VÂNIA BALDERRAMA BRONDANI

**Análise dos genes *ATRX* e *ZNRF3* como fatores de prognóstico do
carcinoma adrenocortical**

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

Programa de Endocrinologia

Co-Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz
de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida
Barisson Villares Fragoso

**São Paulo
2021**

VÂNIA BALDERRAMA BRONDANI

**Análise dos genes *ATRX* e *ZNRF3* como fatores de prognóstico do
carcinoma adrenocortical**

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

Programa de Endocrinologia

Co-Orientador: Prof. Dr. Madson Queiroz
de Almeida

Orientadora: Profa. Dra. Maria Candida
Barisson Villares Fragoso

**São Paulo
2021**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Brondani, Vânia Balderrama
Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como fatores de
prognóstico do carcinoma adrenocortical / Vânia
Balderrama Brondani. -- São Paulo, 2021.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.
Programa de Endocrinologia.
Orientadora: Maria Candida Barisson Villares
Fragoso.
Coorientador: Madson Queiroz de Almeida.

Descritores: 1.Expressão gênica 2.Carcinoma
adrenocortical 3.Tumor adrenal pediátrico
4.Glândulas suprarrenais

USP/FM/DBD-155/21

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: Brondani, Vânia Balderrama

Título: Análise dos genes *ATRX* e *ZNRF3* como fatores de prognóstico do carcinoma adrenocortical

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

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Aos meus pais, Luis e Elizeth, por todo amor e dedicação a família.

Aos meus irmãos, Ísis e Gustavo, pelo apoio dado nessa trajetória.

Ao meu marido, William, por seu companheirismo, carinho e tolerância em nossa caminhada.

Aos meus filhos, Daniel e Olivia, por serem o maior incentivo na busca de uma vida melhor, e serem fonte de felicidade e amor, especialmente nos dias difíceis.

AGRADECIMENTOS

O maior desafio no desenvolvimento de um projeto é encontrar pessoas que tenham capacidade técnica, para o auxílio buscado, ao mesmo tempo que sejam luz e transmitam carinho através do trabalho prestado. A essas pessoas, que iluminaram e me acompanharam em minha trajetória acadêmica, deixo aqui meu sincero agradecimento.

À Profa. Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso, por toda orientação e aprendizado passados nesses anos de convivência. Meu agradecimento por ser exemplo como professora, pesquisadora e médica. Uma mulher com um brilho inesgotável, com energia e comprometimento que cativam todos a sua volta. Agradeço a oportunidade de ser sua aluna de pós-graduação, pelas orientações e correções dados durante essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida, por ser exemplo para vida profissional e pessoal, desde meu primeiro dia como preceptora do programa de Residência de Endocrinologia do HCFMUSP.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, por todos os ensinamentos e exemplo passados no dia-a-dia, como professora, médica e pesquisadora. Agradeço por ter me dado a oportunidade de entrar para essa Instituição e ter me guiado durante a vida acadêmica, juntamente com o Prof. Dr. Madson Queiroz de Almeida.

À Profa. Dra. Ana Claudia Latronico por ser grande incentivadora da busca pelo conhecimento e da pesquisa, e por ser exemplo de liderança na condução do Departamento de Endocrinologia do HCFMUSP.

À Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, ao Dr. Iberê Cauduro Soares, por toda colaboração na realização da análise e leitura dos estudos imunohistoquímicos.

À equipe do LIM42, em especial à Luciana Montenegro, Mirian Yumie Nishi e Mariana Ferreira de Assis Funari, pelas horas dispendidas no desenvolvimento de importantes etapas desse estudo, pela paciência em ensinar as técnicas moleculares e os conceitos teóricos relacionados. Meu desenvolvimento profissional e interesse adquirido nessa área se deve a suas presenças nesse caminho.

À querida Beatriz Marinho de Paula Mariani, que sempre esteve disposta a colaborar na parte prática deste estudo. Sua participação, sempre carismática, foi fundamental para o desenvolvimento das técnicas moleculares, desde a extração de material genético até a realização da técnica RT-qPCR.

Ao Vinícius Fernando Calsavara, por sua contribuição com a análise dos dados e orientação dos métodos estatísticos.

Às professoras membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Tania Bachega, Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini, e Dra. Helena Valassi, pelas críticas e sugestões valiosas para o aprimoramento desta tese.

Às queridas amigas de pós-graduação Letícia Assis Pereira Vilela e Helaine Laiz da Silva Charchar pela querida e motivadora convivência no dia-a-dia da vida acadêmica, e pela parceria nos ambulatórios, aulas, congressos e cursos.

Aos pacientes do ambulatório da suprarrenal, por serem compreensíveis com seus cuidadores e com a equipe médica mesmo nos momentos delicados de suas vidas. Agradecimento também pela contribuição essencial para o aprendizado médico desta instituição.

A Deus, meu agradecimento diário, por me dar disposição para vencer os obstáculos do caminho, e me recompensar com a companhia valiosa das pessoas aqui mencionadas.

Agradecimentos Especiais

À FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Auxílio Regular de Pesquisa processo n. 2017/26345-5), pelo financiamento parcial deste projeto de pesquisa e pela confiança na equipe de pesquisadores da Unidade de Suprarrenal do HCFMUSP.

“O período de maior ganho em conhecimento e experiência é o período mais difícil da vida de alguém.”

Dalai Lama

RESUMO

BRONDANI, V.B. *Análise dos genes ATRX e ZNRFF3 como fatores de prognóstico do carcinoma adrenocortical*. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia rara e geralmente associada a um prognóstico desfavorável. Estudos pan-genômicos demonstraram o envolvimento dos genes *ATRX* e *ZNRFF3* no processo da tumorigênese adrenal, porém, esses dados não foram validados em tumores de coorte adulta e pediátrica na população brasileira, particularmente em pacientes das regiões sul e sudeste do Brasil, onde a variante patogênica germinativa p.R337H-*TP53* é prevalente. O objetivo principal dessa tese foi avaliar o número de cópias do *ATRX* e *ZNRFF3* e suas expressões gênicas e proteicas, numa coorte adulta e pediátrica, com CAC e tumor adrenal pediátrico (TAP), respectivamente, associados ou não a variante patogênica germinativa p.R337H-*TP53*. O objetivo secundário foi definir o valor prognóstico das alterações moleculares e expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRFF3*, e suas correlações com os dados clínicos e hormonais. A coorte de tumores composta por 37 CAC e 16 TAP foi submetida a técnica de MLPA e RT-qPCR. Registramos a alteração no número de cópias no gene *ATRX* e *ZNRFF3* em 9,37% e 38,70%, respectivamente, da coorte adulta, e em 15,38% e 30,76%, respectivamente, da coorte pediátrica. A frequência registrada em ambos os genes, da coorte brasileira, são superiores aos encontrados nas publicações médicas. As alterações no número de cópias e das expressões gênicas de ambos os genes não apresentaram valor prognóstico associado. Entretanto, observamos que a alteração no número de cópias do *ZNRFF3* teve relação com a secreção hormonal SDHEA, na coorte adulta ($p=0,045$), enquanto na coorte pediátrica teve relação com os critérios histopatológicos, ausência de mitoses atípicas, de necrose tumoral e com a variante patogênica germinativa p.R337H do *TP53* ($p=0,018$, $p=0,045$, e $p=0,045$, respectivamente). A coorte de tumores submetidos a técnica de imunohistoquímica foi composta por 82 CAC e 52 TAP. A coorte, foi agrupada em *tissue microarray* (TMA), foi avaliada por dois patologistas com expertise na análise da glândula adrenal. A fraca expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRFF3* foram associadas a uma diminuição na sobrevida global (SG) da coorte adulta ($p=0,045$, $p=0,012$, respectivamente). A forte expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRFF3* foram associadas a uma maior sobrevida livre de recorrência (SLR) ($p=0,027$ e $p=0,005$, respectivamente). Na coorte pediátrica não estabelecemos valor prognóstico de ambas as expressões proteicas dos genes *ATRX* e *ZNRFF3*; observamos nessa coorte uma correlação positiva da expressão proteica do gene *ATRX* com o escore de Wienenke e o escore de Weiss ($p=0,004$ e $p=0,001$, respectivamente). O conhecimento da biologia tumoral é fundamental para individualizar o tratamento dos pacientes com CAC, permitindo com que a equipe multidisciplinar desenvolva uma terapêutica direcionada e mais efetiva. Nossos dados corroboram com os resultados dos estudos pangenômicos sobre a tumorigênese adrenal. Utilizamos uma ferramenta de fácil acesso na prática clínica, a expressão proteica por imunohistoquímica dos genes *ATRX* e *ZNRFF3*, como fator de prognóstico nos pacientes adultos com CAC. Essa mesma ferramenta também se mostrou promissora em pacientes pediátricos pelas correlações com fatores prognósticos já estabelecidos na literatura para essa população.

Descritores: Expressão gênica, Carcinoma adrenocortical, Tumor adrenal pediátrico, Glândulas suprarrenais.

ABSTRACT

BRONDANI, V.B. *Analysis of ATRX and ZNRF3 genes as prognostic factors of adrenocortical carcinoma*. [Tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2021

Adrenocortical carcinoma (CAC) is rare neoplasia and is usually associated with an unfavorable prognosis. Pan-genomic studies have demonstrated the involvement of the ATRX and ZNRF3 genes in the adrenal tumorigenesis process. However, these data have not been validated in Brazilian adult and pediatric cohort tumors, particularly in patients from the south and southeast regions of Brazil, where the germinative pathogen p.R337H-TP53 variant is prevalent. Our main objective was to evaluate the number of copies of ATRX and ZNRF3 genes and their gene and protein expressions, in an adult and pediatric cohort, with CAC and pediatric adrenal tumor (TAP), respectively, associated or not with the germinative pathogenic p.R337H-TP53 variant. The secondary objective was to define the prognostic value of the ATRX and ZNRF3 molecular findings and protein expression and their correlations with clinical and hormonal data. The tumor cohort composed of 37 CAC and 16 TAP was submitted to the MLPA and RT-qPCR technique. We found alterations in the number of copies in the ATRX and ZNRF3 gene in 9.37% and 38.70% of the adult cohort, respectively, and 15.38% and 30.76% of the pediatric cohort, respectively. The recorded frequency of both genes in this Brazilian cohort is higher than those found in medical publications. The alterations in the number of copies and gene expressions of both genes did not have a prognostic value. However, we observed that the difference in the number of copies of ZNRF3 was related to the SDHEA hormonal secretion in the adult cohort ($p = 0.045$). In the pediatric cohort, it was related to histopathological criteria, absence of atypical mitoses, tumor necrosis, and the germinative pathogenic p.R337H of TP53 variant ($p = 0.018$, $p = 0.045$, and $p = 0.045$, respectively). The tumor cohort submitted to immunohistochemistry was composed of 82 CAC and 52 TAP. Two pathologists with expertise in the adrenal gland evaluated the cohort. The low ATRX and ZNRF3 protein expressions were associated with decreased adult overall survival (SG) ($p = 0.045$, $p = 0.012$, respectively). The high ATRX and ZNRF3 protein expression were associated with a more prolonged recurrence-free survival (SLR) ($p = 0.027$ and $p = 0.005$, respectively). In the pediatric cohort, we did not establish a prognostic value for both protein expressions. We observed in the pediatric cohort a positive correlation of the ATRX gene protein expression with the Wieneke score and the Weiss score ($p = 0.004$ and $p = 0.001$, respectively). Knowledge of tumor biology is essential to individualize the CAC treatment, allowing the multidisciplinary team to apply a targeted and more effective therapy. Our data corroborate with the pan-genomic study results about adrenal tumorigenesis. We use an accessible and easy tool in clinical practice, ATRX and ZNRF3 protein expression by immunohistochemistry, as a prognostic factor in adult patients with CAC. This same tool has shown a promising value in pediatric patients due to the correlations with classic prognostic factors already established in the literature.

Keywords: Gene expression, Adrenocortical carcinoma, Pediatric adrenal tumor, Adrenal glands.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão da proteína ATRX

Gráfico 2. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão da proteína ZNRF3

Gráfico 3. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão de Ki67

Gráfico 4. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão combinada das proteínas ATRX e ZNRF3

Gráfico 5. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão da proteína ATRX

Gráfico 6. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão da proteína ZNRF3

Gráfico 7. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão do Ki67

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Ilustração 1. Figura esquemática da função do *ATR*X, na via ALT
- Ilustração 2. Figura esquemática da via de sinalização Wnt / β -catenina
- Ilustração 3. Fotografia da eletroforese em gel de agarose a 1% identificando bandas de DNA
- Ilustração 4. Realce das áreas de interesse nas lâminas e nos respectivos blocos doadores
- Ilustração 5. Deleções registradas no gene *ATR*X na coorte adulta
- Ilustração 6. Alterações no número de cópias registradas no gene *ZNRF3* na coorte adulta
- Ilustração 7. Deleções registradas no gene *ATR*X na coorte pediátrica
- Ilustração 8. Alterações no número de cópias registradas no gene *ZNRF3* na coorte pediátrica
- Ilustração 9. Imunorreatividade da proteína ATRX em amostras de CAC
- Ilustração 10. Imunorreatividade da proteína ZNRF3 em amostras de CAC
- Ilustração 11. Imunorreatividade da proteína ZNRF3 e da Beta-catenina em amostras de CAC

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Investigação diagnóstica de pacientes com possível CAC

Tabela 2 - Escore de Weiss e Escore de Weiss modificado

Tabela 3 - Sistema de estadiamento ENSAT e ENSAT modificado (mENSAT+GRAS), de acordo com o sistema de estadiamento TNM de tumores malignos.

Tabela 4 - Investigação diagnóstica de pacientes com possível TAP

Tabela 5 - Escore de Wienieke para avaliação dos pacientes pediátricos com TAP

Tabela 6 - Sistema de estadiamento MacFarlane e Sullivan, e sistema de Sandrini, Michalkiewicz e Ribeiro, para casos com TAP

Tabela 7 - Tabela referência para análise do número de cópias do gene *ATRX*

Tabela 8 - Tabela referência para análise do número de cópias do gene *ZNRF3*

Tabela 9 - Caracterização dos genes utilizados no experimento

Tabela 10 - Coeficiente de concordância intraobservador

Tabela 11 - Escore semi-quantitativo para análise da extensão da imunorreatividade

Tabela 12 - Escore semi-qualitativo para análise da intensidade da imunorreatividade

Tabela 13 - Coorte adulta de CAC submetida ao estudo molecular

Tabela 14 - Coorte pediátrica submetida ao estudo molecular

Tabela 15 - Resumo das características dos 82 pacientes com CAC, cujos tecidos tumorais foram inseridos no TMA.

Tabela 16 - Resultados da análise de regressão de Cox na coorte adulta

Tabela 17 - Resumo das características dos 47 pacientes com TAP, cujos tecidos tumorais foram inseridos no TMA

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

¹⁸ FDG-PET/TC	Tomografia por emissão de pósitrons com uso de fluordesoxiglicose marcada com flúor-18
2- $\Delta\Delta C_T$	Método de quantificação relativa
ΔC_t	Delta C_t
A1MN	Ambulatório da Unidade de Suprarrenal - Unidade A1MN 1105
<i>ACTB</i>	Gene da β -actina
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ALT	Via alternativa de alongamento dos telômeros (<i>alternative lengthening of telomeres</i>)
<i>APC</i>	Gene <i>APC</i> (<i>Adenomatous Polyposis Coli</i>)
ATRX	Proteína ATRX (<i>Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked</i>)
<i>ATRX</i>	Gene <i>ATRX</i> (<i>Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked</i>)
b-Trcp	Fator envolvido na via Wnt/Beta-catenina
BSA	Solução de albumina de soro bovino
c.	Codon
C1A	Classificação prognóstica em clusters - C1A subgrupo agressivo
C1B	Classificação prognóstica em clusters - C1B subgrupo indolente
CAC	Carcinoma adrenocortical
CAPPesq	Comissão de ética para análise de projetos de pesquisa
cDNA	DNA complementar
CGA	Campo de grande aumento
CK1	Fator <i>casein kinase 1</i>
CLU	Cortisol livre urinário
COG	<i>Children's Oncology Group</i>
CS	Cortisol salivar
C_t	<i>Cycle threshold</i> (ciclo limiar)
<i>CTNNB1</i>	Gene da beta-catenina 1
<i>CYC</i>	Gene da ciclofilina
DAXX	Proteína DAXX (Death domain associated protein)
<i>DAXX</i>	Gene DAXX (Death domain associated protein)

DDT	Inseticida diclorodifenil-tricloroetano
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHT	Dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamido tetra-acético
DQ	Coeficiente de dosagem
EDP	Ciclo de quimioterapia com etoposídeo, doxorubicina e cisplatina
ENSAT	<i>European Network for the Study of Adrenal Tumors</i> (Rede Europeia para o Estudo dos Tumores Adrenais)
EO2401	Droga experimental baseada em imunoterapia
FAM	Marcador fluorescente utilizado na RT-qPCR
FSH	Hormônio folículo-estimulante
Fz	Receptor de membrana (<i>Frizzled</i>)
GRAS	Critérios de refinamento do mENSAT (G: grau tumoral R: <i>status</i> da ressecção do tumor primário; A: idade; S: sintomas relacionados ao tumor ou a secreção hormonal)
GSK3	Fator <i>glycogen synthase kinase 3</i>
<i>GUSB</i>	Gene da β -glicuronidase
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HR	<i>Hazard ratio</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC 95%	Intervalo de confiança 95%
IHQ	Imunohistoquímica
Ki67	Marcador de proliferação celular
LGR4/5	Receptor acoplados a proteína <i>G Rhodopsina</i> 4 e 5
LH	Hormônio luteinizante
LIM14	Laboratório de investigação médica 14
LIM42	Laboratório de investigação médica 42
LRP5/6	Receptor de membrana (<i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i> 5/6
mENSAT	Sistema de estadiamento ENSAT modificado
MLPA	Amplificação de Sonda Multiplex Ligação-dependente (<i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i>)
miRNA	microRNA

n	número
P53, p53	Proteína tumoral 53
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
R0	Ressecção tumoral com margens livres de neoplasias
R1	Ressecção tumoral com resíduos microscópicos
R2	Ressecção tumoral com resíduos macroscópicos
RM	Ressonância magnética
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RNF3	Proteína <i>Ring finger protein 3</i>
RSPO	Proteínas R-Spondinas
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
RX	Ressecção tumoral desconhecida
SDHEA	Sulfato de dehidroepiandrosterona
SF-1	Fator esteroideogênico 1
SG	Sobrevida global
SHH	Via de sinalização <i>Hedgehog</i>
SLR	Sobrevida livre de recorrência
SPSS	Programa estatístico (<i>Statistical Package for Social Sciences software</i>)
SUV	<i>Standardized uptake values</i>
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TAP	Tumor adrenal pediátrico
TC	Tomografia computadorizada
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TMA	Micromatriz tecidual (<i>tissue microarray</i>)
TNM	Sistema de estadiamento de tumores malignos (T-tumor, N-linfonodo, M-metástase)
<i>TP53</i>	Gene que codifica a proteína tumoral P53
UH	Unidades de Hounsfield
VIC	Marcador fluorescente utilizado na RT-qPCR
VSN	Valor superior da normalidade

Wnt	Via de sinalização da proteína <i>Wingless iNTEGRation</i>
<i>ZNRF3</i>	Gene que codifica a proteína 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
ng/μL	Nanogramas por microlitro
nM	Nanomol
μg/dL	Microgramas por decilitro
μg/mL	Microgramas por mililitro
μL	Microlitro
μm	Micrômetro

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice A. Fluxograma para avaliação e tratamento do CAC

Apêndice B. Fluxograma para avaliação e tratamento do TAP

Apêndice C. Termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento livre e esclarecido utilizados nesse estudo

Apêndice D. Desenho esquemático da coorte total de tumores de CAC e TAP

Apêndice E. Análise dos genes *ATRX* e *ZNRF3* usando MLPA

Apêndice F. Banco de dados clínicos e hormonais dos pacientes com CAC e TAP

Apêndice G. Banco de dados dos resultados moleculares dos pacientes com CAC e TAP

Apêndice H. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier da coorte adulta

Apêndice I. Banco de dados dos resultados imunohistoquímicos dos pacientes com CAC e TAP

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1. Protocolo para extração de DNA e RNA

Anexo 2. Protocolo para síntese de DNA complementar

Anexo 3. Protocolo para técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

Anexo 4. Artigo publicado: “Low protein expression of both *ATRX* and *ZNRF3* as novel negative prognostic markers of adult adrenocortical carcinoma”

Anexo 5. Artigo publicado: “High prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes of Lynch syndrome in pediatric patients with adrenocortical tumors carrying a germline mutation on *TP53*”

Anexo 6. Artigo publicado: “Pediatric adrenocortical tumor – review and management update”

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
1.1.O carcinoma adrenocortical	23
1.2. O CAC em pacientes adultos	23
1.2.1. Avaliação diagnóstica e histopatológica do CAC	24
1.2.2. Estadiamento e fatores prognósticos do CAC	27
1.3.Tumor adrenal pediátrico (TAP)	29
1.3.1. Avaliação diagnóstica e histopatológica do TAP	29
1.3.2. Estadiamento e fatores prognósticos do TAP	31
1.4.Tratamento do CAC e TAP	32
1.5.Bases moleculares	33
1.5.1. ATRX e seu papel na tumorigênese	34
1.5.2. ZNRFB e seu papel na tumorigênese	37
2. OBJETIVOS	40
2.1.Objetivo específico	41
2.2.Objetivos secundários	41
3. MÉTODOS	42
3.1.Considerações éticas	43
3.2. Casuística	43
3.2.1. Tecidos tumorais submetidos a análise molecular	44
3.2.2. Tecidos tumorais submetidos ao estudo imunohistoquímico	44
3.2.3. Variáveis analisadas	45
3.3.Extração de DNA e RNA	45
3.4.Síntese de DNA complementar	46
3.5.Ligação multiplex dependente de amplificação de sonda (Multiplex Ligation dependent Probe Amplification – MLPA)	47
3.5.1. MLPA – Gene <i>ATRX</i>	48
3.5.2. MLPA – Gene <i>ZNRFB</i>	48
3.6.PCR quantitativa em tempo real	49
3.7.Micromatriz tecidual dos tumores primários	51
3.7.1. Imunohistoquímica	52
3.7.2. Análise da imunohistoquímica	55
3.7.2.1.Análise da imunohistoquímica (Ki67)	56

3.8.Estatística	56
4. RESULTADOS	58
4.1.Resultados moleculares	59
4.1.1. Coorte adulta	59
4.1.1.1.Resultado molecular do gene <i>ATRX</i>	61
4.1.1.2.Resultado molecular do gene <i>ZNRF3</i>	62
4.1.1.3.Outras variáveis com valor prognóstico	63
4.1.2. Coorte pediátrica	64
4.1.2.1.Resultado molecular do gene <i>ATRX</i>	66
4.1.2.2.Resultado molecular do gene <i>ZNRF3</i>	66
4.1.3. Avaliação dos casos metastáticos	67
4.2.Resultados imunohistoquímicos	69
4.2.1. Coorte adulta	69
4.2.1.1.Proteína ATRX	70
4.2.1.2.Proteína ZNRF3	72
4.2.1.3.Marcador de proliferação Ki67 e análise combinada	75
4.2.1.4.Sobrevida livre de recorrência	76
4.2.1.5.Outras variáveis com valor prognóstico	78
4.2.2. Coorte pediátrica	80
4.2.2.1.Proteína ATRX	82
4.2.2.2.Proteína ZNRF3	83
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÃO	95
6.1.Conclusões	96
APÊNDICES	97
REFERÊNCIAS	135
ANEXOS	156

1 INTRODUÇÃO

1.1.O carcinoma adrenocortical

O carcinoma adrenocortical (CAC) é considerado uma neoplasia maligna rara com incidência variando de 0,7 a 2 casos por milhão/ano (1-5). O CAC geralmente apresenta um prognóstico desfavorável, com uma sobrevida global em 5 anos menor que 40% principalmente nos estadios mais avançados da doença ao diagnóstico (3, 6-10). O comportamento tumoral do CAC é variável, e pode ser justificado, em parte, pelas diferentes alterações moleculares e assinaturas genéticas envolvidas no processo da tumorigênese (2, 4, 10). Esta distinta biologia tumoral reflete na evolução clínica entre os pacientes adultos e pediátricos e determinam diferentes fatores prognósticos (11-17).

