al Ghuzlan A, Quinkler M, Osswald A, Ronchi CL, de Krijger R, Feelders RA, Waldmann J, Willenberg HS, Deutschbein T, Stell A, Reincke M, Papotti M, Baudin E, Tissier F, Haak HR, Loli P, Terzolo M, Allolio B, Muller HH, Fassnacht M. Major prognostic role of Ki67 in localized adrenocortical carcinoma after complete resection. *J Clin Endocrinol Metab*. 2015;100(3):841-849.
47. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med*. 1990;322(17):1195-1201.
48. Fassnacht M, Libe R, Kroiss M, Allolio B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. *Nat Rev Endocrinol*. 2011;7(6):323-335.
49. Scollo C, Russo M, Trovato MA, Sambataro D, Giuffrida D, Manusia M, Sapuppo G, Malandrino P, Vigneri R, Pellegriti G. Prognostic Factors for Adrenocortical Carcinoma Outcomes. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2016;7:99.
50. Lippert J, Appenzeller S, Liang R, Sbiera S, Kircher S, Altieri B, Nanda I, Weigand I, Gehrig A, Steinhauer S, Riemens RJM, Rosenwald A, Muller CR, Kroiss M, Rost S, Fassnacht M, Ronchi CL. Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018;103(12):4511-4523.
51. Zhang F, Zhang F, Liu Z, Wu K, Zhu Y, Lu Y. Prognostic Role of Ki-67 in Adrenocortical Carcinoma After Primary Resection: A Retrospective Mono-Institutional Study. *Adv Ther*. 2019;36(10):2756-2768.
52. Libe R. Clinical and molecular prognostic factors in adrenocortical carcinoma. *Minerva Endocrinol*. 2019;44(1):58-69.
53. Libe R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, Bertherat J, Volante M, Quinkler M, Chabre O, Bala M, Tabarin A, Beuschlein F, Vezzosi D, Deutschbein T, Borson-Chazot F, Hermesen I, Stell A, Fottner C, Leboulleux S, Hahner S, Mannelli M, Berruti A, Haak H, Terzolo M, Fassnacht M, Baudin E, network E. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann Oncol*. 2015;26(10):2119-2125.

Table 1: Patient characteristics.

Parameters	adjuvant	advanced disease
Number of patients:	158	73
Age in years:	54.2 (17-83)	51 (16-80)
Sex:		
female	97 (61)	42 (58)
male	61 (39)	30 (42)
Tumor stage:		
I	10 (6.5)	2 (2.8)
II	88 (56)	19 (26.4)
III	52 (33)	11 (15.3)
IV	7 (4.5)	40 (55.6)
R status:		
n available	156	68
0	121 (77.6)	28 (41)
X	30 (19.2)	15 (22)
1	5 (3.2)	13 (19)
Ki67-Index:		
n available	144	66
<10%	30 (21)	18 (27.3)
≥10%	114 (79)	48 (66.4)
Weiss score:		
n available	142	55
median (range)	6 (2-9)	6 (3-9)
Endocrine activity:		
n available	143	62
hormone excess	96 (67)	45 (72.6)
inactive	47 (33)	17 (27.4)
Months to mitotane start:	1 (0-3)	0 (1-3)
Mitotane concentration after 3 months:		
n available	132	
median (range)	9.05 (0-29)	10 (1-27)
Mitotane concentration after 6 months:		
n available	125	51
median (range)	13 (1-27)	12 (1-32)

Data is shown as number (percentage) or median (range). Hormone excess was considered as any form of autonomous adrenal hormone secretion.

Table 2: Impact of SOAT1 expression and known prognostic parameters on RFS and DSS in the adjuvant (R0 or RX) cohort.

RFS variables	univariate analysis			multivariate analysis		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Sex						
female (n=91)						
male (n=56)	1.13	0.72-1.76	0.60	1.30	0.77-2.19	0.33
Age						
<50 (n=90)						
≥50 (n=58)	0.78	0.49-1.23	0.29	0.72	0.40-1.29	0.27
Hormone excess						
Yes (n=90)						
No (n=43)	1.39	0.84-2.32	0.20	1.55	0.86-2.77	0.14
Tumor stage						
I+ II (n=90)						
III + IV (n=56)	1.51	0.97-2.34	0.07	1.54	0.90-2.62	0.11
Ki67						
<10 (n=28)						
≥10 (n=107)	3.810	1.64-8.84	0.002*	2.86	1.18-6.96	0.02
Mitotane levels 3 months (median:9.1 mg/l) n=122						
<9.1						
≥9.1	1.50	0.92- 2.44	0.11	-	-	-
Mitotane levels 6 months (median:13 mg/l) n=116						
<13						
≥13	1.02	0.62 - 1.67	0.95	-	-	-
SOAT1						
H-Score low: <2 (n=89)						
H-Score high: ≥2 (n=59)	1.42	0.91-2.21	0.12	1.07	0.61-1.85	0.82
DSS variables	univariate analysis			multivariate analysis		
	HR	95% CI	p	HR	95% CI	p
Sex						
female (n=81)						
male (n=53)	1.19	0.462-2.28	0.61	1.65	0.74-3.67	0.22
Age						
<50 (n=80)						
≥50 (n=55)	0.64	0.32-1.29	0.21	0.60	0.24-1.55	0.29
Hormone excess						
Yes (n=85)						
No (n=36)	1.52	0.68-3.40	0.31	1.48	0.58-3.79	0.42