O CAC apresenta uma distribuição bimodal, sendo que o primeiro pico ocorre na infância, antes dos 4 anos, e o segundo pico na vida adulta, entre a quarta e quinta décadas de vida (18, 19). A incidência de TAP é estimada em 2,9-4,2 casos/milhão/ano, em crianças abaixo de 15 anos, nas regiões Sul e Sudeste do Brasil correspondendo a uma taxa 10-15 vezes maior em relação à incidência mundial (16, 20). Esta diferença é devido, principalmente, à alta prevalência da variante patogênica germinativa no codon 337 do gene *TP53* (c.1010G>A, p.A337H) nessas regiões do Brasil, presente em 70 a 98% dos pacientes com TAP (16, 21-25). Pinto *et al.* e Garritano *et al.* demonstraram o efeito fundador dessa variante na população brasileira (23, 26).

De acordo com o critério de Chompret, os pacientes com tumor adrenal e presença das variantes patogênicas germinativas do *TP53* são classificados como síndrome de Li-Fraumeni like (27). As variantes patogênicas germinativas do *TP53* são responsáveis pela grande maioria (70-90%) dos pacientes com TAP, enquanto que entre os pacientes adultos há uma frequência maior de CAC esporádicos com alta frequência de variantes patogênicas somáticas do *TP53* (4, 24, 27).

1.2.O CAC em pacientes adultos

O CAC tem uma apresentação clínica variável (4), cerca de 70% apresentam algum sinal ou sintoma clínico devido a hipersecreção hormonal; sendo a síndrome de Cushing responsável por pelo menos um terço dos casos (2). A síndrome clínica mista, causada pela hipersecreção de cortisol e de andrógenos, é responsável pela maioria dos casos de CAC, (10, 16, 20, 28, 29). A produção estrogênica é rara e geralmente está associada a tumores com comportamento

biológico mais agressivo (10). A produção exclusiva de aldosterona é extremamente rara, havendo poucos relatos descritos na literatura (4).

O crescente uso de imagem radiológica na prática médica, como tomografia de abdome e de tórax, tem levado a uma maior frequência de diagnóstico de incidentalomas adrenais. Cerca de 10-15% dos incidentalomas adrenais correspondem a CAC não-funcionantes ou associados a mínima produção de cortisol, designado de possível secreção autônoma de cortisol (10, 30, 31).

1.2.1. Avaliação diagnóstica e histopatológica do CAC

A investigação diagnóstica de pacientes com possível CAC tem sido realizada de acordo com o proposto pela Rede Europeia para o Estudo dos Tumores Adrenais (ENSAT) (10). Esta investigação criteriosa compreende avaliação clínica do paciente e avaliação da esteroidogênese adrenal e seus precursores, assim como a exclusão de feocromocitoma, e a realização de exames de imagem, para estadiamento da doença. De acordo com os achados da imagem radiológica/estadiamento, os pacientes são orientados ao procedimento cirúrgico ou neoadjuvância com quimioterapia sistêmica/oral (Tabela 1).

Arlt *et al.* desenvolveram uma abordagem metabólica, baseada na combinação de perfis de metabólitos de esteróides urinários, utilizando a espectrometria de massa, e a análise elaborada de dados (32). Essa ferramenta consegue identificar as lesões adrenais sugestivas de neoplasia maligna, principalmente quando não há hipersecreção hormonal evidente nos métodos convencionais. Os CAC podem apresentar produção esteroidal ineficiente, que resulta em um aumento de precursores esteroidais, por uma desdiferenciação e padrão incompleto de expressão das enzimas esteroidogênicas (32).

Tabela 1 - Investigação diagnóstica de pacientes com possível CAC.

<i>Avaliação inicial</i>	
Objetivo	Exame
Avaliar a secreção de cortisol	<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)
Avaliar a secreção sérica de esteroides sexuais e seus precursores	<ul style="list-style-type: none"> • DHEAS • 17-Hidroxiprogesterona • Androstenediona • Testosterona / testosterona livre • 17-β-estradiol (apenas em homens ou mulheres na pós menopausa)

	<ul style="list-style-type: none"> • 11-Desoxicortisol
Avaliar a secreção de mineralocorticoides	<ul style="list-style-type: none"> • Potássio • Relação Aldosterona/renina (apenas em pacientes com hipertensão arterial e/ou com hipocalemia)
Excluir feocromocitoma	<ul style="list-style-type: none"> • Metanefrinas urinárias 24h • Metanefrinas plasmáticas
Avaliação da massa adrenal e estadiamento.	<ul style="list-style-type: none"> • TC ou RM de abdome e pelve • TC de tórax • ¹⁸FDG-PET/TC (se suspeita clínica de metástases) • Imagem óssea ou cerebral (em casos de dor/fratura óssea, e casos suspeitos de metástases nesses locais)

*TC: tomografia computadorizada; RM: ressonância magnética; ¹⁸FDG-PET/TC: tomografia por emissão de pósitrons com uso de fluordesoxiglicose marcada com flúor-18

Bancos *et al.* (33) validaram a abordagem metabolômica, num estudo multicentrico e prospectivo, como ferramenta diagnóstica para CAC. Nesse estudo, os perfis de metabólitos de esteróides urinários foram classificados através de aprendizado de máquina, uma forma de inteligência artificial, em baixo, moderado e alto risco para CAC. E os metabólitos da androstenediona e testosterona, 17-hidroxi-pregnenolona, pregnenolona, progesterona, 17-hidroxi-progesterona e 11-deoxicortisol estiveram associados com o perfil de alto risco para CAC (32, 33). Posteriormente, o perfil da abordagem metabolômica foi combinado com as características de imagem adrenal (diâmetro maior $\geq$ 4cm e atenuação da lesão >20 UH em TC); e essa abordagem, estratégia de testes combinados, se mostrou superior na detecção de CAC quando comparados a abordagem individual, apresentando menor probabilidade de falsos positivos na detecção diagnóstica, o que impacta na avaliação e indicação cirúrgica desses pacientes (33).

Os exames de imagem representam uma etapa importante na investigação diagnóstica, pois auxiliam na diferenciação entre adenomas e CAC. A grande maioria dos adenomas tem tamanho menor que 4cm e tumores maiores que 5 cm são altamente sugestivos de carcinomas (30). A tomografia computadorizada (TC) é um dos exames de imagem mais realizado na investigação diagnóstica de CAC, seguido pela ressonância magnética (RM). A densidade de gordura <10 Unidades de Hounsfield (UH) na TC pré-contraste é um achado altamente sugestivo de benignidade (34). Como 30% dos adenomas tem uma densidade maior que 10UH na TC, a análise do clareamento do contraste endovenoso é uma ferramenta que auxilia no diagnóstico (35). Quando ocorre uma queda de sinal (superior a 60%), após 10-15 minutos da infusão de contraste, é um sinal de benignidade (sensibilidade e especificidade superior a 90%) (35). No caso da RM, o CAC apresenta um aumento do sinal nas imagens ponderadas em T2, entretanto, casos de feocromocitoma podem se apresentar com essa mesma característica e a

realização do diagnóstico diferencial se faz necessário por meio da análise das metanefrinas plasmáticas ou urinárias. Na RM, a perda de sinal, superior a 50%, da lesão nas imagens ponderadas em T1 fora de fase (*chemical shifting*) sugere alto teor lipídico, que é interpretado como sinal de benignidade (36).

Outros achados que sugerem benignidade em exames de imagem são: tumor com estrutura homogênea, apresentando limites bem definidos e plano de clivagem com as estruturas adjacentes. As lesões malignas costumam ser heterogêneas, podendo apresentar hemorragia, necrose e calcificações, e muitas vezes tendem a apresentar margens irregulares, e invasão de estruturas adjacentes (37, 38).

A tomografia por emissão de pósitrons (PET), utilizando a fluordesoxiglicose marcada com flúor-18 (^{18}F -FDG) quando usado juntamente à TC é uma importante ferramenta complementar em pacientes na investigação de CAC, principalmente no contexto de doença metastática. Uma captação de glicose marcada (SUV_{MAX}) absoluta maior que 6 sugere uma lesão potencialmente maligna, por apresentar aumento do metabolismo de glicose (39).

A avaliação histopatológica, que confirma o diagnóstico de CAC, deve ser realizado por um patologista experiente em patologias da adrenal. O escore de Weiss é uma ferramenta amplamente utilizada para diagnóstico histopatológico de CAC, que considera 9 critérios histopatológicos (três deles relacionados à estrutura tumoral, três relacionados à estrutura celular e três relacionados à capacidade de invasão do tumor) para sugestão de malignidade (40). Um escore maior ou igual a 3 confirma o diagnóstico de CAC. Em 2002, o Escore de Weiss foi modificado e quatro critérios foram excluídos por serem subjetivos na avaliação, entretanto a definição de CAC é a mesma, sendo sugerida quando há um escore maior ou igual a 3 (Tabela 2) (40, 41).

Tabela 2 - Escore de Weiss e Escore de Weiss modificado.

<i>Escore de Weiss (40)</i>	
Avaliação objetiva	Crítérios histopatológicos
Estrutura tumoral	Células claras compreendendo 25% ou menos do tumor
	Arquitetura difusa (maior que um terço do tumor)
	Necrose
Estrutura celular	Alto grau nuclear (grau 3 ou 4 de acordo com os critérios de <i>Fuhrman et al.</i> (42))
	Índice mitótico maior que 5 por 50 campos de grande aumento
	Mitose atípicas
Capacidade de invasão tumoral	Invasão de estruturas venosas
	Invasão de estruturas sinusoidais

	Invasão da cápsula tumoral
Obs.: A cada item presente é somado um ponto ao escore.	
Escore de Weiss modificado (41)	
Avaliação objetiva	Critérios histopatológicos
Estrutura tumoral	Células claras compreendendo 25% ou menos do tumor
	Necrose
Estrutura celular	Índice mitótico maior que 5 por 50 campos de grande aumento
	Mitose atípicas
Capacidade de invasão tumoral	Invasão da cápsula tumoral
Obs.: Os itens células claras e índice mitótico quando presentes somam 2 pontos cada, e os demais apenas um ponto ao escore.	

*A presença de 3 ou mais pontos, no escore de Weiss ou no escore de Weiss modificado, define malignidade em adultos com neoplasias do córtex suprarrenal

1.2.2. Estadiamento e fatores prognósticos do CAC

O sistema de estadiamento amplamente utilizado para CAC foi proposto pela Rede ENSAT (Tabela 3).

O estadiamento é um importante fator prognóstico, pois apresenta relação com a sobrevida global conforme o estadio apresentado (sobrevida de 82% no estadio I, 61% no estadio II, 50% no estadio III e 13% no estadio IV) (7). Entretanto, a taxa de sobrevida global em 5 anos é variável conforme a extensão da doença, e a coorte estudada (3, 6-10).

Tabela 3 - Sistema de estadiamento ENSAT e ENSAT modificado (mENSAT+GRAS), de acordo com o sistema de estadiamento TNM de tumores malignos.

Estadiamento do CAC	
ENSAT (10)	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
Obs.: T1: tumor ≤ 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.	
mENSAT+GRAS (43)	TNM
I	T1, N0
II	T2, N0
III	T3-4, N0
IVa	T1-4, N2
IVb	T1-4, N3
IVc	T1-4, N>3

Obs.: T1: tumor ≤ 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; N: número de órgãos envolvidos pelo tumor (incluindo o tumor primário e o “N - linfonodos” como órgãos).

Os critérios GRAS (G: escore de Weiss ≥ 6 e/ou Ki67 $\geq 20\%$; R: *status* da ressecção do tumor primário; A: idade; S: sintomas relacionados ao tumor ou a secreção hormonal) são adicionados ao sistema mENSAT para refinar o estadiamento dos pacientes com escore III e IV (*para detalhes desse sistema: referência (44)*).

*TNM: sistema de estadiamento de neoplasias, que considera o “T”- tamanho e extensão do tumor primário, “N”- número de linfonodos acometidos pela neoplasia, e “M”- a presença de metástase.

Libe *et al.* refinaram o sistema de estadiamento ENSAT, ajustando os estadios III e IV conforme o grau tumoral, status da ressecção, idade ao diagnóstico e se há sintomas relacionados ao tumor. O estadio IV ainda foi categorizado conforme o número de sítios das metastases. Libe *et al.* demonstraram que esse refinamento, mENSAT+GRAS (modified ENSAT + Grade, R status, Age and Symptoms), apresentou uma melhor estratificação no prognóstico dos pacientes com CAC (estadio III apresentou sobrevida global em 5 anos de 50%, e estadio IVa: 15%, IVb: 14% e IVc de apenas 2%) (44).

A análise da porcentagem de células tumorais imunorreativas para o marcador de proliferação celular Ki67 representa o mais importante fator prognóstico para CAC (10, 13, 44-47). Recentemente, uma estratificação do Ki67 em grupos ($<10\%$, $\geq 10\%$ e $<20\%$ e $\geq 20\%$) foi definida e apresentou íntima relação com a sobrevida global e sobrevida livre de doença (45). Adicionalmente, um alto índice mitótico, necrose tumoral e figuras mitóticas atípicas têm sido associados com prognóstico desfavorável em pacientes adultos (48, 49).

O escore de Helsinki é um sistema desenvolvido para prever metástases nos casos de CAC. Ele é baseado na combinação de critérios morfológicos (índice mitótico e necrose tumoral) com parametro imunohistoquímico (marcador de proliferação Ki67). O escore é dado pela soma de tres pontos, quando o índice mitótico é $> 5/50$ em com de grande aumento, cinco pontos, quando há presença de necrose, e adicionado o valor absoluto do marcador Ki67 (50). Um escore maior de 8,5 sugere lesões malignas, com alta possibilidade de desenvolver metastases (sensibilidade de 100% e especificidade de 99,4%) (50).

Além dos sistemas de estadiamento, há outros fatores com valor prognóstico que podem determinar a agressividade do CAC. Esses fatores prognósticos são referentes a dados clínicos (idade, sintomas relacionados a produção hormonal, estadio tumoral), achados histológicos e alterações proteicas (escore de Weiss, escore de Weiss modificado, escore de Helsinki, índice mitótico, Ki67, SF-1, p53, beta-catenina, e ressecção tumoral -R1, R2 e RX), e a alterações moleculares (alterações cromossomais, alterações de metilação, perfil de expressão gênica, desregulação de microRNA e a presença de variantes alélicas patogênicas) (2, 3, 6, 8, 31, 40, 41, 43-45, 49-67).

O prognóstico do CAC em estadios avançados é muito limitado, o que indica a necessidade de tratamentos eficientes no seu manejo, além da ressecção cirúrgica, tratamento cirúrgico das metástases, tratamento local (radioterapia, radioablação e crioablação) e tratamento sistêmico com droga citotóxica (10, 68).

1.3.Tumor adrenal pediátrico (TAP)

A maioria dos pacientes pediátricos diagnosticados com TAP apresentam menos de 5 anos de idade (16, 29, 69), com uma alta frequência de casos até o terceiro ano de vida (69-71). Apesar de ser extremamente raro casos em fetos ou recém-nascidos , é provável a origem do TAP seja da zona fetal da glandula adrenal (72), o que justificaria a idade precoce de diagnóstico e a secreção hormonal androgênica predominante, causando síndrome virilizante (15, 20, 73, 74).

A síndrome virilizante é a apresentação clínica mais frequente dos pacientes com TAP, clinicamente identificada como puberdade precoce periférica (iso ou heterossexual), seguida da síndrome mista, caracterizada pela secreção de cortisol e andrógenos (16, 19, 20, 29, 74-77). A síndrome de Cushing isolada na população pediátrica é infrequente (15).

A esteroidogênese do TAP pode apresentar defeitos enzimáticos resultando no acúmulo de precursores, tais como: sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), 11-deoxicorticosterona, 17-hidroxi-progesterona e 11-desoxicortisol, e geralmente a presença desses precursores estão relacionados a um pior prognóstico da doença (17).

1.3.1. Avaliação diagnóstica e histopatológica do TAP

Para a avaliação diagnóstica dos casos pediátricos, Brondani e Fragoso adaptaram a avaliação diagnóstica da coorte adulta para os pacientes pediátricos (Tabela 4) (78).

Tabela 4 - Investigação diagnóstica de pacientes com possível TAP.

<i>Avaliação inicial para pacientes pediátricos (78)</i>	
Objetivo	Exame
Avaliar a secreção de cortisol	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de supressão com dexametasona <i>overnight</i> (1 milligrama de dexametasona se ≥ 40kg, ou 20 μg/kg de peso se < 40Kg) • Cortisol livre urinário 24h, quando possível (3 amostras consecutivas, e o resultado corrigido para superfície corporal)

	<ul style="list-style-type: none"> • Cortisol salivar coletado às 0h, quando possível • ACTH basal (plasmático) • Cortisol basal (sérico)
Avaliar a secreção sérica de esteroides sexuais e seus precursores	<ul style="list-style-type: none"> • DHEAS • 17-hidroxi-progesterona • Androstenediona • Testosterona / testosterona livre • 17-β-estradiol • 11-Desoxicortisol
Avaliar a secreção de mineralocorticoides	<ul style="list-style-type: none"> • Potássio • Relação Aldosterona/renina (apenas em pacientes com hipertensão arterial e/ou com hipocalemia)
Excluir feocromocitoma	<ul style="list-style-type: none"> • Metanefrinas plasmáticas
Avaliação de puberdade precoce central	<ul style="list-style-type: none"> • LH
Avaliação da massa adrenal e estadiamento.	<ul style="list-style-type: none"> • RM de abdome e pelve • TC de tórax • RM de encéfalo (em casos com a variante patogênica germinativa do <i>TP53</i> presente)

*TC: tomografia computadorizada; RM: ressonância magnética.

Além da hipersecreção hormonal que deve ser investigada e documentada, é sugerida a avaliação do eixo gonadotrófico para diagnóstico de puberdade precoce central, que pode ser desencadeada pelo tempo e concentração da exposição aos andógenos pelo hipotálamo (16, 78).

Na população pediátrica, o escore de Wienieke é amplamente utilizado para definição histológica como também fornece valor prognóstico agregado (Tabela 5) (14). A presença de 4 critérios no escore de Wienieke é capaz de prever tumores com comportamento mais agressivo, que devem ser seguidos com exames hormonais e de imagem com maior frequência (14, 74).

Tabela 5 - Escore de Wienieke para avaliação dos pacientes pediátricos com TAP.

<i>Escore de Wienieke (14)</i>
Peso tumoral maior que 400 gramas
Tamanho tumoral maior que 10,5 cm (na sua maior dimensão)
Extensão para tecidos peri-adrenais e/ou 30rgãos adjacentes
Invasão de veia cava inferior
Invasão venosa presente
Invasão capsular presente
Necrose tumoral
>15 mitoses/20 campos de grande aumento
Figuras mitóticas atípicas

Obs.: cada item soma 1 ponto ao escore. Se dois critérios positivos ou menos: TAP com comportamento benigno; Três critérios positivos: TAP com comportamento indefinido; Quatro critérios positivos ou mais: TAP com comportamento maligno.

Diferentemente do CAC em adultos, os TAP com histologia desfavorável apresentam evolução clínica favorável sem recorrência (11-14). Martins-Filho *et al.* demonstraram que um escore de Weiss ≥ 5 é capaz de prever comportamento maligno nos casos de TAP (46). Apesar da utilização do escore de Wieneke, Ki67, e escore de Weiss na diferenciação no comportamento biológico dos TAP, os critérios definitivos de malignidade considerados no grupo pediátrico ainda são a presença de invasão de tecidos e/ou órgãos adjacentes e/ou a presença de metástase a distância (14, 15).

Os critérios invasão de veia cava, presença de necrose e aumento da atividade mitótica sugerem comportamento mais agressivo de forma independente (14).

No grupo pediátrico, o marcador Ki67 possui valor na diferenciação entre adenomas e carcinomas, entretanto o ponto de corte é maior do que o usado no grupo adulto, acima de 15%, e corrobora com o escore de Wieneke (46, 79-83).

1.3.2. Estadiamento e fatores prognósticos do TAP

O estadiamento amplamente utilizado no grupo pediátrico com TAP é o proposto por MacFarlane (84) e modificado por Sullivan (12) (Tabela 6). Os estadios I e II são os que possuem as melhores taxas de cura quando realizada a ressecção cirúrgica (12). O grupo de Sandrini *et al.* (16) propuseram um sistema de estadiamento para os casos de TAP, que mais tarde foi modificado por Michalkiewicz *et al.* (29) e por Ribeiro *et al.* (85), e esse sistema se correlaciona com a sobrevida global (Tabela 6) (16, 29, 85).

Tabela 6 - Sistema de estadiamento MacFarlane e Sullivan, e sistema de Sandrini, Michalkiewicz e Ribeiro, para casos com TAP.

<i>Sistema de MacFarlane e Sullivan (12, 84)</i>			
Estadio	Tamanho tumoral	Linfonodos e invasão	Metástases
I	Tumores <=5cm	Sem linfonodos e sem invasão local	Ausência de metástases
II	Tumores >5cm		
III	Qualquer tamanho	Linfonodos <u>ou</u> invasão local	Presença de metástases
IV		Linfonodos <u>e</u> invasão local	
<i>Sistema de Sandrini, Michalkiewicz e Ribeiro (16, 29, 85)</i>			
Estadio		Descrição	
I		Tumor completamente ressecado	
		Tumores pequenos*	
		Dosagens hormonais normais no pós-operatório	
II		Tumor completamente ressecado	
		Tumores grandes*	
		Dosagens hormonais normais no pós-operatório	

III	Presença de resíduo tumoral micro ou macroscópico após ressecção cirúrgica. Tumor irressecável Rotura e extravasamento tumoral Pacientes com estadio I e II que apresentem dosagens hormonais alteradas no pós-operatório Pacientes com acometimento linfonodal retroperitoneal
IV	Presença de metástases

*Tumores pequenos: <100gramas e <200cm³; Tumores grandes: ≥100gramas ou ≥200 cm³.

Além desse sistemas de estadiamento, diferentes coortes publicaram que a presença de metástases ao diagnóstico, o índice mitótico elevado, a presença de necrose, a presença de mitoses atípicas, o nível de grau nuclear, um maior tamanho tumoral, presença de Ki67 > 15% e a presença de hipercortisolismo estiveram associados a um pior prognóstico (17, 29, 71, 74, 77, 78, 80, 86-88). Em contraste, idade menor que 4 anos, síndrome virilizante ao diagnóstico, doença localizada, ausência de rotura tumoral, e peso tumoral <200gramas, estiveram associados a uma melhor evolução da doença (14, 17, 29, 71, 74, 77, 86). No Brasil, a variante patogênica germinativa p.R337H do *TP53* não é preditora de desfecho no grupo pediátrico, diferente do que é visto no grupo adulto (22, 89, 90).

1.4.Tratamento do CAC e TAP

A ressecção cirúrgica é o tratamento de escolha para CAC e TAP, uma vez que a ressecção completa é a única opção disponível que pode curar ou prolongar a sobrevida, principalmente nos estádios iniciais da doença (Apêndice A e Apêndice B) (10, 19). Por isso deve ser considerada para todos os pacientes e quando houver suspeita de tumores aderentes ou com invasão de estruturas adjacentes, a excisão em bloco deve ser feita (19, 77). Caso na evolução ocorra metástases isoladas ou recorrência local, uma nova ressecção cirúrgica deve ser sempre considerada (19). Berruti *et al.* demonstraram em coorte de CAC que o uso agressivo de cirurgias para tratar as recorrências está associado ao aumento na sobrevida dos pacientes (91).

Embora a ressecção completa seja considerada um fator prognóstico importante, a realização da cirurgia de forma radical não previne a recorrência da doença (6, 7, 91, 92), e nesse cenário o tratamento medicamentoso ganha importância. As opções terapêuticas disponíveis para o tratamento do CAC e TAP, com comportamento maligno, são limitadas, e a raridade da doença associada a sua agressividade colaboram para esse cenário (93, 94). O mitotane é um medicamento derivado do inseticida diclorodifenil-tricloroetano (DDT), usado

há mais de 50 anos no tratamento de CAC (95). Seu mecanismo de ação impacta na respiração celular e na esteroidogênese adrenal, contribuindo para o seu efeito adrenolítico (93).

Berruti *et al.* demonstraram o benefício do uso de mitotane no CAC impactando na sobrevida global e sobrevida livre de recorrência, e ainda confirmaram que o efeito antineoplásico da droga é independente do perfil de secreção tumoral (91). Terzolo *et al.* definiram o alvo da concentração sérica terapêutica de mitotane (14mg/L), demonstrando a queda no risco de recorrência nos pacientes que atingiram esse alvo (96). O mitotane está indicado no tratamento adjuvante e no tratamento paliativo de pacientes adultos, enquanto que para crianças sua indicação está restrita aos pacientes que apresentam metastases.

Em relação a quimioterapia o protocolo EDP (etoposídeo, doxorubicina e cisplatina) + mitotane é considerado a primeira escolha como quimioterapia para casos de CAC em estágio avançado, apresenta melhor sobrevida livre de progressão e sobrevida global, embora uma alta taxa de desfecho fatal tenha ocorrido no estudo (9).

Alguns medicamentos, como cetoconazol, metirapona e mifepristone, são utilizados na tentativa de diminuir a produção de cortisol e morbimortalidade associada, em casos de CAC inoperáveis (97). A radioterapia é uma opção de tratamento em CAC restrito a casos julgados como alto risco para recorrência local, quando o procedimento cirúrgico não foi capaz de assegurar margens de segurança livre de neoplasia, ou não há possibilidade de nova abordagem cirúrgica no local quando há restos tumorais. A radioterapia é uma estratégia utilizada para diminuir recorrência local, embora o benefício na sobrevida global dos pacientes seja controverso (3, 98-101).

Terapêutica direcionada a alvos moleculares tem sido desenvolvidas, uma vez que mais da metade dos pacientes com CAC se apresentam com doença localmente avançada ou doença metastática (62). Estudos clínicos com terapia direcionada a alvos moleculares tem sido desenvolvidos, tanto com pacientes com CAC e TAP, porém os resultados preliminares divulgados são da fase 2 e nenhum, até o momento, apresentou impacto na sobrevida dos pacientes (102-108). Há doze estudos clínicos abertos (com os medicamentos cabazitaxel, cabozantinibe, droga biológica EO2401, cisplatina e tiosulfato de sódio, nivolumabe, ipilimumabe e pembrolizumabe) em fase de recrutamento (109).

1.5.Bases moleculares

Os estudos moleculares envolvendo tumores adrenocorticais levaram ao refinamento da taxonomia deste tumor e ofereceram ampla oportunidade para a descoberta de novas vias

moleculares envolvidas na tumorigenese adrenal e de novos biomarcadores do CAC. Esses resultados podem servir para o desenvolvimento de novas terapias direcionadas ao alvo molecular para o tratamento do CAC.

Três grandes estudos (63, 64, 110) usando a combinação de sequenciamento genômico, sequenciamento exômico, avaliação do número de cópias de DNA, expressão de RNAm e de miRNAs, análise do perfil de metilação e perfil de transcriptoma em tecidos tumorais de CAC e TAP, histologicamente confirmados, permitiram uma visão global molecular desses tumores. Entre os achados, os genes *ATRX* e *ZNRF3*, em suas distintas vias, foram implicados pela primeira vez na tumorigênese adrenal (63, 64, 110). Entretanto, esses genes ainda não foram avaliados na população brasileira de pacientes, com CAC ou TAP, onde a frequência da variante patogênica germinativa p.R337H no *TP53* é considerável (10% em adultos e 70-90% em pacientes pediátricos).

1.5.1. *ATRX* e seu papel na tumorigênese

O gene *ATRX* está localizado no cromossomo Xq21.1, apresenta 36 exons e possui tamanho, de aproximadamente, 300kb (111, 112). Esse gene codifica uma proteína, remodeladora da cromatina que atua na estabilidade do nucleossomo, replicação do DNA, transcrição, manutenção da estrutura e estabilidade do telômero e da heterocromatina (113-117). O gene *ATRX* ainda compartilha com o gene *DAXX* a função de incorporar a variante da histona H3.3 na cromatina (115, 117-119) (Ilustração 1).

Os telômeros, localizados no final dos cromossomos, são responsáveis por proteger o DNA celular e manter sua estabilidade (123). Por inibir a fusão ponta a ponta que ocorre como consequência natural do processo de reparo, os telômeros evitam a senescência celular (120, 124). O comprimento e a taxa de encurtamento telomérico são indicadores da idade celular mitótica, uma vez que durante as divisões celulares é esperado ocorrer um encurtamento dos telômeros, devido a um efeito direto da maquinaria de replicação do DNA (123, 125, 126). Quando o encurtamento alcança um ponto crítico, as células entram num estado quiescente/senescente, a fim de evitar danos ao DNA, e esse efeito natural é considerado um mecanismo de supressão tumoral (120, 127). O desenvolvimento das neoplasias está associado a um sistema de manutenção do comprimento dos telômeros, que provem uma infinita fonte de oligonucleotídeos de DNA aos telômeros, evitando a senescência e a apoptose, proporcionando a imortalidade celular (113, 123). Esse sistema de manutenção é considerado um importante passo na tumorigenese (118).

Ilustração 1. Figura esquemática da função do *ATRX*, na via ALT

* Ilustração 1-A: Ilustração esquemática da diminuição telomérica a cada divisão celular, e seus possíveis resultados, incluindo a perda da função do gene *ATRX*. Ilustração 1-B: Ilustração evidenciando as regiões de heterocromatina dependentes da ação da histona H3.3, mediada via DAXX e ATRX. ALT: via alternativa de alongamento dos telômeros (*alternative lengthening of telomeres*); DAXX: proteína DAXX (*Death domain associated protein*); H3.3 e H3.1/2: histonas envolvidas na via; H3K4me0 e H3K9me3: histonas não metiladas.

Adaptação das referências:(120-123).

A telomerase é uma transcriptase reversa que adiciona oligonucleotídeos de DNA aos telômeros a fim de manter seu comprimento (128-130), sua atividade foi descoberta em 1985, em um organismo de célula única *Tetrahymena* (128). A telomerase foi descrita como um marcador quase universal de cancer humano em estadios avançados (131, 132), pois a maioria das neoplasias malignas (85-90%) expressa constitutivamente telomerase, embora apresentem telômeros mais curtos (131, 132). Do restante 10-15%, a maioria das neoplasias malignas é capaz de manter o comprimento do telômero na ausência de telomerase, pelo mecanismo ALT (123, 133). Entretanto, a via ALT, ainda, não possui sua base molecular totalmente elucidada (123, 133, 134).

Variantes patogênicas germinativas do gene *ATRX* são relacionados a uma síndrome rara que se caracteriza por retardo mental e alfa-talassemia, denominada síndrome ATR-X (Alpha

Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked - ATRX) (119, 135-137). Racionaliza-se que ambas as cópias do gene estão inativas, uma pela variante patogênica e outra pela inativação do cromossomo X (138). As variantes patogênicas no ATRX produzem uma proteína truncada, o que resulta na diminuição da sua expressão proteica (121). A identificação do envolvimento do gene ATRX com o desenvolvimento de neoplasias foi vista, inicialmente, no seguimento de pacientes com síndrome mielodisplásica associada a alfa-talassemia. Os pacientes que apresentavam perda da função do ATRX, devido a variantes patogênicas somáticas, evoluíram com quadro hematológico mais grave e, alguns casos desenvolveram leucemia (139).

Em 2012, Lovejoy *et al.* (133) analisando linhas celulares de fibroblastos humanos, e linhas celulares derivadas de tumores (osteossarcoma e adenocarcinoma pulmonar), evidenciaram a perda da expressão do ATRX em 90% das linhas celulares imortalizadas, cultivadas *in vitro*, que usavam a via ALT para alongamento dos telômeros. Eles sugeriram que a inativação do ATRX é o principal passo para a geração do fenótipo ALT (133).

Barthel *et al.* (140) ao estudarem mais de 18.000 amostras provenientes de 9.127 pacientes (tumor, n=9065, sangue, n=7643, e tecido não-tumoral, n=1722 amostras) abrangendo um total de 31 diferentes tipos de neoplasias malignas, demonstraram que o comprimento dos telômeros foram menores em tecidos neoplásicos do que em tecidos controles, como já descrito anteriormente (131, 132). Entretanto, observaram que alterações patogênicas nos genes *ATRX* e *TP53* tiveram associação com o relativo aumento do tamanho dos telômeros (140).

Várias coortes de diversas neoplasias foram estudadas, e nelas foi confirmado a participação do ATRX no processo da tumorigênese, assim como na determinação do prognóstico (65, 133, 138, 141-168).

Pinto *et al.* (110), em sua coorte de pacientes com TAP, utilizando o sequenciamento de nova geração, identificaram alterações patogênicas (variantes nonsense ou deleção de exons) no ATRX em 32% dos casos. Os casos que apresentaram alterações no ATRX estiveram associados a presença da variante patogênica germinativa do *TP53* e ao alongamento dos telômeros via ALT. A presença de alterações no ATRX, juntamente com a variante patogênica germinativa do *TP53*, apresentaram relação com estádios mais avançados da doença e a um maior peso tumoral (110).

A presença de variantes alélicas patogênicas no gene ATRX, que apresentaram perda de função, estão relacionadas ao processo de tumorigênese, via ALT, e estão associadas a estádios avançados e pior comportamento biológico tumoral como evidenciado nos estudos supracitados. De acordo com a recente associação com a tumorigênese adrenocortical, nos

propomos a investigar em nossa coorte de crianças, com TAP e de adultos, com CAC, associados ou não a variantes patogênicas germinativas do *TP53*, as alterações no número de cópias no gene *ATRX*, e avaliar a sua expressão gênica e proteica .

1.5.2. *ZNRF3* e seu papel na tumorigênese

As neoplasias geralmente apresentam defeitos em vias conservadas durante a evolução, que regulam o desenvolvimento embrionário e a homeostase celular em tecidos adultos; e a via Wnt / β -catenina é um clássico exemplo deste fenômeno (169-173).

A sinalização Wnt / β -catenina é responsável pelo desenvolvimento embrionário, pela proliferação e migração celular, a pela regulação de células tronco e a melanogênese (Ilustração 2) (174-178).

A ligação da proteína Wnt com os receptores Fz e LRP5/6 de membrana desencadeia a multimerização dos receptores na superfície celular dando início a cascata de sinalização Wnt / β -catenina. Alterações nos fatores participantes dessa via resultam em diferentes expressões gênicas pela regulação direta da quantidade de β -catenina disponível (179). A regulação também é influenciada pelas modificações pós-translacionais (MPTs), como as reações de fosforilação, ubiquitinação e deubiquitinação (180).

Na ausência da proteína Wnt, a β -catenina é fosforilada pelos fatores CK1 e GSK3, e é ubiquitinada através da ligação do fator b-Trcp e, subsequentemente, degradada pelo sistema celular proteossomo (181, 182). Os outros fatores envolvidos na via também sofrem ubiquitinação por vários tipos de E3 ligase. O receptor Fz e LRP5/6 na superfície celular são regulados pelo processo de ubiquitinação, pelas proteínas ubiquitina E3 ligase ZNRF3 e RNF43 (179). O receptor LRP5/6 é conhecido por ser um fator promotor da tumorigênese (183, 184). As proteínas ZNRF3 e RNF43 são consideradas reguladores negativos da via de sinalização Wnt / β -catenina, e por sua vez são antagonizadas pelas proteínas R-Spondinas (RSPO) 2-4 (185). A regulação dos receptores Fz e LRP5/6 pela ação das proteínas ZNRF3, RNF43 e RSPO aumenta a sensibilidade dos receptores de membrana Wnt, promovendo a sinalização da via, mesmo em condições de baixa disponibilidade de Wnt (186). A ubiquitinação do Fz é então regulada pela ligação das proteínas RSPO aos membros da família de receptor acoplados a proteína G Rhodopsina (LGR4/5)(179). A ligação da RSPO, LGR4/5 e ZNRF3/RNF43 através do domínio Furin desencadeia a auto ubiquitinação e clearance do ZNRF3/RNF43, o que por sua vez, ativa a via Wnt/Beta-catenina (187, 188).

Ilustração 2. Figura esquemática da via de sinalização Wnt / β -catenina.

*Ilustração simplificada da via canônica da sinalização Wnt / β -catenina. A via é caracterizada pela participação de vários receptores e ligantes intermediários até a sinalização final da via que age no núcleo celular, promovendo expressão gênica.

Ilustração a esquerda: via Wnt / β -catenina inativada - sem a proteína Wnt, a β -catenina é fosforilada pelos complexos de destruição que inclui os fatores Axin, CK1, GSK3 e APC, e culmina na degradação final da β -catenina via proteossomo e inibição da expressão de genes alvo da via. Ilustração a direita: via Wnt / β -catenina ativada - através da ligação de proteínas Wnt ao complexo LRP5,6/RSPO/Frizzled, o complexo de destruição se liga a esse complexo-receptor de membrana acoplado a proteína Wnt, evitando a fosforilação e ubiquitinação da β -catenina e facilitando a sua entrega ao núcleo. No núcleo, a β -catenina se liga ao TCF e estimula a expressão gênica.

LRP5/6: receptor de membrana (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*); Frizzled: receptor de membrana; Dvl: fator *disheveled*, β -catenin: beta-catenina; GSK3: fator *glycogen synthase kinase 3*; CK1: fator *casein kinase 1*; APC: fator *adenomatous polyposis coli*; TCF/LEF: complexo de ligação *DNA-bound T-cell factor/lymphoid enhanced factor*.

Adaptação da referência (179).

O gene *CTNNB1* codifica a β -catenina, e é um importante regulador da via de sinalização. Variantes patogênicas no exon 3 do gene *CTNNB1* desencadeia uma atividade alterada da β -catenina levando a tumorigênese em diversas neoplasias como adrenal, coloretal, fígado, pele e ovariana (186).

O gene *ZNRF3* ("Zinc and ring finger 3") está localizado no cromossomo 22q12.1 (189). O *ZNRF3* codifica a proteína ubiquitina ligase transmembrana E3 de superfície celular, que atua como um regulador negativo da via Wnt/Beta-catenina (187, 188, 190). Devido a essa função, o gene *ZNRF3* é considerado um novo supressor tumoral (63, 190, 191). Estudos envolvendo transcriptoma de CAC demonstraram que as alterações patogênicas no *ZNRF3* resultam na ativação dos alvos da via Wnt/Beta-catenina. Porém, quando essa ativação é comparada a resultante das alterações do *CTNNB1* ela ocorre de forma menos agressiva (63).

Variantes patogênicas somáticas, inativadoras de função, e as deleções em homozigose do *ZNRF3* induzem a ativação da via Wnt/Beta-catenina por manter a estabilidade da β -catenina (63). Várias coortes, de diferentes neoplasias, relataram o papel do *ZNRF3* no processo da tumorigênese e seu valor prognóstico associado (190, 192-199).

Até o momento o CAC é a neoplasia com maior frequência de alterações no *ZNRF3*, maioria das alterações são deleções em homozigose, o que sugere um mecanismo específico na tumorigênese da glândula suprarrenal (63). Basham *et al.* (200) em seu estudo funcional, utilizando ratos, evidenciaram um gradiente da via sinalizadora Wnt/Beta catenina no córtex adrenal, e mostraram que o *ZNRF3* é necessário para manter esse gradiente e a homeostase adrenal, além de ser essencial para manutenção da renovação e diferenciação zonal das células do córtex adrenal. Nesse estudo, a perda de função do *ZNRF3* esteve associado a um estímulo importante na via da Wnt/beta-catenina, induzindo a proliferação e hiperplasia adrenocortical (200).

No estudo de Pinto *et al.* (110) envolvendo apenas pacientes pediátricos com TAP, as variantes patogênicas no *ZNRF3* não foram encontradas, sendo apenas identificadas as variantes no *CTNNB1*, relacionada a via Wnt/Beta-catenina. Assié *et al.* observaram em sua coorte, com 122 pacientes adultos com CAC, que as alterações patogênicas no *ZNRF3* foram responsáveis pela maior frequência de alteração genética, correspondendo a 21% de sua coorte, e em sua maioria eram deleções em homozigose (63).

Tendo em vista os novos estudos relacionados a ação do *ZNRF3*, e do *ATRX*, nos propusemos a avaliar o número de cópias, a expressão gênica e proteica dos genes *ZNRF3* e *ATRX* nas coortes de pacientes pediátricos, com TAP, e de pacientes adultos, com CAC, associados ou não a variante patogênica germinativa p.R337H-TP53.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo específico

- Avaliar as alterações no número de cópias dos genes *ATRX* e do *ZNRF3*, e suas expressões gênica e proteica, numa coorte adulta e pediátrica, com CAC e com TAP, respectivamente.

2.2. Objetivos secundários

- Definir o valor prognóstico das alterações moleculares e expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3*.
- Correlacionar os resultados moleculares e expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* com as características clínicas e hormonais e com a sobrevida global dos pacientes.
- Correlacionar os resultados moleculares e expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* com a imunorreatividade do Ki67 e a presença da variante patogênica germinativa p.R337H-*TP53*.

3 MÉTODOS

3.1.Considerações éticas

Esse projeto foi submetido à Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq, da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e aprovado, sob o número: 2.394.934/2017. O termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) e o termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) utilizados nesse estudo foram lidos e assinados pelos pacientes ou seus responsáveis legais (Apêndice C).