Tumor stage						
I + II (n=85)						
III + IV (n=48)	1.43	0.74-2.76	0.28	1.23	0.54-2.78	0.63
Ki67						
<10 (n=24)						
≥10 (n=99)	4.91	1.17-20.67	0.03*	3.60	0.80-16.24	0.10
Mitotane levels 3 months (median:9.1 mg/l) n=112						
<9.1						
≥9.1	1.52	0.76 – 3.06	0.24	-	-	-
Mitotane levels 6 months (median:13 mg/l) n=103						
< 13						
≥13	0.74	0.34-1.60	0.44	-	-	-
SOAT1						
H-Score low: <2 (n=81)						
H-Score high: ≥2 (n=54)	1.49	0.77-2.86	0.24	1.30	0.58-2.93	0.53

Hormone excess was considered as any form of autonomous adrenal hormone secretion. Abbreviation: preM-TTP, pre mitotane time to progression.

Table 3: Impact of SOAT1 expression and known prognostic parameters on PFS and DSS in the cohort with advanced disease.

PFS variables	univariate analysis			multivariate analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Sex						
female (n=40)						
male (n=27)	0.75	0.44-1.27	0.28	0.81	0.43-1.53	0.51
Age						
<50 (n=29)						
≥50 (n=38)	0.84	0.50-1.42	0.52	0.73	0.36-1.50	0.40
Hormone excess						
Yes (n=43)						
No (n=14)	1.46	0.77-2.78	0.25	1.98	0.97-4.03	0.06
preM-TTP						
<365 days						
≥365 days	0.37	0.18-0.72	0.004*	0.49	0.21-1.11	0.09
Ki67						
<10 (n=17)						
≥10 (n=45)	1.19	0.66-2.14	0.55	0.92	0.46-1.83	0.81
Mitotane levels 3 months (median:10 mg/l) n=58						
<10				-	-	-
≥10	0.70	0.40-1.22	0.21	-	-	-
Mitotane levels 6 months (median:12.5 mg/l) n=48						
<12.5				-	-	-
≥12.5	0.61	0.33-1.14	0.12	-	-	-
SOAT1						
H-Score low: <2 (n=37)						
H-Score high: ≥2 (n=30)	1.11	0.68-1.86	0.68	1.34	0.63-2.84	0.45
DSS variables	univariate analysis			multivariate analysis		
	HR	95% CI	<i>p</i>	HR	95% CI	<i>p</i>
Sex						
female (n=36)						
male (n=27)	0.48	0.26-0.92	0.026*	0.92	0.40-2.11	0.83
Age						
<50 (n=27)						
≥50 (n=36)	0.82	0.46-1.48	0.52	1.39	0.63-3.04	0.42
Hormone excess						
Yes (n=40)						
No (n=13)	1.04	0.52-2.07	0.92	1.20	0.52-2.80	0.67
Ki67						
<10 (n=14)						

≥10 (n=45)	2.47	1.14-5.32	0.021*	1.83	0.73-4.60	0.20
preM-TTP						
<365 days						
>365 days	0.60	0.01-0.26	<0.001*	0.10	0.02-0.49	0.004*
Mitotane levels 3 months (median:10 mg/l) n=54						
<10				-	-	-
≥10	1.05	0.56-1.98	0.88			
Mitotane levels 6 months (median:12.5 mg/l) n=45						
<12.5	0.62	0.30-1.27	0.19	-	-	-
≥12.5	0.62	0.30-1.27	0.19			
SOAT1						
H-Score low: <2 (n=35)						
H-Score high: ≥2 (n=28)	0.81	0.44-1.46	0.48	0.72	0.31-1.70	0.45

Hormone excess was considered as any form of autonomous adrenal hormone secretion.

Abbreviation: preM-TTP, pre mitotane time to progression.

Figure legends

Figure 1: SOAT1 immunohistochemistry staining of full ACC FFPE sections. First column shows an overview of SOAT1 staining intensities within the same tumors (scale bars: 3mm). Second column shows 3x magnification of the representative slide in first column (scale bars: 700µm) and third column shows 20x magnification of the slide shown in column A (scale bars: 200µm) (A-C: SOAT1 H-score 3, inhomogeneous staining; D-F: SOAT1 H-Score 3, inhomogeneous staining; G-I: SOAT1 H-score 2, homogeneous staining, J-L: SOAT1 H-score 0, homogenous staining).

Figure 2: Kaplan-Meier plots of SOAT1 low and high expressing ACC. (A) Recurrence-free survival and (B) disease-specific survival of ACC patients in the adjuvant group. (C) progression-free survival (D) and disease-specific survival of ACC patients with advanced disease.

Figure 3: SOAT1 expression and treatment response. No significant differences regarding mitotane response between SOAT1 high and SOAT1 low expressing tumors were observed in the adjuvant arm (A), nor in advanced stages (B).

Figure 4: Correlation of SOAT1 expression and mitotane plasma concentrations. (A) In both arms, high SOAT1 expression was not correlated with higher mitotane plasma levels. Patients with high SOAT1 expression are not more likely to reach mitotane plasma levels above 14 mg/l not in the adjuvant setting (B), nor in patients with advanced disease (C). When only patients reaching the mitotane target level of 14 mg/l were analysed, high SOAT1 expression was significantly correlated with higher rates of recurrences after three months (D) which did not retain significance after six months (E).

Figure 1

Figure 2

Figure 3

Figure 4