O estudo, com caráter retrospectivo e prospectivo, foi desenvolvido no Ambulatório da Unidade de Suprarrenal (Unidade A1MN 1105), no HCFMUSP. As consultas e seguimento dos pacientes ocorreram neste ambulatório. As avaliações hormonais e os estudos moleculares dos pacientes envolvidos foram realizados no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular/LIM 42, no HCFMUSP. O estudo imunohistoquímico das peças tumorais foi realizado na Divisão de Anatomia Patológica do HCFMUSP.

3.2.Casuística

Formaram a amostra deste estudo 119 carcinomas adrenocorticais (CAC) de pacientes adultos e 68 tumores adrenais pediátricos (TAP).

Todos os pacientes, adultos ou pediátricos de ambos os sexos, foram operados pela equipe do Serviço de Urologia do HCFMUSP, ou operados em serviços externos, mas que, após a cirurgia, foram encaminhados para acompanhamento e seguimento pela equipe do Ambulatório da Unidade da Suprarrenal, no período entre 1979 e 2019. As lâminas histológicas e respectivos blocos de parafina foram levantados e reavaliados compondo 82 CAC e 52 TAP. Os tecidos tumorais, armazenados em nitrogênio líquido, 37 CAC e de 16 TAP, foram selecionados para realização dos estudos moleculares.

Os relatórios anatomopatológicos foram recuperados e o diagnóstico histológico de CAC ou TAP foram revisados e confirmados em todos os casos. Dados da apresentação e evolução clínica, os dados laboratoriais e de imagem foram extraídos do prontuário médico.

Os casos que apresentavam prontuário incompleto para coleta de dados, que prejudicassem a análise estatística; ou casos com lâminas histológicas com imunocoloração final com perda de campo, que comprometesse o resultado final; ou casos que apresentavam DNA e/ou RNA extraídos de baixa qualidade que prejudicasse os estudos moleculares foram excluídos do estudo.

A análise genética dos genes *TP53* e *CTNNB1* foi realizada previamente nesta coorte, e os resultados foram recuperados para correlação com os marcadores estudados neste projeto de tese.

3.2.1. Tecidos tumorais submetidos a análise molecular

Da coorte total, tivemos acesso a uma amostra de 53 tecidos tumorais (37 CAC e 16 TAP) armazenados em nitrogênio líquido para realização das técnicas moleculares. Essa população foi submetida a análise do número de cópias dos genes *ATRX* e *ZNRF3*, utilizando a técnica de Amplificação de Sonda Multiplex Ligação-dependente (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification/MLPA®), e ao estudo da expressão gênica de ambos os genes, por reação de PCR em tempo real (RT-qPCR).

Por se tratar de um estudo de uma doença rara, essa população de pacientes foi considerada amostra de conveniência, o que dispensa a necessidade de cálculo de amostragem.

Foram excluídos os casos que apresentavam DNA e/ou RNA extraídos com baixa qualidade que prejudicasse as técnicas mencionadas. Logo, para a técnica de MLPA tivemos a coorte final de 37 CAC e 16 TAP, e para a técnica de RT-qPCR tivemos 22 CAC e 8 TAP (Apêndice D).

3.2.2. Tecidos tumorais submetidos ao estudo imunohistoquímico

Da coorte total, tivemos acesso a uma amostra de 134 tecidos tumorais (82 CAC e 52 TAP) cujos blocos de parafinas foram recuperados para a construção de três micromatrizes teciduais (tissue microarray - TMA). O TMA caracteriza-se pela construção de um bloco de parafina contendo fragmentos cilíndricos de amostras tumorais obtidas de dezenas ou centenas de blocos de parafina originais, o que favorece o estudo de vários casos simultaneamente (201, 202). O seu uso agiliza a validação do estudo da expressão proteica por ser um instrumento de rápida obtenção de dados a respeito de uma população tumoral, além de favorecer a uniformidade das condições experimentais (203, 204). Lâminas histológicas foram obtidas a partir dos blocos de TMAs e foram utilizadas para a realização da técnica de imunohistoquímica (IHQ) neste estudo.

A população do estudo imunohistoquímico foi submetida a análise da expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3*, utilizando a técnica de imunohistoquímica. Para complementação do estudo, o marcador de proliferação Ki67 e a localização da expressão proteica da beta-catenina também foram avaliados.

Foram excluídos os casos que apresentavam perda tecidual que prejudicasse o análise final da imunocoloração (2 casos – 1,62%).

3.2.3. Variáveis analisadas

A coorte de tumores para análise molecular e para análise imunohistoquímica foram submetidas a mesma coleta de dados. Dados referentes ao perfil epidemiológico dos pacientes (gênero e idade), a apresentação e evolução clínica (síndrome clínica ao diagnóstico, presença de metástase, estadiamento inicial da doença e sobrevida global) foram coletados. Dados laboratoriais e hormonais (cortisol em urina de 24 horas, cortisol sérico após 1mg de dexametasona overnight, cortisol salivar a meia-noite, ACHT basal, cortisol basal coletado às 8h, SDHEA, androstenediona, testosterona, estradiol, FSH, LH, Inibina, 11-deoxicortisol, 17-hidroxiprogesterona) e dados genéticos (análise genética dos genes *TP53* e *CTNNB1*) foram revistos. Dados referentes a peça tumoral, lateralização, escore de Weiss e Weiss modificado e o marcador de proliferação Ki67 foram levantados. Os escores de Helsinki e de Wieneke (para TAP) foram calculados. Escore de estadiamento de doença ENSAT, para CAC, e MacFarlane, para TAP, foram verificados quando os dados estavam disponíveis. 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 (em meses) e a evolução para óbito decorrente do CAC. A data do último seguimento foi considerada para a análise do tempo de sobrevida global.

3.3. Extração de DNA e RNA

Os tecidos tumorais, obtidos durante o procedimento cirúrgico habitual, estavam armazenados em nitrogênio líquido até o momento da extração do material genético. A extração de DNA e RNA foi realizada no laboratório LIM42-HCFMUSP, utilizando o produto comercial AllPrep DNA/RNA Mini Kit (ID:80204, Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme protocolo (Anexo 1). As amostras de RNA foram tratadas com DNase utilizando procedimento padrão.

A verificação da qualidade e quantidade do material genético foi realizado utilizando o espectrofotômetro (NanoDrop) e a eletroforese em gel de agarose. As concentrações foram determinadas no espectrofotômetro, técnica que permite determinar a quantidade e a pureza de uma amostra de DNA com a atenção a potenciais contaminantes incluindo proteínas (205). A

relação de absorbância A260/280, dada pelo espectofotometro, determina a pureza da amostra de DNA, e uma relação A260/280 maior que 1,8 é considerada indicador de pureza do DNA (205, 206). A relação A260/280 maior que 1,8 foi utilizado como referência para as amostras nesse estudo.

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para fornecer uma informação qualitativa da integridade do DNA, sendo possível distinguir entre um DNA intacto de um DNA fragmentado (206). Um DNA intacto aparece como uma banda compacta de alto peso molecular, enquanto que um DNA fragmentado resulta numa mancha alongada de DNA na eletroforese (Ilustração 3).

Ilustração 3. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1% identificando bandas de DNA. Fotografia de eletroforese em gel de agarose demonstrando os poços ocupados por DNA (1-8 e 10-15) ou marcador de peso molecular (9 e 16). Nos poços 9 e 16 foi pipetado 1 mL do marcador de peso molecular Lambda DNA (*Lambda DNA/HindIII Marker – ThermoFisher*). Os poços 7 e 13 evidenciam DNA de baixa qualidade, fragmentado. Demais poços apresentam DNA intacto que foram utilizados na reações de MLPA. *Os poços 5 e 14 mostram DNA intactos, porém com sinal de baixa concentração. Para esses DNAs (5 e 14) foi optado uma nova extração.

Fonte: Arquivo dessa tese.

3.4. Síntese de DNA complementar

O DNA complementar (cDNA) foi sintetizado por transcrição reversa (RT) utilizando-se o produto comercial High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (ThermoFisher Scientific Baltics UAB, Vilnius, Lituania). A técnica orientada pelo fornecedor foi utilizada, na qual 2mcg

de RNA total é utilizado para uma reação resultante em 20mcL de cDNA (Anexo 2). O cDNA sintetizado foi utilizado para as reações de RT-qPCR.

3.5.Ligação multiplex dependente de amplificação de sonda (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification - MLPA)

A técnica de MLPA (207) foi utilizada para avaliação do número de cópias dos genes *ATRX* e *ZNR3*. Essa técnica é padronizada para a determinação do número de cópias de genes, e apresenta como vantagem a possibilidade de avaliação de até 60 sequências de DNA numa única reação, e cada experimento podendo avaliar até 96 amostras simultaneamente, favorecendo o tempo e custo do estudo.

O experimento MLPA é realizado em 5 etapas (Anexo 3). Durante a primeira etapa, o DNA é desnaturado por 5 minutos, a 98°C num termociclador, e após é incubado com a mistura de sondas predeterminadas do ensaio comercial do MLPA durante 16 horas (primeiro minuto a 95°C, e as próximas 16 horas a 60°C). As sondas do MLPA consistem de dois oligonucleotídeos com sequência correspondente a sequência alvo mas separados por uma única base. As sondas hibridizam a sequência alvo e posteriormente são unidas através da ação enzimática de uma ligase. A reação de ligação é realizada também no termociclador, num ciclo de 15 minutos a 54°C, seguidos de 5 minutos a 98°C, e quando finalizada a reação a temperatura estabiliza em 20°C. Após a reação de ligação, as sondas são amplificadas numa reação em cadeia de polimerase (Polymerase chain reaction – PCR), onde é adicionado ao tubos, das sondas ligadas, a solução de primers de PCR e a solução de polimerase. A reação de PCR retorna ao termociclador para completar 35 ciclos de 30 segundos a 95°C, 30 segundos a 60°C e 60segundos a 72°C; e então 20 minutos a 72°C. Os produtos da amplificação são separados usando eletroforese capilar, e apenas as sondas que foram ligadas irão gerar um sinal durante a eletroforese capilar. (207, 208).

Para a realização da técnica, adquirimos um controle positivo para a deleção do gene *ATRX*, o qual foi gentilmente cedido pela Dra Emilia Modolo Pinto (St. Jude Children's Research Hospital - Memphis, Estados Unidos). Infelizmente, não tivemos controle positivo para deleção do gene *ZNR3*. Os controles negativos para ambos os genes foram amostras de DNA de pacientes masculino e feminino, sem alterações nos genes estudados, provenientes do banco de DNA do laboratório LIM42-HCFMUSP.

3.5.1. MLPA – Gene *ATRX*

O número de cópias do gene *ATRX* foi avaliado utilizando-se o ensaio comercial “SALSA MLPA probemix P013-A2 *ATRX*” (MRC-Holland Amsterdam, Holanda). Este ensaio comercial contém um total de 46 sondas de MLPA, e estão inclusas: 37 sondas para o gene *ATRX*, sendo uma para cada exon e duas sondas para os exons 9 e 35, e 9 sondas de referência para detecção de diferentes regiões no cromossomo X. Este probemix contém ainda 9 fragmentos de controle de qualidade sendo 4 fragmentos para quantidade de DNA (Q-fragments), 2 fragmentos para DNA desnaturado (D-fragments), um fragmento de referência, um fragmento específico para o cromossomo X e um específico para o cromossomo Y (207). Ao analisar o padrão de amplificação das sondas notamos que as deleções da sequência de reconhecimento da sonda no cromossomo X resultam em uma ausência completa do produto de amplificação correspondente nos pacientes masculinos, enquanto que os pacientes femininos heterozigotos serão reconhecidos por uma redução de 35-50% na altura relativa do pico no diagrama (Tabela 7, Apêndice E). Cabe ressaltar que uma variante patogênica ou polimorfismo na sequência detectada por uma sonda também pode causar uma redução na altura relativa do pico, mesmo quando não localizada exatamente no local de ligação (207).

Tabela 7 - Tabela referência para análise do número de cópias do gene *ATRX*.

<i>Avaliação do número de cópias (207)</i>	
Alteração identificada	Coefficiente de dosagem - DQ
<i>Amostra masculina estudada versus amostra masculina referência</i>	
Normal	$0.8 < DQ < 1.20$
Deleção em homozigose	$DQ = 0$
Duplicação	$1.65 < DQ < 2.25$
Número de cópias ambíguo	Todos os outros valores
<i>Amostra feminina estudada versus amostra feminina referência</i>	
Normal	$0.8 < DQ < 1.20$
Deleção em homozigose	$DQ = 0$
Deleção em heterozigose	$0.4 < DQ < 0.65$
Duplicação em heterozigose	$1.3 < DQ < 1.65$
Triplicação em heterozigose/Duplicação em homozigose	$1.75 < DQ < 2.15$
Número de cópias ambíguo	Todos os outros valores

3.5.2. MLPA – Gene *ZNRF3*

A avaliação no número de cópias do gene *ZNRF3* foi realizada utilizando o ensaio comercial “SALSA MLPA probemix P476 *ZNRF3*” (MRC-Holland Amsterdam, Holanda). Este ensaio

comercial contam 42 sondas de MLPA que incluem: 15 sondas para o gene *ZNRF3*, 4 sondas flanqueadoras para genes upstream e 5 sondas flanqueadoras para genes downstream. Também estão incluídas outras 18 sondas de referências que tem como alvo regiões relativamente estáveis de número de cópias descritos em vários tipos de neoplasias, como o próprio CAC (208). Este ensaio contém 9 fragmentos de controle de qualidade sendo 4 fragmentos para quantidade de DNA, 2 fragmentos para DNA desnaturado, um fragmento de referência, um fragmento específico para o cromossomo X e um específico para o cromossomo Y. A interpretação do MLPA é feita através da análise do coeficiente de dosagem (DQ) das sondas, que interpreta os resultados para os cromossomos autossômicos ou pseudo-autossômicos (208) (Tabela 8, Apêndice E).

Tabela 8 - Tabela referência para análise do número de cópias do gene *ZNRF3*.

<i>Avaliação do número de cópias (208)</i>	
Alteração identificada	Coeficiente de dosagem - DQ
Normal	$0.8 < DQ < 1.20$
Deleção em homozigose	$DQ = 0$
Deleção em heterozigose	$0.4 < DQ < 0.65$
Duplicação em heterozigose	$1.3 < DQ < 1.65$
Triplicação em heterozigose/Duplicação em homozigose	$1.75 < DQ < 2.15$
Número de cópias ambíguo	Todos os outros valores

3.6. PCR quantitativa em tempo real

PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) é considerada uma técnica sensível para avaliação da expressão gênica pois permite medir a amplificação da PCR assim que a mesma ocorre (209-211).

A realização da RT-qPCR requer um experimento de validação prévio, com realização de curvas de diluição dos genes alvo (*ATRX* e *ZNRF3*) e dos genes endógenos (*GUSB*, *CYC-A* e *ACTB*) a fim de demonstrar que a eficiência de amplificação seja próxima a 100%, conforme sugere o fabricante. Para isso diluições progressivas de amostras de cDNA (variando a concentração de 100 a 0,008 ng/μl) foram estabelecidas com a finalidade de demonstrar uma diferença entre as diluições de um ciclo (*Ct*). O experimento de validação foi realizado com os genes alvos e os genes endógenos amplificados em reações em singleplex (oligonucleotídeos e sondas do gene alvo e endógeno em poços distintos).

Após a realização do experimento de validação, a concentração de 4ng/μl de cDNA foi estabelecida como padrão para este estudo. Os genes endógenos eleitos foram previamente validados em estudos de tecidos de CAC (212, 213). O gene *ACTB* foi excluído como controle por não apresentar resultados satisfatórios no procedimento de validação.

A quantificação do cDNA foi realizada no aparelho AriaMx (Agilent, Santa Clara, Califórnia, EUA) utilizando-se ensaios 5' nuclease do sistema Taqman (Applied Biosystems). Os ensaios Taqman para os genes alvo *ATRX* e *ZNRF3* (*ATRX* - Hs00997529_m1; *ZNRF3* - Hs00393094_m1) e para os genes endógenos eleitos (β -glicuronidase, *GUSB* - Hs 99999908_m1; ciclofilina A, *CYC-A* - Hu_4326316E; β -actina, *ACTB* - Hs 99999903_m1) foram adquiridos da ThermoFisher (Tabela 9). Os ensaios contém oligonucleotídeos iniciadores exônicos e sondas específicas interexônicas para o fragmento amplificado, que garantem a amplificação exclusiva de cDNA. As sondas do gene alvo foram marcadas com a fluorescência FAM, enquanto que as sondas dos genes endógenos, *GUSB*, *CYC-A* e *ACTB*, foram marcadas com a fluorescência VIC, conforme orienta o protocolo do fabricante (211, 214).

Tabela 9 - Caracterização dos genes utilizados no experimento.

Gene	Nome	Função	Ensaio Taqman
<i>ATRX</i>	Alpha Thalassemia/ Mental Retardation Syndrome X-Linked	Remodelador da cromatina	Hs00997529_m1
<i>ZNRF3</i>	Zinc and ring finger 3	Regulador negativo da via da beta-catenina	Hs00393094_m1
<i>ACTB</i>	β -actina	Proteína estrutural citoesquelética	Hs 99999903_m1
<i>CYC-A</i>	Ciclofilina A	Catalisa a isomerização cis-trans de ligações peptídicas	Hu_4326316E
<i>GUSB</i>	β -glicuronidase	Codifica uma hidrolase que degrada glicosaminoglicanas	Hs 99999908_m1

As reações de RT-qPCR foram realizadas em triplicatas, com um volume final de 25 μl em cada poço de reação (contendo 12,5 μl de Taqman Universal mastermix 2x, 1,25 μl de cada ensaio (primers e sonda) 20 x - (Applied Biosystems Foster City, CA,)), 1,0 μl de cDNA (na concentração de 4ng/μl de cDNA) e 10,25 μl de H₂O. Como controle de qualidade das reações, o coeficiente de variação máximo permitido nas triplicatas foi de 2%, caso contrário os experimentos foram repetidos.

As condições de termociclagem compreenderam uma incubação a 50°C por 2 min, seguida pela ativação da Taq Gold a 95°C por 10 min e 50 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 seg

intercalados com anelamento e extensão a 60°C por min. O equipamento utilizado foi um ABI 7000 Sequence Detection Systems (Applied Biosystems, Foster City, CA). Durante a reação de RT-qPCR, o ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência (CT) foi determinado e utilizado para a quantificação da expressão gênica. A amplificação do gene alvo (*ATRX* ou *ZNR3*) foi normalizada pelas condições de amplificação dos controles endógenos (*GUSB* e *CYC-A*) 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 na análise da quantificação relativa, nos casos adultos e pediátricos (213).

A expressão gênica resultante da RT-qPCR foi analisada pela quantificação relativa utilizando o método 2- $\Delta\Delta CT$ (215). No método 2- $\Delta\Delta CT$ o ΔCT 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 $\Delta\Delta CT$ corresponde a diferença entre o ΔCT de uma amostra tumoral e o ΔCT do calibrador (215). 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 (216). O ponto de corte para expressão foi definido estatisticamente pela técnica de Lausen e Schumacher em 1992 (217). Para o gene *ATRX* foi definido hiperexpressão quando a expressão gênica foi maior que 2,5, enquanto para o gene *ZNR3* foi definida a hiperexpressão quando maior que 5.

3.7.Micromatriz tecidual dos tumores primários

Os blocos de parafina e as lâminas de CAC e TAP foram recuperados do arquivo da Patologia, e foram revistos por patologistas especializados em estudar a glândula adrenal, Profa. Dra. Maria Cláudia Nogueira Zerbini (M.C.N.Z.) e Dr. Iberê Cauduro Soares (I.C.S.). As áreas mais representativas dos tumores foram selecionadas de lâminas histológicas coradas por hematoxilina e eosina. 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 cores diferentes, marrom e vermelho; as áreas representativas do centro do tumor 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 (Ilustração 4).

Ilustração 4. Realce das áreas de interesse nas lâminas e nos respectivos blocos doadores.

Fotografia de blocos de parafina doadores, superiormente, com as marcas nas áreas de interesse escolhidas através da leitura das lâminas dos tecidos tumorais coradas com hematoxilina-eosina, inferiormente.

Fonte: Arquivo dessa tese.

Os pontos marcados nos blocos de parafina doadores, também chamados cilindros ou *spots*, um total de seis por caso, foram 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 μ m (Leica Instruments, Singapura) e numerados sequencialmente. Foi analisado o intervalo com menor perda e selecionadas três lâminas referentes aos três blocos do TMA (duas lâminas contendo amostras centrais do tumor e uma lâmina contendo amostra da periferia do tumor) para as reações de imunohistoquímica (IHQ) para o marcador de interesse estudado (proteínas ATRX, ZNRF3 e beta-catenina).

3.7.1. Imunohistoquímica

Para a realização do procedimento de IHQ nas lâminas de TMA, foram realizadas as seguintes etapas enumeradas e descritas abaixo, previamente validadas (59, 212, 218-221).

- 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 (H₂O₂) a 6% diluída em metanol utilizando 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 NaN₃ (*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;

Anticorpos primários utilizados:

- Anticorpo policlonal anti-ATRX (*título 1:1000; código HPA001906; lote BH115094; 100µL (0.2mg/mL); Sigma-Aldrich*).
- Anticorpo policlonal anti-ZNRF3 (*título 1:100; código HPA036703; lote A86511; 100µL (0.1mg/mL); Sigma-Aldrich*)

- Anticorpo monoclonal anti- β -catenin (*título 1:200; clone 14/Beta-catenin; código 610154; lote 4351813, 150 μ g (0.6 mL, 250 μ g/mL) BD Transduction Laboratories*).
- Lavagens em tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
- Incubação com o bloqueador pós-primário (*referência RE7 159, Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Leica Biosystems, Newcastle Ltda*), por 30 minutos a 37 °C.
- Lavagens com tampão PBS com 3 trocas de 5 minutos cada.
- Incubação com NovoLink (*referência RE7 161, Polimer, Leica Biosystems, Newcastle Ltda, Reino Unido*), 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%, H₂O₂ 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 lâmina.

Os controles utilizados na reação de IHQ compreenderam um controle positivo para o anticorpo em estudo (amostra de CAC e de adenoma adrenal com imunoexpressão do ATRX preservada para a análise da expressão do ATRX, carcinoma de colon para a análise da expressão do ZNRF3, e tecido amigdaliano para análise da beta-catenina) e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário, sendo efetuados todos os procedimentos imunohistoquímicos.

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*). Os procedimentos acima descritos foram realizados no laboratório de investigação médica 14 (LIM14) e no laboratório de imunohistoquímica da FMUSP.

3.7.2. Análise da imunohistoquímica

A análise da imunorreatividade das proteínas ATRX, ZNRF3 e beta-catenina, nas lâminas de TMA, foi realizada por dois patologistas, especializados em estudar a glândula adrenal, (M.C.N.Z. e I.C.S.). A análise dos marcadores ATRX, ZNRF3 e Beta-catenina foi feita de maneira cega, sem acesso aos dados referentes aos casos e de forma independente. Casos com importante divergência de leitura, >2 pontos no escore de leitura final, foram revistos e uma nova leitura, por ambos, foi realizada. Como cada amostra tumoral foi analisada em triplicata e por dois patologistas, a média dos seis escores de imunorreatividade de cada caso foi utilizada para definir o seu escore final de imunorreatividade (59, 221). Dois casos (2,43%) de CAC foram excluídos da análise devido a importante perda tecidual. O coeficiente de concordância intraobservador, coeficiente kappa, foi utilizado para validação da leitura da imunorreatividade (Tabela 10). Um coeficiente kappa >0,6 é considerado como concordância substancial, e quando >0,8 é considerada concordância quase perfeita (222).

Tabela 10 - Coeficiente de concordância intraobservador.

Marcador	Kappa	Erro padrão	<i>p</i>	Interpretação (222)
ATRX	0,854	0,039	<0.0001	Concordância quase perfeita
ZNRF3	0,799	0,044	<0.0001	Concordância substancial
Beta-Catenina	0,684	0,053	<0.0001	Concordância substancial

A expressão do ATRX é caracterizada por uma imunocoloração homogênea nuclear, enquanto que a expressão do ZNRF3 caracteriza-se por imunocoloração citoplasmática com intensidade heterogênea. Para a análise da leitura das lâminas de TMA foi determinado um escore semi-quantitativo para extensão das células imunocoradas para o ATRX e ZNRF3 como demonstrado na tabela 11.

Tabela 11 - Escore semi-quantitativo para análise da extensão da imunorreatividade.

<i>Escore semi-quantitativo para análise da extensão da imunorreatividade</i>	
Escore de Extensão	Descrição
0	Nenhuma célula imunorreativa
1	1-25% de células imunorreativas
2	26-50% de células imunorreativas
3	51-75% de células imunorreativas
4	76-100% de células imunorreativas

Baixa expressão do ATRX foi definida pela presença de células imunocoradas menor que 25% do total de células, o que resulta num escore <2 . Para a análise citoplasmática da expressão do ZNRF3 foi adicionada a forma semi-qualitativa através da categorização da intensidade da imunoreação, que diferia entre os casos (Tabela 12).

Tabela 12 - Escore semi-qualitativo para análise da intensidade da imunorreatividade.

<i>Escore semi-qualitativo para análise da intensidade da imunorreatividade</i>	
Escore de Intensidade	Descrição
1	Fraco
2	Intermediário
3	Forte

O escore final para análise do ZNRF3 foi definido pela soma de ambos os parâmetros estudados, extensão e intensidade, e os casos foram agrupados como baixa expressão (escore 0-2) e alta expressão (escore 3-7) (220, 223).

A expressão da β -catenina foi analisada nos diferentes compartimentos da sua expressão (membranoso ou nuclear/citoplasmático). A extensão das células imunoreativas e intensidade de apresentação foram consideradas para a realização do escore de leitura final, dado pela soma desses parâmetros (Tabela 11 e 12) (223, 224).

3.7.2.1. Análise da imunohistoquímica (Ki67)

A leitura do marcador de proliferação celular Ki67 foi realizada de forma automatizada. As lâminas foram escaneadas, por um aparelho próprio para lâminas histológicas, com o uso do software Panoramic Viewer 1:15 (3DHISTECH, Budapeste, Hungria). O software Image Pro Plus 4.5 (MediaCybernetics, Rockville, MD, EUA) foi utilizado no processamento das imagens, e a leitura dos núcleos positivos para o marcador, assim como o total de núcleos, foi automaticamente realizada.

3.8. Estatística

O resumo das variáveis quantitativas foi realizado através de medidas-resumo de posição e dispersão, como média, mediana, desvio padrão e valores mínimo e máximo; e para o resumo das variáveis qualitativas foram utilizadas as frequências absoluta e relativa (dado em porcentagem).

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 sobrevida global foi definida como o tempo entre a data da ressecção tumoral, quando é dado o diagnóstico de CAC, e a data do óbito relacionado à doença ou da última visita de seguimento. A sobrevida livre de recorrência 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. Em relação às análises em que o tempo até o óbito, ou até a recorrência, eram de interesse, a técnica de análise de sobrevivência foi empregada. Esta consistiu na determinação de um ponto de corte que melhor discriminou as curvas de sobrevivência através da técnica de Lausen and Schumacher (217). Uma vez estimado o ponto de corte, 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, ou até a recorrência (225). 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 0,20 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 0,20, obtendo assim o modelo final. Em todos os modelos ajustados, a suposição de proporcionalidade foi avaliada por meio dos resíduos de Schoenfeld (226, 227).

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. Resultados moleculares

4.1.1. Coorte adulta

A amostra de pacientes submetida ao estudo molecular foi dividida em grupo adulto (n=37) e grupo pediátrico (n=16).

No grupo adulto foram incluídos 37 pacientes com tumores ressecados e com diagnóstico confirmado de CAC, definido por um escore de Weiss ≥ 3 e com laudo histopatológico concordante. A média da idade dos pacientes ao diagnóstico foi de 44,4 anos, com mediana de 40,45 anos (intervalo: 17,7-83 anos). Vinte e dois casos eram do sexo feminino (59,45%). Vinte e nove pacientes foram avaliados quanto a presença da variante patogênica germinativa no gene *TP53*, e em sete pacientes foi diagnosticado a presença da variante patogênica germinativa p.R337H - *TP53*, localizada no exon 10, e em um paciente foi observada a variante patogênica R273H - *TP53* em heterozigose no exon 8. A variante patogênica no *CTNNB1* foi avaliada em 12 pacientes e em 5 esteve presente, sendo elas: c.133T>G heteroz. p.S45A (rs121913407); c.95 A>T heteroz. p.D32V (rs121913396); c.133 T>C heteroz. p.S45P (rs121913407); e em dois pacientes não relacionados: c.134 C>T heteroz. p.S45F (rs121913409).

Quanto ao padrão de secreção hormonal, 27 pacientes apresentaram hipercortisolismo ao diagnóstico (20 pacientes - 58,82% apresentaram secreção mista (cortisol + andrógenos), e 7 pacientes - 20,58% apresentaram secreção única de cortisol). Cinco (14,7%) pacientes apresentaram secreção única de andrógenos e 2 pacientes (5,88%) apresentavam tumor não-funcionante. Vinte e seis pacientes (70,27%) apresentavam sinais e sintomas ao diagnóstico, que foram variáveis.

Os tumores apresentaram tamanho médio de 12,89 cm, com mediana de 12,10 cm (3-24cm). O critério de Weiss foi aplicado aos tumores e 25,72% (n=9) apresentaram escore de 8 pontos, 20% (n=7) apresentaram escore de 3, 17,14% (n=6) apresentaram escore de 7, e outros 11,43% (n=4, n=4) apresentaram 6 e 9 pontos. O critério de Weiss Modificado foi aplicado na coorte, e 15,5% (n=5) apresentaram Weiss modificado <3 , e quanto ao Escore de Helsinki foi $\leq 8,5$ em 17,39% (n=4). Em relação ao índice de proliferação celular Ki67%, considerado um fator prognóstico no CAC, tivemos uma média de 36,06% e mediana de 30% nesse grupo (1%-80%) (Tabela 13) (Apêndice G).

Tabela 13 - Coorte adulta de CAC submetida ao estudo molecular.

<i>Coorte adulta – Estudo molecular</i>		
Variáveis	Parâmetros	Valores - N(%)
Gênero	Feminino	22 (59,5%)
	Masculino	15 (40,5%)
Idade	Mediana	40,45 anos
	Média	44,40 anos
	Intervalo	17,72-83 anos
Apresentação clínica	Hipercortisolismo	27 (79,4%)
	Não-hipercortisolismo	5 (14,7%)
	Tumor não-funcionante	2 (5,9%)
	Não disponível	3
Sistema de estadiamento ENSAT	I	4 (10,8%)
	II	7 (18,9%)
	III	8 (21,6%)
	IV	18 (48,7%)
Peso tumoral	Mediana	718 gramas
	Média	908,56 gramas
	Intervalo	15-3011 gramas
Tamanho tumoral	Mediana	12,1 cm
	Média	12,89 cm
	Intervalo	3-24cm
Escore de Weiss	3	7 (20%)
	4	2 (5,7%)
	5	3 (8,6%)
	6	4 (11,4%)
	7	6 (17,1%)
	8	9 (25,8%)
	9	4 (11,4%)
Escore de Weiss Modificado	<3	5 (15,3%)
	3	4 (12,2%)
	4	3 (8,8%)
	5	3 (8,8%)
	6	8 (24,4%)
	7	10 (30,5%)
Sistema de Helsinki	<=8.5	4 (17,4%)
	>8.5	19 (82,6%)
	Não disponível	14
Marcador de proliferação Ki67	<10%	5 (21,7%)
	>=10 and <20%	2 (8,8%)
	>=20%	16 (69,5%)
	Não disponível	14
Desfecho	Óbito	20
	Vivo	17
Sobrevida global	Mediana	22 meses
	Média	38,86 meses
	Intervalo	0-185,8 meses

Os pacientes permaneceram em acompanhamento no Ambulatório da Unidade de Suprarrenal pelo tempo médio de acompanhamento 38,86 meses, com mediana de 22 meses (0-185,8 meses). O aparecimento de metástases ocorreu em 24 pacientes (70,58%), sendo que 22 pacientes já apresentavam metástase ao diagnóstico. Vinte pacientes evoluíram ao óbito apesar do tratamento realizado (54% da coorte adulta).

4.1.1.1. Resultado molecular do gene *ATRX*

As alterações no número de cópias identificadas no gene *ATRX* foram do tipo deleções, e ocorreram em 3 (9,37%) de 32 pacientes testados. As deleções encontradas foram heterogêneas e acometendo diversos exons (Ilustração 5) (Apêndice G).

Ilustração 5. Deleções registradas no gene *ATRX* na coorte adulta.

Ilustração do gene *ATRX*, com seus 35 exons enumerados. Exons destacados em vermelho apresentaram deleção na técnica de MLPA. A) Paciente #11, masculino, com 30,5 anos de idade. B) Paciente #26, masculino, com 53,5 anos de idade. C) Paciente #31, feminino, com 61,7 anos de idade. Detalhes clínicos: Apêndice F.

Fonte: Arquivo dessa tese.

A presença de deleções no *ATRX* não teve impacto na curva de Kaplan-Meier de sobrevida global ($p > 0.05$) e tampouco teve relação ou correlação com as demais variáveis estudadas nessa coorte (cortisol livre urinário, cortisol salivar, teste pós-dexametasona, testosterona, 11-deoxicortisol, tamanho e peso tumoral, escore de Weiss, sistema de estadiamento ENSAT, presença da variante patogênica germinativa do *TP53*, apresentação clínica, hipercortisolismo laboratorial, presença de metástase ou de recorrência, escore de Weiss e marcador de proliferação Ki67).

Quando avaliamos a expressão gênica do *ATRX*, através da RT-qPCR, considerando-a uma variável qualitativa, com base no valor de expressão 2 vezes maior que os genes endógenos (213), não obtivemos relevância estatística ($p > 0.05$). Numa análise posterior, considerando a expressão uma variável quantitativa, com ponto de corte de 2,5 vezes determinado estatisticamente, também não obtivemos relevância na análise de sobrevida ($p > 0.05$). A expressão gênica não teve relação com a presença da variante patogênica germinativa no *TP53* (Teste exato de Fisher, $p > 0.05$).

4.1.1.2. Resultado molecular do gene *ZNRF3*

As alterações no número de cópias identificadas no gene *ZNRF3* foram encontradas em 12 de 31 pacientes (38,70%) do grupo adulto. Onze pacientes apresentam deleções no gene *ZNRF3*, enquanto apenas 1 apresentou duplicação do gene (Ilustração 6) (Apêndice G).

A presença de deleções no *ZNRF3* não teve impacto nas curvas de Kaplan-Meier de sobrevida ($p > 0.05$). Entretanto, teve relação com a presença de secreção SDHEA. Pacientes com deleção no gene *ZNRF3* apresentaram uma secreção de SDHEA média de 2,21, com mediana de 1,88 (padronizado para valor superior da normalidade), enquanto que o grupo sem a deleção apresentou média de secreção de 0,31, com mediana de -0,48 ($p = 0,45$; Teste de U de Mann-Whitney).

A presença de deleção no gene *ZNRF3* não teve relação com as demais variáveis estudadas (cortisol livre urinário, cortisol salivar, teste pós-dexametasona, testosterona, 11-deoxicortisol, tamanho e peso tumoral, escore de Weiss, sistema de estadiamento ENSAT, presença da variante patogênica germinativa do *TP53*, apresentação clínica, hipercortisolismo laboratorial, presença de metástase ou de recorrência, escore de Weiss e marcador de proliferação Ki67).

Quando avaliamos a expressão gênica do *ZNRF3* nos pacientes, através da RT-qPCR, considerando-a uma variável qualitativa com ponto de corte 2 (213), não encontramos relevância estatística quanto a análise de sobrevida ($P > 0,05$). Numa análise posterior, considerando a expressão uma variável quantitativa, com ponto de corte de 5 determinado estatisticamente, não obtivemos significância estatística ($P > 0,05$). A expressão genica não teve relação com a presença da variante patogênica germinativa no *TP53* (Teste exato de Fisher, $p = > 0.05$).

A análise combinada de ambas as expressões gênicas, dos genes *ATRX* e do *ZNRF3*, não impactou a curva de sobrevida e não teve relação com a presença de metástases ($p > 0.05$).

Ilustração 6. Alterações no número de cópias registradas no gene *ZNRF3* na coorte adulta.

Ilustração do gene *ZNRF3*, com seus 10 exons enumerados. Exons destacados em vermelho apresentaram deleção na técnica de MLPA, e exons destacados em azul apresentaram ganho de cópias na técnica MLPA. A) Paciente #8, masculino, com 36,8 anos de idade. B) Paciente #9, masculino, com 65,6 anos de idade. C) Paciente #10, masculino, com 33 anos de idade. D) Paciente #11, masculino, com 30,5 anos de idade. E) Paciente #13, feminino, com 29,7 anos de idade. F) Paciente #15, feminino, com 32 anos de idade. G) Paciente #18, feminino, com 67,9 anos de idade. H) Paciente #21, masculino, com 25,6 anos de idade. I) Paciente #22, masculino, com 61,3 anos de idade. J) Paciente #23, feminino, com 54,4 anos de idade. K) Paciente #27, masculino, com 53,9 anos de idade. L) Paciente #35, feminino, com 35 anos de idade. M) Paciente #37, feminino, com 62,8 anos de idade. Detalhes clínicos: Apêndice F.

Fonte: Arquivo dessa tese.

4.1.1.3. Outras variáveis com valor prognóstico

A presença da variante patogênica germinativa do *TP53* ($p=0,001$), presença de metástase ao diagnóstico ($p=0,016$), e a presença de mitoses atípicas ($p=0,031$), necrose tumoral ($p=0,035$), invasão sinusoidal ($p=0,047$) e de invasão capsular ($p=0,001$) ao estudo histopatológico tiveram impacto nas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier da coorte adulta (Apêndice H).

As variáveis quantitativas tiveram um ponto de corte estabelecido estatisticamente para a análise de sobrevida. A idade ao diagnóstico $>61,5$ anos ($p=0,0065$); resultado laboratorial de

cortisol livre urinário $>1,4$ VSN ($p=0,01$), de testosterona $>0,6$ ($p=0,029$), de SDHEA $>-0,4$ ($p=0,012$) e de 11-deoxicortisol $>7,1$ ($p=0,0062$); tamanho tumoral $>9,5\text{cm}$ ($p=0,0038$), peso tumoral $>200\text{gramas}$ ($p=0,0033$), escore de Weiss ≥ 5 ($p=0,011$), marcador de proliferação Ki67 $>10\%$ ($p=0,03$) e o estadiamento de ENSAT ≥ 3 ($p=0,03$) impactaram nas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier (Apêndice H).

As demais variáveis coletadas não impactaram na curva de sobrevida (sexo, secreção hormonal, teste pos dexta, estradiol, inibina, grau de furhman, índice mitótico, células claras, arquitetura difusa, invasão venosa).

4.1.2. Coorte pediátrica

O grupo pediátrico foi definido como idade menor que 15 anos. No grupo pediátrico tivemos 16 pacientes, sendo 9 (56,25%) do sexo feminino. A idade média nesse grupo foi 3,84 anos, com mediana 2,68 anos (0,79-14,8 anos). Todos os pacientes foram submetidos a avaliação genética quanto a presença de variante patogênica no gene *TP53*, e 14 crianças (87,5%) apresentaram a variante patogênica germinativa p.R337H-*TP53*, no exon 10. Quanto a apresentação clínica, 14 (93,33%) pacientes apresentaram síndrome virilizante ao diagnóstico (9 pacientes (60%) apresentaram quadro associado a hipercortisolismo, e 5 pacientes (33,33%) apresentaram secreção única de andrógenos), e um paciente apresentou tumor não-funcionante (6,67%). Os tumores adrenocorticais apresentaram tamanho médio de 6,62cm, com mediana de 6cm (2,5-20cm).

Os pacientes permaneceram em acompanhamento no Ambulatório da Unidade de Suprarrenal pelo tempo médio de acompanhamento de 44,26 meses, com mediana de 25,10 meses (0,93-125,5 meses). Seis pacientes apresentavam metástases ao diagnóstico. Uma paciente apresentou metástase na evolução, porém a mesma teve a cápsula tumoral rota durante o procedimento cirúrgico, com extravasamento de conteúdo tumoral para cavidade abdominal, e por esse motivo foi excluída da análise de sobrevida. Três (18,75%) pacientes faleceram pelo TAP ou por complicações clínicas relacionadas ao tumor.

Seis crianças (37,5%) apresentaram escore de Wienieke maior ou igual a 4, que define comportamento tumoral maligno, 3 (18,75%) apresentaram escore de Wienieke de 3 pontos, indicando caráter indeterminado do tumor, e 7 (43,75%) apresentaram escore < 3 , definindo comportamento tumoral benigno. Treze crianças (81,25%) apresentaram escore de MacFarlane de I ou II, e três crianças (18,75%) apresentaram Escore de MacFarlane III ou IV. Quanto ao escore de Weiss, 4 crianças (25%) apresentaram Weiss menor que cinco pontos, e 12 (75%)

apresentaram Weiss maior ou igual a cinco pontos, que define comportamento agressivo tumoral na população pediátrica. O marcador de proliferação Ki67 apresentou uma leitura média de 26,86%, com mediana de 30% (intervalo 5-50%) (Tabela 14) (Anexo G).

Tabela 14 - Coorte pediátrica submetida ao estudo molecular.

<i>Coorte pediátrica – Estudo molecular</i>		
Variáveis	Parâmetros	Valores - N(%)
Gênero	Feminino	9 (56,3%)
	Masculino	7 (43,7%)
Idade	Mediana	2,68 anos
	Média	3,80 anos
	Intervalo	0,79-14,8 anos
Apresentação clínica	Síndrome virilizante	5 (33,33%)
	Hipercortisolismo isolado	0
	Síndrome mista	9 (60%)
	Tumor não-funcionante	1 (6,67%)
	Não disponível	1
Peso tumoral	Mediana	72 gramas
	Média	228,89 gramas
	Intervalo	31,4-1475 gramas
Tamanho tumoral	Mediana	6 cm
	Média	6,62 cm
	Intervalo	2,5-20 cm
Escore de Wience	<3	7 (43,8%)
	3	3 (18,7%)
	>=4	6 (37,5%)
Escore de Weiss	2	1 (6,25%)
	3	2 (12,5%)
	4	1 (6,25%)
	5	3 (18,75%)
	6	2 (12,5%)
	7	4 (25%)
	8	2 (12,5%)
	9	1 (6,25%)
Sistema de MacFarlane/Sullivan	I	7 (43,8%)
	II	6 (37,5%)
	III	1 (6,2%)
	IV	2 (12,5%)
Sistema de estadiamento ENSAT	I	6 (37,5%)
	II	6 (37,5%)
	III	2 (12,5%)
	IV	2 (12,5%)
Marcador de proliferação Ki67	<10%	1 (14,2%)
	>=10 and <20%	2 (28,6%)
	>=20%	4 (57,2%)
	Não disponível	9
Desfecho	Óbito	3
	Vivo	13

Sobrevida global	Mediana	25,1 meses
	Média	44,26 meses
	Intervalo	0,93-125,5 meses

4.1.2.1.Resultado molecular do gene *ATRX*

As alterações no número de cópias identificadas no gene *ATRX* foram do tipo deleções e ocorreram em 2 (15,38%) de 13 pacientes estudados do grupo pediátrico. (Ilustração 7) (Anexo H).

Ilustração 7. Deleções registradas no gene *ATRX* na coorte pediátrica

Ilustração do gene *ATRX*, com seus 35 exons enumerados. Exons destacados em vermelho apresentaram deleção na técnica de MLPA. A) Paciente #4, feminina, com 3,2 anos de idade. B) Paciente #8, feminina, com 3,3 anos de idade. Detalhes clínicos: Apêndice F.

Fonte: Arquivo dessa tese.

Devido ao número pequeno de desfechos nesse grupo, não pudemos proceder com a análise de sobrevida para determinar o valor prognóstico do gene *ATRX* na população pediátrica.

As demais variáveis estudadas, não tiveram relação e com a presença de alterações no número de cópias no gene *ATRX* (cortisol livre urinário, cortisol salivar, teste pós-dexametasona, testosterona, 11-deoxicortisol, tamanho e peso tumoral, escore de Weiss, sistema de estadiamento ENSAT, presença da variante patogênica germinativa do *TP53*, apresentação clínica, hipercortisolismo laboratorial, presença de metástase ou de recorrência, escore de Weiss e marcador de proliferação Ki67).

A expressão gênica do *ATRX* nos pacientes pediátricos, avaliada através da RT-qPCR, foi heterogênea (0.109070 - 35.098399) e não teve relação com a presença da variante patogênica germinativa do *TP53* (Teste exato de Fisher, $p=0.05$).

4.1.2.2.Resultado molecular do gene *ZNRF3*

As alterações no número de cópias identificadas no gene *ZNRF3* foram encontradas em 4 (30,76%) de 13 pacientes avaliados do grupo pediátrico. Três pacientes apresentaram deleções no gene *ZNRF3*, e um paciente apresentou ganho no número de cópias (Ilustração 8) (Anexo H).

Ilustração 8. Alterações no número de cópias registradas no gene *ZNRF3* na coorte pediátrica. Ilustração do gene *ZNRF3*, com seus 10 exons enumerados. Exons destacados em vermelho apresentaram deleção na técnica de MLPA, e exons destacados em azul apresentaram ganho de cópias na técnica MLPA. A) Paciente #4, feminina, com 3,2 anos de idade. B) Paciente #9, masculino, com 6 anos de idade. C) Paciente #10, feminino, com 1,6 anos de idade. D) Paciente #12, masculino, com 11,4 anos de idade. Detalhes clínicos: Apêndice F.

Fonte: Arquivo dessa tese.

Houve relação entre a presença de alterações no número *ZNRF3* e status da variante patogênica germinativa do *TP53*. Dentre os pacientes que apresentaram deleções no gene, apenas um (33.3%) apresentou variante patogênica germinativa no *TP53*, enquanto que em todos os pacientes com número de cópias normal para o gene *ZNRF3* apresentaram a variante patogênica germinativa no gene *TP53* (teste exato de Fisher, $p=0.045$).

Os 3 casos que apresentaram a deleção no *ZNRF3*, não apresentaram mitoses atípica ($p=0.018$, Teste exato de Fisher), e não apresentaram necrose tumoral ao estudo histopatológico ($p=0.045$, Teste de Fisher). Demais variáveis não tiveram relação com a presença de deleções no gene (cortisol livre urinário, cortisol salivar, teste pós-dexametasona, testosterona, 11-deoxicortisol, tamanho e peso tumoral, escore de Weiss, sistema de estadiamento ENSAT, presença da variante patogênica germinativa do *TP53*, apresentação clínica, hipercortisolismo laboratorial, presença de metástase ou de recorrência, escore de Weiss e marcador de proliferação Ki67).

A expressão gênica do *ZNRF3* nos pacientes pediátricos, através da RT-qPCR, também foi heterogênea (0.189027 - 32.899642) e não teve relação com a presença da variante patogênica germinativa no *TP53* (Teste exato de Fisher, $p=>0.05$).

4.1.3. Avaliação dos casos metastáticos

Na coorte adulta tivemos 24 casos de CAC metastáticos. Quando avaliados, esses casos apresentaram relação com o índice mitótico ($p=0,015$, QuiQuadrado), a presença de mitoses atípicas ($p=0,01$, Qui quadrado), necrose tumoral ($p=0,007$, Fisher) e invasão venosa ($p=0,007$, Qui-quadrado) ao estudo histopatológico. Os casos metastáticos também

apresentaram relação com a secreção de androstenediona ($p=0,033$, Teste U de Mann Whitney), com o tamanho tumoral ($p=0,01$, Teste U de Mann Whitney) e peso tumoral ($p=0,02$, Teste U de Mann Whitney), e como escore de Weiss ($p=0,001$, Teste U de Mann Whitney) e o marcador de proliferação Ki67 ($p=0,001$, Teste U de Mann Whitney).

Na coorte pediátrica, as variáveis tamanho tumoral ($p=0,026$, Teste U de Mann Whitney), invasão venosa ($p=0,013$, teste exato de Fisher) e escore de Wieneke ($p=0,016$, Teste exato de Fisher) tiveram relação com os casos metastáticos.

4.2. Resultados imunohistoquímica

4.2.1. Coorte adulta

A coorte adulta submetida ao estudo imunohistoquímico compreendeu 82 casos de CAC. A coorte foi composta de 63 (76,8%) casos provenientes de pacientes do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi 42,05 anos, com mediana de idade de 38,17 anos (15,38 - 85,46 anos). Hiper cortisolismo esteve presente em 51 (66,2%) casos na apresentação inicial, na forma de secreção única (17 casos, 22%) ou secreção associada a hiperandrogenismo (34 casos, 44,2%), 10 (13%) casos apresentaram outras secreções hormonais (hiperandrogenismo – 9 casos, 11,7%; e hiperaldosteronismo – 1 caso, 1,3%), e 16 casos (20,8%) apresentaram ausência de secreção hormonal, caracterizando tumor silente. Os tumores ressecados durante ato operatório, dessa coorte, apresentaram um peso tumoral médio de 707,46 gramas, com mediana de peso 445 gramas (10 - 2600 gramas), e, tamanho tumoral médio de 11,59 cm, com mediana de tamanho 11 cm (2,2 - 23 cm). Nove (11,2%) pacientes apresentaram sistema de estadiamento ENSAT estadio I, 36 (44,4%) apresentaram ENSAT estadio II, 18 (22,2%) com ENSAT estadio III e 18 (22,2%) com ENSAT estadio IV. O escore de Weiss, Weiss modificado, escore de Helsinki e a leitura do marcador de proliferação Ki67 foram também realizados nessa coorte e estão detalhados na tabela 15. Foram registrados 39 óbitos pelo CAC ou por complicações clínicas relacionadas ao tumor. A sobrevida global média foi de 85,35 meses, com mediana de 39,58 meses (1,4 - 406,83 meses) (Anexo G).

Tabela 15 - Resumo das características dos 82 pacientes com CAC, cujos tecidos tumorais foram inseridos no TMA.

<i>Coorte adulta – Estudo imunohistoquímico</i>		
Variáveis	Parâmetros	Valores - N(%)
Gênero	Feminino	63 (76,8%)
	Masculino	19 (23,2%)
Idade	Mediana	38,17 anos
	Média	42,05 anos
	Intervalo	15,38-85,46 anos
Apresentação clínica	Hiper cortisolismo	51 (66,2%)
	Não-hiper cortisolismo	10 (13%)
	Tumor silente	16 (20,8%)
	Não disponível	5
Peso tumoral	Mediana	445 gramas
	Média	707,46 gramas
	Intervalo	10-2600 gramas
Tamanho tumoral	Mediana	11 cm

	Média	11,59cm
	Intervalo	2,2-23cm
Escore de Weiss	3	15 (19,5%)
	4	16 (20,8%)
	5	6 (7,8%)
	6	12 (15,6%)
	7	11 (14,3%)
	8	15 (19,5%)
	9	2 (2,5%)
Escore de Weiss Modificado	<3	15 (22,4%)
	3	13 (19,4%)
	4	6 (8,9%)
	5	11 (16,4%)
	6	8 (11,9%)
	7	14 (20,8%)
	Não disponível	15
Sistema de estadiamento ENSAT	I	9 (11,2%)
	II	36 (44,4%)
	III	18 (22,2%)
	IV	18 (22,2%)
	Não disponível	1
Sistema de Helsinki	≤8.5	21 (32,3%)
	>8.5	44 (67,7%)
	Não disponível	17
Marcador de proliferação Ki67	<10%	31 (43%)
	≥10 and <20%	26 (36,1%)
	≥20%	15 (20,9%)
	Não disponível	10
Desfecho	Óbito	39
	Vivo	31
	Não disponível	12
Sobrevida global	Mediana	39,58 meses
	Média	85,35 meses
	Intervalo	1,4-406,83 meses

4.2.1.1. Proteína ATRX

Os tecidos tumorais dos casos de CAC que apresentaram forte expressão proteica da proteína ATRX representaram 47,5% (38 casos) da coorte (Ilustração 9) (Apêndice I).

Os casos com forte expressão proteica de ATRX apresentaram uma idade mediana ao diagnóstico de 52,5 anos, enquanto que os casos com baixa expressão apresentaram uma idade mediana de 34,7 anos ($Z = -3,349$; $p = 0,001$; teste U de Mann-Whitney). A proteína ATRX foi fortemente expressa em 90% dos casos sem hipercortisolismo na apresentação inicial, enquanto foi fracamente expressa em 59,2% dos casos com hipercortisolismo ($X^2(2) = 8,759$; $p = 0,013$;

teste qui-quadrado de Pearson). Os casos que apresentaram hipercortisolismo ao diagnóstico tiveram uma expressão de ATRX mediana de 0,5 (intervalo 0-4), enquanto o grupo sem hipercortisolismo apresentou expressão de ATRX mediana de 3,08 (intervalo 0-4) ($X^2(2)=6,728$; $p=0,035$; teste de Kruskal-Wallis).

Ilustração 9. Imunorreatividade da proteína ATRX em amostras de CAC.

Amostras de CAC (Fotografias de lâminas de TMA. Obj 40x). (a) Caso 13 de CAC apresenta forte expressão nuclear de ATRX (escore 4). Paciente feminina, 28,7 anos de idade, apresentando ao diagnóstico síndrome virilizante. Peça tumoral com escore de Weiss 3. Estadiamento de ENSAT 2. (b) Caso 32 de CAC apresenta fraca expressão de ATRX (escore 0). Paciente feminina, 26,5 anos de idade, apresentando síndrome mista (hipercortisolismo e hiperandrogenismo) ao diagnóstico. Peça tumoral com escore de Weiss 7. Estadiamento de ENSAT 4.

Fonte: Arquivo dessa tese.

A análise quantitativa da expressão proteica do ATRX demonstrou correlação positiva com a idade ao diagnóstico (coeficiente 0,391; $p < 0,001$; correlação de Spearman) e correlação negativa com o tamanho tumoral (coeficiente -0,263; $p = 0,02$; correlação de Spearman) e com o escore de Weiss da peça histopatológica (coeficiente -0,245; $p = 0,033$; correlação de Spearman).

Um ponto de corte foi definido estatisticamente para a análise da expressão de ATRX e foi usado para a análise da sobrevida. O ponto de corte ≤ 1.5 para a expressão de ATRX apresentou impacto na curva de sobrevida de Kaplan-Meier ($X^2(1) = 4,021$; $p = 0,045$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 1).

A análise do modelo de regressão de Cox para sobrevida global apresentou um hazard ratio (HR) de 0,521 (95%CI, 0,273-0,997) para a expressão de ATRX > 1.5 quando comparado com a expressão ≤ 1.5 (Wald= 3,881; df1; $p = 0,049$; modelo de regressão de Cox).

Gráfico 1. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão da proteína ATRX.

4.2.1.2. Proteína ZNRF3

A expressão da proteína ZNRF3 foi avaliada através da soma dos dois parâmetros avaliados (extensão e intensidade) e um escore $\geq 3+$ foi definido como forte expressão (Ilustração 10) (Apêndice I).

Ilustração 10. Imunorreatividade da proteína ZNRF3 em amostras de CAC.

Amostras de CAC (Fotografias de lâminas de TMA. Obj 40x). (a) Caso 77 de CAC apresenta forte expressão citoplasmática de ZNRF3 (escore 5; extensão=4, intensidade=1). Paciente masculino, 65,6 anos de idade, apresentando ao diagnóstico síndrome mista (hipercortisolismo e hiperandrogenismo). Peça tumoral com escore de Weiss 6. Estadiamento de ENSAT 4. (b) Caso 5 de CAC apresenta fraca expressão citoplasmática de ZNRF3 (escore 0). Paciente feminina, 85,4 anos de idade, apresentando hipercortisolismo ao diagnóstico. Peça tumoral com escore de Weiss 7. Estadiamento de ENSAT 3.

Fonte: Arquivo dessa tese.

A forte expressão de ZNRF3 esteve presente em 46,25% (37 casos) da coorte e foi associada a um tamanho tumoral menor (média de tamanho tumoral 9,7 cm), enquanto que a fraca expressão foi associada com um tamanho tumoral maior (média de tamanho tumoral 13,3 cm) ao diagnóstico ($Z=-2,665$; $p=0,008$; teste U de Mann-Whitney). Tumores com forte expressão de ZNRF3 apresentaram um escore de Weiss menor (média de 4,7 pontos) quando comparado

ao grupo com fraca expressão (média de 6,1 pontos) ($Z=-2,942$; $p=0,003$; teste U de Mann-Whitney). A expressão de ZNRF3 teve relação com o sistema de estadiamento de ENSAT. Uma forte expressão de ZNRF3 esteve presente em 89% dos casos com estadiamento de ENSAT I, em 42,9% dos casos com estadiamento de ENSAT II, em 29,4% dos casos com ENSAT III, e em 44,4% dos casos com ENSAT IV ($p=0,033$, teste exato de Fisher). A expressão de ZNRF3 não teve relação com a presença de hipercortisolismo na apresentação clínica inicial ($X^2(2)=2,035$; $p>0,05$, teste qui-quadrado de Pearson). Em relação a análise de desfechos, 64,1% dos pacientes com CAC que progrediram ao óbito apresentaram uma fraca expressão de ZNRF3 e tiveram uma sobrevida global mediana de 19 meses ($X^2(1)=4,716$; $p=0,030$; teste qui-quadrado de Pearson).

A expressão quantitativa de ZNRF3 mostrou uma correlação negativa com o peso tumoral (coeficiente $-0,282$; $p=0,026$, correlação de Spearman), com o tamanho tumoral (coeficiente $-0,313$; $p=0,005$; correlação de Spearman), e com o escore de Weiss da peça histopatológica (coeficiente $-0,345$; $p=0,002$; correlação de Spearman).

Um ponto de corte foi definido estatisticamente para a análise da expressão de ZNRF3 e foi usado para a análise da sobrevida. O ponto de corte da expressão proteica de ZNRF3 ≤ 2 teve um impacto na análise de sobrevida global ($X^2(1)=6,277$; $p=0,012$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 2).

Gráfico 2. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão da proteína ZNRF3.

A análise de regressão de Cox mostrou um HR de 0,441 (95%CI, 0,229-0,852) para a expressão ZNRF3 >2 quando comparado com o valor da expressão ≤ 2 (Wald= 5,942; df1; $p=0,015$; modelo de regressão de Cox).

ZNRF3 é considerado um gene supressor da via Wnt/ β -catenina. Devido a esta conhecida função, a imunocoloração da β -catenina foi avaliada nos tecidos tumorais. Uma via Wnt/ β -catenin ativada foi caracterizada por uma imunocoloração citoplasmática/nuclear da β -catenin, enquanto que uma imunocoloração restrita a membrana celular caracterizou a inativação da via (172, 224) (Ilustração 11; a2, b2).

A expressão de ZNRF3 apresentou uma correlação positiva com a expressão da β -catenina na membrana celular (coeficiente 0,202; $p= 0,004$; correlação de Spearman). Estes dados corroboram para a função do ZNRF3 como um supressor tumoral, mantendo a β -catenina acoplada a membrana celular, mantendo a via inativada (Ilustração 11).

Ilustração 11. Imunorreatividade da proteína ZNRF3 e da Beta-catenina em amostras de CAC. Amostras de CAC (Fotografias de lâminas de TMA. Obj 40x). (a1) Caso 22 de CAC apresenta forte expressão citoplasmática de ZNRF3 (escore 5). Paciente feminina, 19,3 anos de idade, apresentando ao diagnóstico hipercortisolismo. Peça tumoral com escore de Weiss 4. Estadiamento de ENSAT 1. (a2) Caso 22 de CAC com expressão membranosa da β -catenin. (b1) Caso 50 de CAC apresenta fraca expressão citoplasmática de ZNRF3 (escore 0). Paciente masculino, 36,1 anos de idade, apresentando tumor não-funcionante. Peça tumoral com escore de Weiss 8. Estadiamento de ENSAT 2. (b2) Caso 50 de CAC com expressão citoplasmática e nuclear de β -catenina.

Fonte: Arquivo dessa tese.

4.2.1.3. Marcador de proliferação Ki67 e análise combinada

A análise do marcador de proliferação Ki67 mostrou uma correlação positiva com o peso tumoral (coeficiente 0,377; $p = 0,01$, correlação de Spearman), com o tamanho tumoral (coeficiente 0,344; $p = 0,007$, correlação de Spearman), e com o escore de Weiss (coeficiente 0,572; $p < 0,001$, correlação de Spearman). O resultado da leitura do marcador de proliferação Ki67 foi categorizado em grupos ($<10\%$, $\geq 10\%$ e $<20\%$, $\geq 20\%$) e foi demonstrado o impacto na análise de sobrevida global ($X^2(2) = 29,363$; $p < 0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 3).

Gráfico 3. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão de Ki67.

A análise de regressão de Cox demonstrou um HR de 5,802 (95%CI, 2,447-13,726) para o marcador de proliferação Ki67 quando agrupado em $\geq 10\%$ e $<20\%$ (Wald= 15,925; df1; $p = <0,001$; modelo de regressão de Cox), e um HR de 9,041 (95%CI, 3,543-23,073) quando o Ki67 foi agrupado em $\geq 20\%$ (Wald= 21,217; df1; $p = <0,001$; modelo de regressão de Cox).

Foi realizada a análise combinada do marcador de proliferação Ki67 e as expressões proteicas de ATRX e ZNRF3. Os casos foram agrupados conforme o valor do Ki67 ($>10\%$ or $\leq 10\%$) e a expressão de ATRX (>1.5 ou ≤ 1.5), e conforme o valor do Ki67 ($>10\%$ or $\leq 10\%$) e a expressão de ZNRF3 (>2 ou ≤ 2). A combinação de Ki67 com expressão proteica de ATRX e de ZNRF3 não impactaram as curvas de sobrevida de Kaplan-Meier ($X^2(3) = 5,206$; $p = >0,05$; and $X^2(3) = 6,619$; $p = >0,05$, respectivamente; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank). Entretanto, a combinação de baixa expressão de ATRX com a baixa expressão de ZNRF3 apresentaram um impacto na curva de sobrevida global ($X^2(3) = 9,867$; $p = 0,02$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 4).

Gráfico 4. Curva de sobrevida global de Kaplan-Meier para expressão combinada das proteínas ATRX e ZNRFF3.

A análise de regressão de cox da combinação das expressões de ATRX e de ZNRFF3 apresentou um HR de 0,314 (95%CI, 0,136-0,725) para a expressão de ATRX (>1.5) e ZNRFF3 (>2) (Wald= 7,363; df1; $p= 0,007$; modelo de regressão de Cox).

4.2.1.4. Sobrevida livre de recorrência

A sobrevida livre de recorrência (SLR) é definida como o período de tempo entre a data da excisão tumoral completa e a data da primeira evidência radiológica de recorrência local ou a distância (212). A expressão proteica de ATRX foi associada com uma maior SLR quando o ponto de corte >2.7 foi estatisticamente estabelecido ($X^2(1)= 4,920$; $p= 0,027$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 5).

O modelo de regressão de Cox para SLR evidenciou um HR de 0,332 (95%CI, 0,111-0,932) para a expressão de ATRX >2.7 quando comparada com o valor de expressão ≤ 2.7 (Wald=4,365; df1; $p= 0,037$; modelo de regressão de Cox).

A presença de forte expressão de ZNRFF3 (score >2) foi associada a uma SLR melhor ($X^2(1)= 6,963$; $p= 0,008$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), o que significa que os casos com uma forte expressão proteica de ZNRFF3 apresentaram um maior tempo de SLR quando comparado ao grupo com fraca expressão. Este dado corrobora para a função de supressor tumoral do gene ZNRFF3 (Gráfico 6).

Gráfico 5. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão da proteína ATRX.

Gráfico 6. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão da proteína ZNRF3.

O modelo de regressão de Cox para SLR evidenciou um HR de 0,333 (95%CI, 0,140-0,790) para uma expressão de ZNRF3 >2 quando comparada a expressão ≤2 (Wald= 6,222; df1; $p=0,013$; modelo de regressão de Cox).

A categorização do marcador de proliferação do Ki67 em grupos (<10%, ≥10% e <20%, ≥20%) impactou as curvas de SLR ($X^2(2)=16,357$; $p=<0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) (Gráfico 7).

Gráfico 7. Curva de sobrevida livre de recorrência de Kaplan-Meier para expressão do Ki67.

A análise do modelo de Cox para SLR do marcador de proliferação Ki67 mostrou um HR de 5,450 (95%CI, 1,872-15,866) quando o Ki67 foi agrupado em $\geq 10\%$ e $<20\%$ (Wald= 9,674; df1; $p= 0,002$; modelo de regressão de Cox), e um HR de 7,691 (95%CI, 2,278-25,963) quando o Ki67 esteve agrupado em $\geq 20\%$ (Wald= 10,801; df1; $p= 0,001$; modelo de regressão de Cox).

4.2.1.5. Outras variáveis com valor prognóstico

A análise de sobrevida foi realizada com as demais variáveis estudadas nessa coorte. Uma pior sobrevida global foi associada com o peso tumoral > 55 gramas ($X^2(1)= 13,534$; $p= <0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), com o tamanho tumoral > 7 cm ($X^2(1)= 11,462$; $p= 0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), com o escore de Weiss ≥ 5 da peça histopatológica ($X^2(1)= 15,231$; $p= <0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) e marcador de proliferação Ki67 $> 8\%$ ($X^2(1)= 18,294$; $p= <0,001$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank). O estadiamento de ENSAT ($X^2(3)= 11,799$; $p= 0,008$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), a presença de metástase ao diagnóstico ($X^2(1)= 9,111$; $p= 0,003$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), a presença de recorrência local ($X^2(1)= 6,775$; $p= 0,009$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank), e a presença de recorrência a distância ($X^2(1)= 8,688$; $p= 0,003$; método de Kaplan-Meier e teste de log-rank) também impactaram as curvas de sobrevida (Anexo I). A presença de hipercortisolismo na apresentação inicial não impactou a curva de sobrevida global, e tampouco a curva de SLR ($X^2(1)= 3,103$; $p= >0,05$; e $X^2(1)= 3,060$; $p= >0,05$, respectivamente, método de Kaplan-Meier e teste de log-rank).

A análise de regressão de Cox revelou que as seguintes variáveis foram independentes para o desfecho óbito, nessa coorte: peso tumoral (HR 39,052; 95%CI 1,357-1123,525; Wald=

4,572; $df1$; $p = 0,032$; modelo de regressão de Cox), tamanho tumoral (HR 4,451; 95%CI 1,729-11,458; Wald= 9,577; $df1$; $p = 0,002$; modelo de regressão de Cox), escore de Weiss (HR 4,040; 95%CI 1,895-8,611; Wald= 13,073; $df1$; $p = <0,001$; modelo de regressão de Cox), marcador de proliferação Ki67 (HR 6,360; 95%CI 2,434-16,618; Wald= 14,256; $df1$; $p = <0,001$; modelo de regressão de Cox), presença de metástase ao diagnóstico (HR 2,971; 95%CI 1,415-6,237; Wald=8,282; $df1$; $p = 0,004$; modelo de regressão de Cox), e recorrência da doença (HR 14,985; 95%CI 1,358-165,390; Wald= 4,882; $df1$; $p = 0,027$; modelo de regressão de Cox). Os principais resultados da análise de regressão de Cox estão apresentados na tabela 16.

Tabela 16 - Principais resultados da análise de regressão de Cox na coorte adulta

Variáveis	Parâmetros	Coeficiente	Erro padrão	HR	95,0% IC		Valor p
					Inferior	Superior	
Expressão ATRX	contínua	-0.198	0.105	0.821	0.668	1.008	>0.05
	>1.5	-0.651	0.331	0.521	0.273	0.997	0.049
Expressão ZNRF3	contínua	-0.141	0.071	0.869	0.757	0.998	0.046
	>2	-0.818	0.336	0.441	0.229	0.852	0.015
Idade ao diagnóstico	contínua	0.006	0.010	1.006	0.987	1.025	0.527
	>51 anos	0.374	0.331	1.453	0.759	2.781	>0.05
Metástase ao diagnóstico		1.089	0.378	2.971	1.415	6.237	0.004
Peso tumoral	contínua	0.001	0.000	1.001	1.000	1.001	0.001
	>55 gramas	3.665	1.714	39.052	1.357	1123.525	0.032
Tamanho tumoral	contínua	0.100	0.029	1.105	1.045	1.169	<0.001
	>7 cm	1.493	0.482	4.451	1.729	11.458	0.002
Escore de Weiss	contínua	0.331	0.090	1.392	1.167	1.661	<0.001
	>4	1.396	0.386	4.040	1.895	8.611	<0.001
Presença de recorrência		2.707	1.225	14.985	1.358	165.390	0.027
Expressão de ATRX e ZNRF3	ATRX>1.5 e ZNRF3 $\leq$ 2	-0.678	0.447	0.507	0.211	1.218	>0.05
	ATRX $\leq$ 1.5 e ZNRF3>2	-0.911	0.477	0.402	0.158	1.025	>0.05
	ATRX>1.5 e ZNRF3>2	-1.157	0.426	0.314	0.136	0.725	0.007
Expressão de Ki-67 e ATRX	Ki-67>10% e ATRX $\leq$ 1.5	0.253	0.453	1.288	0.530	3.128	>0.05
	Ki-67 $\leq$ 10% e ATRX>1.5	-0.835	0.551	0.434	0.147	1.276	>0.05

	Ki-67>10% e ATRX>1.5	0.274	0.454	1.315	0.541	3.200	>0.05
Expressão de Ki-67 e ZNR3	Ki-67>10% e ZNR3≤2	0.039	0.434	1.040	0.444	2.436	>0.05
	Ki-67≤10% e ZNR3>2	-1.014	0.530	0.363	0.128	1.024	>0.05
	Ki-67>10% e ZNR3>2	0.249	0.509	1.282	0.473	3.477	>0.05
Ki-67	>8	1.850	0.490	6.360	2.434	16.618	<0.001
	≥10% e <20%	1.758	0.441	5.802	2.447	13.760	<0.001
	≥20%	2.202	0.478	9.041	3.543	23.073	<0.001

4.2.2. Coorte pediátrica

A coorte pediátrica submetida ao estudo imunohistoquímico compreendeu 47 casos de tumor adrenal pediátrico. A coorte foi composta de 31 (65,9%) casos provenientes de pacientes do sexo feminino. A idade média dos pacientes foi 3,45 anos, com mediana de idade de 2,41 anos (0,1 – 13,02 anos). A síndrome virilizante foi a mais frequente ao diagnóstico com 46 casos (97,87%) (sendo 28 casos - 59,57% com secreção única de andrógenos, e 18 casos -38,3% com secreção associada a hipercortisolismo), e apenas um caso (2,13%) foi diagnosticado com síndrome de cushing isolada. Os tumores ressecados durante ato operatório, dessa coorte, apresentaram um peso tumoral médio de 71,03 gramas, com mediana de peso 40 gramas (3 - 650 gramas), e, tamanho tumoral médio de 5,80 cm, com mediana de tamanho 5 cm (1,5 - 21 cm). Vinte e cinco (53,20%) pacientes apresentaram sistema de estadiamento McFarlane estadio I, 20 (42,55%) apresentaram McFarlane estadio II, 2 (4,25%) com McFarlane estadio IV. O escore de estadiamento de Weneke e do ENSAT, escore de Weiss e a leitura do marcador de proliferação Ki67 foram também realizados nessa coorte e estão detalhados na tabela 17 (Anexo G).

Tabela 17 - Resumo das características dos 47 pacientes com TAP, cujos tecidos tumorais foram inseridos no TMA.

Coorte pediátrica – Estudo imunohistoquímico		
Variáveis	Parâmetros	Valores - N(%)
Gênero	Feminino	31 (65,9%)
	Masculino	16 (34,1%)
Idade	Mediana	2,41 anos
	Média	3,45 anos
	Intervalo	0,10-13,02 anos

Apresentação clínica	Síndrome virilizante	28 (59,57%)
	Síndrome virilizante+Síndrome de Cushing	18 (38,30%)
	Síndrome de Cushing	1 (2,13%)
Variante patogênica do <i>TP53</i>	Presente	26 (81,25%)
	Ausente	6 (18,75%)
	Não disponível	15
Peso tumoral	Mediana	40 gramas
	Média	71,03 gramas
	Intervalo	3-650 gramas
Tamanho tumoral	Mediana	5 cm
	Média	5,80 cm
	Intervalo	1,5-21 cm
Sistema de estadiamento McFarlane/Sullivan	I	25 (53,20%)
	II	20 (42,55%)
	III	0
	IV	2 (4,25%)
Sistema de estadiamento Wieneke	<3	30 (75%)
	3	6 (15%)
	>=4	4 (10%)
	Não disponível	7
Sistema de estadiamento ENSAT	I	26 (55,32%)
	II	17 (36,18%)
	III	2 (4,25%)
	IV	2 (4,25%)
Escore de Weiss	1	3 (6,52%)
	2	4 (8,70%)
	3	4 (8,70%)
	4	9 (19,56%)
	5	9 (19,56%)
	6	10 (21,74%)
	7	5 (10,87%)
	8	2 (4,35%)
	Não disponível	1
Marcador de proliferação Ki67	<10%	11 (44%)
	>=10 and <20%	8 (32%)
	>=20%	6 (24%)
	Não disponível	22
Desfecho	Óbito	3
	Vivo	36
	Não disponível	8
Sobrevida global	Mediana	129 meses
	Média	141,99 meses
	Intervalo	1,6-384,56 meses

Trinta e dois pacientes foram rastreados para a variante patogênica germinativa do *TP53*, e 26 (81,25%) foram positivos para a presença da variante patogênica p.R337H-*TP53*. Foram registrados 3 óbitos pelo TAP ou por complicações clínicas relacionadas ao tumor. A sobrevida global média foi de 141,99 meses, com mediana de 129 meses (1,6 – 384,56 meses). Pelo

número de desfecho ser considerado estatisticamente pequeno, não pudemos avaliar o impacto das expressões proteicas do ATRX e do ZNRF3 e das demais variáveis na sobrevida global da coorte pediátrica.

Dois (4,45%) pacientes apresentaram metástases ao diagnóstico, e nove pacientes apresentaram recorrência da doença. Quatro pacientes apresentaram recorrência local e a distancia, quatro apresentaram recorrência a distancia, e um apresentou recorrência apenas local.

4.2.2.1. Proteína ATRX

A expressão de ATRX nos casos pediátricos teve relação com o escore de Wienecke e com o escore de Weiss. Os casos com fraca expressão de ATRX, escore ≤ 2 , apresentaram um escore de Wienecke médio 1,912, com mediana de 2 (intervalo 0-6), enquanto que os casos com forte expressão, escore maior que >2 , apresentaram escore de Wienecke médio de 0,833, mediana de 1 (intervalo 0-2) ($Z = -1,995$, $p = 0,046$, teste de Mann-Whitney U). Pacientes que apresentaram uma forte expressão de ATRX apresentaram um escore de Weiss médio de 2,75, com mediana 2,5 (intervalo 1-5), enquanto que os casos com fraca expressão apresentaram escore de Weiss médio de 5,07, mediana de 5 (intervalo 1-8) ($Z = -3,130$, $p = 0,002$, teste de Mann-Whitney U).

O marcador de proliferação Ki67 apresentou associação com a expressão de ATRX. Os casos com forte expressão de ATRX apresentaram leitura de Ki67 média de 2,5%, com mediana de 2,5 % (intervalo 0-5), enquanto que os casos com baixa expressão apresentaram Ki67 média de 16,5%, com mediana de 10% (intervalo 0-50%) ($Z = -2,367$, $p = 0,018$, teste de Mann-Whitney U).

A expressão proteica do ATRX apresentou correlação negativa com o escore de Wienecke (coeficiente -0,442; $p = 0,004$) e com o escore de Weiss (coeficiente -0,467; $p = 0,001$). Por sua vez, o escore de Weiss apresentou uma correlação positiva com escore de MacFarlane (coeficiente: 0,338; $p = 0,022$), com o peso tumoral (coeficiente 0,422; $p = 0,004$), com o tamanho tumoral (coeficiente 0,365; $p = 0,013$) e com o marcador de proliferação Ki67 (coeficiente 0,613; $p = 0,001$). O escore de Wienecke teve correlação positiva com o escore de MacFarlane (coeficiente 0,482; $p = 0,002$), com o peso tumoral (coeficiente 0,562; $p = <0,001$), com o tamanho tumoral (coeficiente 0,534; $p = <0,001$) e com o marcador de proliferação Ki67 (coeficiente 0,581; $p = 0,004$).

4.2.2.2. Proteína ZNRF3

A expressão proteica do ZNRF3 não teve relação e nem correlação com as variáveis estudadas nessa coorte pediátrica.

5 DISCUSSÃO

O CAC é uma doença rara, com comportamento biológico desfavorável, na maioria dos casos, apesar da terapêutica oferecida. A maioria dos tumores na idade adulta são esporádicos, embora 5-10% estejam associados a variantes patogênicas germinativas (228), como as relacionadas a síndrome de Li Fraumeni, síndrome de Lynch, síndrome de Beckwith-Wiedemann e a Neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (4).

A frequência de alterações genéticas germinativas difere na população pediátrica quando comparada com a população adulta, e um exemplo claro é o registro da queda na frequência de variantes patogênicas germinativas no *TP53* com a idade, sendo que pelo menos 50% das crianças com TAP apresentam essa alteração, e em paralelo menos de 10% dos adultos diagnosticados com CAC apresentam alteração no *TP53* (229, 230). Em nossa coorte molecular, registramos no grupo pediátrico a presença de variante patogênica germinativa no *TP53* em 87,5% dos pacientes, enquanto que no grupo adulto a frequência foi de 27,5%. O grupo pediátrico apresenta não só base genética distinta do CAC, como também sua evolução e prognóstico tendem a ser mais brandos (13-15).

A disponibilidade dos estudos pan-genômicos tem nos permitido entender melhor a tumorigênese de ambas as neoplasias, CAC e TAP, nos permitindo fornecer um cuidado individualizado aos pacientes. Três grandes estudos demonstraram o envolvimento de novos genes no CAC e no TAP (63, 64, 110), e nosso objetivo com esse trabalho foi analisar o valor prognóstico de dois desses novos genes: *ATRX* e *ZNRF3*.

Há duas coortes referência para estudo molecular em CAC, uma é a coorte americana do The Cancer Genome Atlas Research Network (TCGA, <https://www.cancer.gov/tcga>) e a outra é a coorte europeia que associa dois grupos de pesquisa, o grupo da rede ENSAT e o grupo do Assie *et al.* (63, 231). O TCGA Research Network apresenta 184 pacientes cadastrados com CAC, com idade média de 47,16 anos, sendo 76,8% pacientes do gênero feminino, e com estadiamento de ENSAT estadio I correspondendo a 10% da coorte, estadio II a 49%, estadio III a 21%, e estadio IV a 20% da coorte (231). Sessenta e oito casos (37%) dessa coorte evoluíram ao óbito devido ao CAC. A coorte europeia registra um total de 130 pacientes, com uma idade média de 46 anos (18-86 anos), sendo 69,2% do gênero feminino, e com estadiamento de ENSAT estadio I correspondendo a 7,2% da coorte, estadio II a 53,9% da coorte, estadio III a 16%, e estadio IV correspondendo a 23,3% da coorte, e com 46 casos (35,38%) que evoluíram ao óbito. Quanto a frequência de alterações moleculares, a coorte do TCGA apresentou em 4,39% de sua coorte alterações genéticas no gene *ATRX* (sendo 3 variantes patogênicas nonsense e 1 missense) acompanhadas de aumento no tamanho dos telômeros, e 19,3% de alterações genéticas no gene *ZNRF3* (sendo 14 casos de deleções em

homozigose e 2 casos com variantes patogênicas não-silentes). O TCGA reportou que diferentes níveis de expressão dos transcritos do gene *ATRX*, avaliados por sequenciamento de RNA (RNA-seq) não impactaram na curva de sobrevida global, numa coorte de 79 pacientes (20 casos com expressão aumentada e 59 casos com expressão diminuída de transcrito)(231). Entretanto, o alto nível de expressão de transcritos do gene *ZNRF3* (presente em 20 casos) esteve relacionada a pior sobrevida quando comparados aos casos com baixa/média expressão (59 casos) ($p=0,052$)(231). A presença de deleções no gene *ZNRF3* pode influenciar seus níveis de transcrição, mantendo-os indetectáveis se houver deleção bialélica; simultaneamente, a sinalização Wnt / β -catenina pode estar altamente ativada devido à perda bialélica de seu supressor *ZNRF3*. O TCGA Research Network analisou os níveis de transcritos do *ZNRF3* sem excluir os casos de deleções bialélicas, e esse fato pode justificar a associação de uma maior expressão do gene *ZNRF3*, um supressor tumoral, a uma pior sobrevida na coorte.

Na coorte européia houve uma frequência de 4,4% de alterações no gene *ATRX* (2 casos de variantes patogênicas somáticas não-sinônimas), enquanto que as alterações no gene *ZNRF3* foram encontradas em 21% dos casos (19 casos de deleções em homozigose, e 7 casos de variantes patogênicas - 4 nonsenses, 2 substituições somáticas não-sinônimas e 1 indeleção em frameshift) (63). Os genes *ATRX* e *ZNRF3* não foram estudados isoladamente para a análise da sobrevida, entretanto, Assie *et al.* separou a coorte em clusters conforme os resultados da expressão de RNAm, da metilação de DNA e da expressão de miRNA. Dois clusters já estabelecidos, C1A, mais agressivo, e C1B, mais indolente foram definidos (232). O cluster 1A apresentou pior sobrevida na coorte, quando comparado ao cluster C1B. O cluster C1A apresentou maior taxa de variantes patogênicas e os genes, como *ZNRF3*, *CTNNB1*, *TP53*, e as suas vias sinalizadoras estiveram primariamente alteradas no cluster C1A do que no C1B.

Em nossa coorte molecular, caracterizada por uma idade média menor, com casos mais graves e com pior estadiamento ENSAT da doença e maior mortalidade, registramos a frequência de 9,37% de alterações no número de cópias (deleções) no gene *ATRX* e 38,70% de alterações no número de cópias no gene *ZNRF3* (11 casos com deleções, e 1 caso com aumento no número de cópias). Essas frequências, resultantes do estudo por MLPA, são superiores as encontradas pelo TCGA e pela coorte européia. As deleções encontradas em nossa coorte nos genes *ATRX* e *ZNRF3* foram heterogêneas, compreendendo pequenas e grandes deleções e acometendo regiões exônicas responsáveis por síntese proteica. A análise do valor prognóstico associado a presença de deleções desses genes não foi relevante estatisticamente. A falta de correlação estatística pode-se justificar tanto pelo número amostral, insuficiente para relevância estatística, assim como pela presença da heterogeneidade nos achados moleculares.

A análise da expressão gênica, do *ATRX* e *ZNRF3*, em nossa coorte se restringiu a um número menor de casos, pela limitação de amostras disponíveis para estudo molecular; e embora tenhamos definido um ponto de corte estatístico para a análise, não conseguimos demonstrar o impacto na sobrevida.

A presença de deleção no gene *ZNRF3* teve associação com uma maior secreção de SDHEA tumoral em nossa coorte, ao mesmo tempo que a maior secreção de SDHEA esteve associada a uma menor sobrevida global. O SDHEA é um dos esteroides mais abundantes circulantes no sangue, e é originário principalmente da córtex da glandula suprarrenal (233). O aumento da síntese de SDHEA é uma característica do CAC e pode facilitar o seu diagnóstico (234, 235). SDHEA junto com outros esteroides (androstenediona, DHEA, DHT, 11-deoxicorticosterona e 17-hidroxi-progesterona) compõe uma assinatura esteroideal plasmática com valor diagnóstico no contexto de CAC, que o diferencia de adenomas secretores, principalmente no sexo feminino (236). Suzuki *et al.* também sugeriram que SDHEA sérico, em combinação com a dosagem de androstenediona, é uma ferramenta útil para o diagnóstico de CAC produtor de cortisol na diferenciação de adenomas produtores de cortisol (237). Tóth *et al.* reportaram que CAC com produção aumentada de SDHEA está associado a um pior prognóstico e a uma menor sobrevida global quando comparados aos CAC com produção diminuída de SDHEA (233), o que está de acordo com nossos resultados.

Há uma grande variabilidade na literatura quanto a definição de idade limite para coortes pediátricas, que varia de 14 a 22 anos em diferentes países (16, 17, 28, 29, 46, 69, 71, 74, 80, 213, 219, 238-245). Para esta coorte consideramos a idade de 15 anos, visto ser o ponto de corte mais adequado para diferenciar a ocorrência de desfechos nos dois grupos, e já ter sido validado internamente e publicado em outros estudos (46, 59, 218, 246, 247). Para a análise da coorte pediátrica usamos a coorte referência de Pinto *et al.* para estudo molecular (110).

A coorte de Pinto *et al.* é uma coorte pediátrica composta por 19 crianças, sendo 78,94% dos casos do gênero feminino, com 63,15% dos casos em menores de 4 anos, e com a ocorrência de tumores menores que 200 gramas em 57,89% da coorte (110). Pinto *et al.* registraram em 15 casos (78,94%) alterações no gene *TP53*, sendo em 10 casos (52,63%) a variante alélica p.R337H-*TP53*. Quanto ao estadiamento da doença, Pinto *et al.* usaram o sistema do Children's Oncology Group - Staging of adrenocortical tumors in children (COG) (80), e através desse sistema identificaram 9 casos (47,36%) com estadiamento COG III ou IV, que referem a maior gravidade da doença. Nessa coorte, houve o registro de alterações no gene *ATRX* em 31,57% (6 casos) (variantes patogênicas somáticas não silentes e deleções de múltiplos exons) e os seis

casos estavam associados a variante patogênica p.R337H-TP53. Através da abordagem pangênômica realizada não foi encontrado alterações no gene *ZNRF3* nessa coorte pediátrica.

Em nossa coorte tivemos 16 crianças e a maioria do sexo feminino, como a coorte de Pinto *et al.* O primeiro pico de incidência de tumor adrenal é na primeira infância (77, 240) sendo que 60% das crianças são diagnosticadas até os 4 anos de idade (29). Em nossa coorte o diagnóstico de TAP ocorreu em 81,25% dos casos em menores de 4 anos e essa frequência está de acordo com a literatura (16, 29, 69-71). A variante alélica p.R337H-TP53 foi encontrada em 87,5% dos casos e está de acordo com outras séries já publicadas (21, 22, 77, 248). Registramos menos casos graves (37,5% com COG III ou IV) quando comparado a coorte de Pinto *et al.* A apresentação clínica predominante foi a síndrome virilizante, com secreção isolada de andrógenos ou associada ao hipercortisolismo, compatível com a frequência já descrita na literatura (15, 16, 19, 29, 77, 249). Registramos 15,38% de alterações no número de cópias no gene *ATRX* (todas deleções) e 30,76% de alterações no número de cópias no gene *ZNRF3* (sendo 3 deleções e 1 caso com aumento no número de cópias). Diferente dos achados de Pinto *et al.*, o gene *ZNRF3* esteve alterado numa frequência importante em nossa coorte pediátrica e o registro dessa alteração genética em pacientes com TAP é inédita na literatura.

Devido ao número pequeno de desfechos na população pediátrica não obtivemos valor estatístico na análise do valor prognóstico de ambos os genes.

A deleção do gene *ZNRF3* teve associação com a ausência da variante patogênica germinativa no *TP53*, com a ausência de mitoses atípicas e com ausência de necrose tumoral em nossa coorte pediátrica.

Mitoses atípicas e necrose tumoral são critérios histopatológicos de avaliação dos tumores adrenocorticais. Mitoses atípicas são consideradas quando há uma distribuição anormal de cromossomos ou um excessivo número de fusos mitóticos, e necrose é registrada quando ocorre em confluentes regiões de células tumoral (250). Necrose é uma característica importante dos CAC, uma vez que adenomas raramente apresentam necrose em sua arquitetura tumoral (251). Picard *et al.* reportaram em sua coorte de 95 TAP que a presença de necrose foi uma característica tumoral que impactou na sobrevida global e na sobrevida livre de progressão de doença, e registraram nessa coorte a presença de óbito apenas no grupo que apresentava necrose tumoral (83). Outras coortes demonstraram a relação entre a presença de necrose tumoral e comportamento maligno de tumores adrenais pediátricos (14, 79, 252, 253). A presença de mitoses atípicas é uma característica considerada em escores para diagnóstico de malignidade como o escore de Weiss e escore de Wienenke (14, 40), indicando malignidade quando presente. É uma característica heterogênea e ocorre tanto em tumores de comportamento benigno quanto

maligno (79, 253), e seu papel como preditor de desfecho em coorte de TAP não está definido (83).

A ligação entre a presença de deleções no gene *ZNRF3* e ausência de variantes patogênicas germinativas no *TP53* não está relatada na literatura. Entretanto, a presença de ambas alterações já foi previamente publicado em casos de CAC (63, 254-256). O gene *TP53*, e sua proteína p53, estão envolvidos em mecanismos de parada do ciclo celular, senescência e apoptose que são desencadeados quando as células são expostas a estresse celular (257, 258). Por esses mecanismos, o gene *TP53* e a p53 são considerados supressores tumoral (257, 258). Variantes patogênicas no *TP53* foi provado ser um dos mecanismos mais comuns associados a tumorigenese, e ocorre em alta frequência em diferentes neoplasias (259-261). A proteína p53 exerce um papel inibitório na via da B-catenina, através da degradação da b-catenin citoplasmática (262-264), e alguns fatores já foram publicados relacionados a essa via comum (262, 264-268). Sadot *et al.* demonstraram em estudos in vitro haver uma retroalimentação negativa entre a beta-catenina e p53, onde o excesso de beta-catenina induz o acúmulo de p53, que por sua vez regula negativamente beta-catenina. O desequilíbrio dessa via p53/Beta-catenina promoveria a tumorigenese. Entretanto, esse mecanismo foi falho em casos de variante patogênica na beta-catenina, uma vez que há ganho de resistência a degradação mediada pelo complexo APC-GSK3-Axin (269).

Alterações na via sinalizadora Wnt/Beta-catenina, na qual o gene *ZNRF3* possui função, e p53/Rb são já documentadas em casos de CAC, e é sabido haver piora do desfecho quando as vias alteradas estão associadas (63, 90, 254). Borges *et al.* demonstraram que o ganho de função na via Wnt/Beta-catenin, associada a perda de função da p53, em ratos, resulta em CAC metastático secretor de corticosteroide (255).

Apesar de termos encontrado relevância estatística na relação entre presença de deleção no *ZNRF3* e ausência da variante patogênica no *TP53*, é necessário novos estudos, prospectivos e funcionas, para comprovar essa relação e determinar o seu valor prognóstico.

A presença da deleção no *ZNRF3* em nossa coorte pediátrica está ligado a fatores que indicam um melhor prognóstico de doença, diferente do que foi encontrado em nossa coorte adulta. Esse dado vem a adicionar a literatura científica mais uma diferença no comportamento tumoral entre o TAP e CAC, reforçando a etiopatogenia distinta de ambas as doenças.

Infelizmente não pudemos avaliar os genes *ATRX* e *ZNRF3* com outras técnicas de sequenciamento genético devido a limitação financeira desse projeto. E, embora haja embasamento para suas funções na tumorigênese, assim como o potencial efeito no comportamento agressivo das neoplasias, pelo estudo de outras séries tumorais, não

conseguimos provar em nossas curvas de sobrevida o impacto negativo direto da presença de alterações genéticas no *ATRX*, e tampouco no *ZNRF3* (118, 123, 133, 138, 142, 144, 151, 152, 158, 270).

A análise da classificação molecular do CAC trouxe um refinamento da etiopatogenia da doença, e possibilidade de um estadiamento de agressividade mais definido, detalhado e individual. A problemática desse refinamento é a oneração do sistema de saúde e disponibilidade limitada de equipamentos de última geração e mão-de-obra super especializada a grandes centros de pesquisas. Visando aproximar os estudos pangenômicos da prática clínica, avaliamos a expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* através da técnica de imunoistoquímica, pela sua disponibilidade e facilidade de uso na prática hospitalar.

Apresentamos uma coorte adulta submetida ao estudo imnohistoquímico mais jovem com idade mediana de 38,17 anos (variação 15,38–85,46 anos), com mais pacientes do sexo feminino e mais óbitos quando comparados com as coortes do TCGA e a coorte europeia (ENSAT e Assie *et al.*) (63, 231). No entanto, a frequência dos estádios do sistema ENSAT em nosso estudo foi muito semelhante a de ambas as coortes.

A análise da proteína *ATRX* considerou a extensão das células imunorreativas nas lâminas histopatológicas. Ao contrário de Mete *et al.* (65) que registraram apenas a perda global de expressão de *ATRX*, optamos pela análise da leitura da imunorreatividade do *ATRX* mais descritiva, baseada em outros estudos de neoplasia (199, 271). A avaliação da proteína *ZNRF3* foi baseada nos estudos de Qiu *et al.* e Yu *et al.* (193, 195), utilizando a caracterização da extensão e intensidade da imunorreatividade citoplasmática do *ZNRF3*.

Mete *et al.* (65) estudaram a expressão da proteína *ATRX* em 43 CAC, em TMA, e sua coorte era composta apenas por pacientes adultos (27-75 anos), com tamanho tumoral médio de 12,8cm, e com seguimento clínico médio de 40,06 meses (4-120meses). Nossa coorte apresentou mais pacientes, com uma abrangência maior de idade no grupo adulto, com tamanho tumoral médio menor e com um tempo de seguimento clínico médio semelhante a coorte de Mete *et al.* (65). As coortes do TCGA e a europeia conjunta não estudaram a expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* para que pudéssemos comparar os resultados. Mete *et al.* mostraram uma perda global da expressão nuclear *ATRX* em 48% da coorte (65). Nós registramos a perda global da expressão de *ATRX* (pontuação 0 na leitura) em 47,5% (n = 38) de nossa coorte. A perda da expressão da proteína *ATRX* e sua associação com a sobrevida livre de doença ou com a presença de desfechos adversos não foi comprovada por Mete *et al.* (65). Nós demonstramos que a baixa expressão de *ATRX*, presente em 52,5% de nossa coorte, impactou negativamente na sobrevida global e na sobrevida livre de recorrência.

O hipercortisolismo tem um impacto negativo na sobrevida global e sobrevida livre de recorrência do CAC, agindo como um preditor de recorrência e morte (31, 48, 272, 273). Embora os CAC secretores de cortisol tenham sido associados a uma pior sobrevida global (274), isso não foi registrado em nossa coorte. ATRX foi altamente expresso (pontuação mediana de 3,08) no grupo que não apresentava hipercortisolismo ao diagnóstico e mostrou uma expressão baixa (pontuação média de 0,5) no grupo que apresentava hipercortisolismo ao diagnóstico. Entretanto, o papel do ATRX na secreção de cortisol é desconhecido. Estudos funcionais deverão elucidar se o gene ATRX apresenta efeito na esteroidogênese adrenal, inibindo a produção de cortisol.

A presença da sinalização Wnt / β -catenina é estabelecida em diferentes neoplasias (231, 275, 276), e o gene ZNRF3 atua como um supressor dessa via (63, 173, 188, 190, 277-279). Tissier *et al.* demonstraram o papel de Wnt / β -catenina na tumorigênese adrenal (280). Eles registraram a sinalização Wnt / β -catenina ativa, através do acúmulo de β -catenina citoplasmática/nuclear difusa nas células tumorais, em 77% da sua coorte com CAC (280). Demonstramos que a presença da expressão proteica de ZNRF3 está correlacionada com a expressão de β -catenina na membrana celular, o que suporta o racional de que a proteína ZNRF3 é um regulador negativo da via, mantendo a via desativada.

A alta expressão protéica de ZNRF3 foi associada a tumores com menor tamanho em nossa coorte. A expressão de ZNRF3 foi negativamente correlacionada com o peso e o tamanho tumoral. Qin *et al.* avaliaram a expressão proteica de ZNRF3 em uma coorte de pacientes com câncer gástrico e mostraram que a expressão de ZNRF3 estava associada com tamanho tumoral menor (192). Eles também reportaram que a superexpressão de ZNRF3 predispõe a mais apoptose e redução da proliferação de células cancerosas, reduzindo o nível de Lgr5, da via Wnt / β -catenina, enquanto também reduz Gli1, um componente da sinalização Hedgehog (SHH) (192). Gomes *et al.* mostraram que a via de SHH é regulada positivamente em adultos CAC e é regulada negativamente em TAP (281). Ainda não há dados na literatura sobre a relação do ZNRF3 na via do SHH adrenal. Estudos funcionais poderão contribuir nesse campo, evidenciando se há ligação entre o gene ZNRF3 e o gene TP53, assim como se o gene ZNRF3 possui função na via SHH.

Qiu *et al.* demonstraram a regulação negativa da expressão da proteína ZNRF3 em linhas celulares de carcinoma papilífero de tireoide humano (195). Eles reportaram que a superexpressão de ZNRF3 inibe fortemente as capacidades migratórias e invasivas das células cancerosas (195). Yu *et al.* revelaram que a forte expressão de ZNRF3 teve associação com uma melhor sobrevida livre de doença e sobrevida global em uma coorte de carcinoma

colorretal (193). Mostramos que a baixa expressão de ZNRF3 impactou negativamente na análise de sobrevida global e SLR nesta coorte de CAC.

O marcador de proliferação Ki67 é considerado um fator prognóstico em CAC localizado e é uma ferramenta importante para prever a recorrência após a ressecção cirúrgica completa (45). Alguns estudos documentaram a função do Ki67 como marcador de proliferação celular, agregando valor no cenário de CAC (53, 57, 282, 283). Categorizamos a leitura do marcador de proliferação Ki67 em grupos ($<10\%$, $\geq 10\%$ e $<20\%$, $\geq 20\%$), conforme sugerido por Beuschlein *et al.* (45), e confirmamos a associação de Ki67 com a sobrevida global e SLR. Os níveis de expressão das proteínas ATRX e ZNRF3 não se mostraram associados ao marcador de proliferação Ki67.

Como *ATRX* e *ZNRF3* pertencem a vias sinalizadoras independentes, e foram considerados marcadores prognósticos nesta coorte para CAC, nós analisamos a associação de baixos valores de expressão de ambas as proteínas quanto a sobrevida global. Os baixos níveis de expressão combinados apresentaram um valor prognóstico negativo para esta coorte, mais relevante estatisticamente quando comparado ao estudo das expressões de forma isolada.

Tumores com sinalização Wnt/ β -catenina ativa devido a variantes patogênicas nos genes *CTNNB1*, *ZNRF3* ou *APC* apresentam um prognóstico sombrio, de acordo com TCGA (231). TCGA relatou que a alta expressão de transcrito de *ZNRF3* associou-se a uma baixa taxa de sobrevida na coorte de CAC (231), e pelo contrário, nós mostramos que uma baixa expressão da proteína ZNRF3 está ligada a uma baixa taxa de sobrevida global, e pior sobrevida livre de recorrência.

Os níveis de proteína e transcrito são concordantes na maioria dos casos. A hipótese aventada para essa discordância, baseada na fisiologia já conhecida do *ZNRF3*, é que a expressão da proteína ZNRF3 pode ser mais dependente das atividade das proteínas R-espondinas, por meio de mecanismos dependentes e independentes de LGR, refletindo sua atividade, do que da quantidade absoluta de seu transcrito.

Pacientes classificados como risco baixo ou moderado para recorrência (ENSAT I ou II, apresentando ressecção microscopicamente completa e $Ki67 \leq 10\%$) (10) podem se beneficiar do uso desses novos marcadores prognóstico. A presença de baixos níveis de expressão proteica de ATRX e ZNRF3 pode orientar a conduta médica nesses pacientes para o tratamento precoce adjuvante, uma vez que esses marcadores prognósticos apresentaram associação com os desfechos.

Em relação às variantes patogênicas germinativas do *TP53*, dois pacientes apresentaram variante p.R337H-*TP53* (casos 51 e 58), e um paciente apresentou p.R273H-*TP53* (caso 68)

(Anexo G). Os três casos apresentaram hipercortisolismo ao diagnóstico e tiveram desfecho fatal devido o CAC; entretanto, os casos apresentaram expressão variável de ATRX e expressão variável de ZNRF3. Ainda não está claro se uma associação entre a perda de expressão proteica do gene *ATRX* e as variantes patogênicas germinativas do *TP53* existe e se poderia impactar a sobrevida global ou livre de recorrência na população adulta de CAC. No entanto, a associação entre os dois genes já foi publicada na coorte de tumor adrenocortical pediátrico e em outras coortes de doenças malignas, com valor prognósticos associado (110, 144, 151, 154, 284).

A coorte referência para TAP de Pinto *et al.* não publicou dados referentes a expressão proteica, e não há estudos na literatura que tenham analisado a expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* na população pediátrica para comparação. A coorte pediátrica submetida ao estudo imunohistoquímico compreendeu 47 casos de tumor adrenal pediátrico. E embora seja considerada uma amostra importante visto a rara incidência da doença, não alcançamos valor estatístico em nossas análises quanto a sobrevida.

A expressão proteica de ATRX nos casos pediátricos teve relação com o escore de Wienecke e com o escore de Weiss. Os casos com fraca expressão de ATRX, apresentaram um escore de Wienecke com mediana de 2 com um intervalo de pontuação maior, de 0 a 6, enquanto que os casos com forte expressão apresentaram escore de Wienecke mediana de 1, com intervalo menor, pontuando de 0 a 2. A expressão proteica de ATRX também apresentou correlação negativa com o escore de Wienecke, o que significa que quanto maior a expressão de ATRX, menor é o escore de Wienecke pontuado. Embora sejam resultados estatísticos significantes, na prática clínica acaba não havendo relevância pela sobreposição de intervalos e aproximação dos valores médios e medianos de referência. Pacientes que apresentam um escore de Wienecke abaixo de 2 pontos tendem a apresentar um comportamento tumoral benigno (88). Martins-Filho demonstrou em sua coorte que um escore de Wienecke maior impactou na sobrevida global e sobrevida livre de doença em sua coorte com TAP (46). Outras coortes de TAP também validaram esse escore (74, 79, 83, 252, 253).

O escore de Weiss é classicamente usado para diagnosticar CAC em adultos, e sua utilização em cortes pediátricas é pouco usado devido a inconsistência nos achados histopatológicos com o comportamento tumoral, diferente do que ocorre no grupo adulto. Entretanto, Martins-Filho *et al.* demonstraram que o escore de Weiss maior ou igual a 5 foi capaz de prever comportamento tumoral maligno numa coorte de 44 pacientes pediátricos (46). Em nossa coorte demonstramos que a forte expressão de ATRX teve associação com um escore de Weiss menor (mediana 2,5 pontos) e a fraca expressão associou-se com um escore de

Weiss maior (mediana de 5 pontos). Corrobora com esse resultado o fato da expressão de *ATRX*, como variável contínua, apresentar correlação negativa com o escore de Weiss.

O marcador de proliferação Ki67 apresenta alta acurácia para predizer comportamento tumoral do TAP, apresentando um valor na leitura menor (mediana de 7%) em casos com comportamento benigno. Martins-Filho *et al.* demonstraram que uma leitura <10% do Ki67 foi capaz de excluir casos de TAP com comportamento maligno, assim como demonstrou a relação entre Ki67 maior ou igual a 15% e uma pior sobrevida global e sobrevida livre de doença. Em nossa coorte, a forte expressão de *ATRX* apresentou associação com uma menor pontuação na leitura de Ki67, média de 2,5%, com mediana de 2,5 % (intervalo 0-5), enquanto que os casos com baixa expressão apresentaram Ki67 média de 16,5%, com mediana de 10% (intervalo 0-50%). Os dados registrados evidenciam uma potencial associação entre a expressão de *ATRX* e marcadores prognósticos na coorte pediátrica. Contudo, estudos maiores devem confirmar essas associações e função prognóstica do gene *ATRX* em crianças.

A expressão proteica do *ZNRF3* não correlação com a variáveis estudadas nessa coorte pediátrica com TAP.

O conhecimento da biologia tumoral é um passo importante na individualização do acompanhamento médico, permitindo a concepção de melhores abordagens clínicas e tratamentos direcionados. Este estudo aproximou os estudos pan-genômicos da prática clínica com uma ferramenta de fácil acesso, expressão proteica dos genes *ATRX* e *ZNRF3* por imunohistoquímica, para refinar o prognóstico em pacientes adultos com CAC. Essa mesma ferramenta se mostrou promissora em pacientes pediátricos pelas correlações com fatores prognósticos já estabelecidos, entretanto estes dados devem ser validados em outras coortes.

6 CONCLUSÕES

6.1.Conclusões

- Nas coortes adulta e pediátrica, com CAC e TAP respectivamente, demonstramos alterações no número de cópias dos genes *ATRX* e *ZNRF3*, em sua grande maioria devido a deleções.
- A expressão dos genes *ATRX* e *ZNRF3* não se correlacionou com parâmetros clínicos, hormonais e moleculares em ambas as coortes, adulta e pediátrica.
- A baixa expressão proteica, de *ATRX* e *ZNRF3*, apresentou valor prognóstico na coorte adulta com CAC, com impacto negativo na sobrevida global e sobrevida livre de recorrência.
- A expressão proteica de *ATRX* é uma ferramenta promissora como fator prognóstico para pacientes pediátricos com TAP, apresentando correlação com fatores prognósticos previamente estabelecidos em coortes com TAP.

Apêndice A. Fluxograma para avaliação e tratamento do CAC

Fluxograma para avaliação e tratamento do CAC

Apêndice B. Fluxograma para avaliação e tratamento do TAP

Apêndice C. Termo de consentimento livre e esclarecido e o termo de assentimento livre e esclarecido utilizados nesse estudo

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa:

“Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical”

Pesquisador responsável: Dra. Maria Candida Barisson Villares Frago

Pesquisador executante: Vânia Balderrama Brondani (aluna de Doutorado Direto / HCFMUSP)

Departamento/Instituto: Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Geral, da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

Você está sendo convidado a participar desta pesquisa. Leia este termo de consentimento livre e esclarecido. Sua decisão em participar deste estudo é voluntária **sendo garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento** e você poderá deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

O tumor do córtex suprarrenal (tumor adrenocortical) é um tumor raro da glândula suprarrenal que pode ser causado por alterações genéticas, como a já conhecida mutação no gene *TP53*. Estudos recentes demonstraram a existência de novos genes envolvidos no desenvolvimento desses tumores, e entre eles estão o *ATRX* e o *ZNRF3*. **Essa pesquisa irá estudar a presença de mutação nos genes ATRX e ZNRF3 em pacientes adultos e pediátricos que apresentam tumor do córtex da suprarrenal.**

Para estudar a presença destas mutações há necessidade de coleta de sangue para análise de material genético e dos tumores já operados. O sangue será coletado inicialmente, através de uma punção venosa com agulha. Dele e do tecido tumoral, que está conservado em bloco de parafina no arquivo da patologia deste Hospital ou armazenado em nitrogênio líquido no LIM42, serão extraídos o material genético para pesquisar as possíveis mutações relacionadas a esses dois genes (*ATRX* e *ZNRF3*).

O desconforto que pode vir a sentir é a picada da agulha em seu braço para a retirada do sangue. Os riscos desse procedimento são pequenos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

Os benefícios que você poderá ter é a informação sobre o envolvimento desses genes com o desenvolvimento do seu tumor, e assim programar os exames de rastreamento mais precocemente.

O material biológico (sangue) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), no 2º andar do Prédio dos Ambulatórios (PAMB) do Hospital das Clínicas. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Toda pesquisa só é realizada com aprovação do sistema CEP – CONEP, que são os órgãos que fiscalizam a ética em pesquisa no Hospital das Clínicas da FMUSP.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Você não terá despesas pessoais para participar do estudo incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é **Dra Maria Candida Barisson Villares Fragoso CRM 67.970** (Médica Endocrinologista, Chefe da Unidade de Suprarrenal – Matrícula: 48169) e o executante será a aluna de Doutorado Direto da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da USP: **Vânia Balderrama Brondani CRM 179.575**, que poderão ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 5º andar, bloco 4B do PAMB, tel: 26613358.

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, 225 – 5º andar – tel: 2661-7585 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Qualquer informação coletada é estritamente confidencial. Seu nome nunca será revelado nos relatórios do estudo e sua identidade não será comunicada a terceiros, podendo ser fornecido apenas aos médicos envolvidos nesta pesquisa. Os dados obtidos na pesquisa poderão ser utilizados para futuras publicações, respeitando-se a confidencialidade de cada paciente.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “*Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical*”. Eu discuti as informações acima com os Pesquisadores Responsáveis **Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso** e/ou **Dra. Vânia Balderrama Brondani** sobre a minha decisão em participar nesse 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 um via rubricada pelo pesquisador.

____/____/____
Data

Nome do paciente/RG

Assinatura do paciente ou responsável legal

Testemunha: Nome/RG

Pesquisador Executante: **Vânia Balderrama Brondani**

Pesquisador Responsável: **Maria Candida Barisson Villares Fragoso**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título da Pesquisa:

“Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical”

Pesquisador responsável: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Pesquisador executante: Vânia Balderrama Brondani (aluna de Doutorado Direto / HCFMUSP)

Departamento/Instituto: Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Geral, da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

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 NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
Complemento..... BAIRRO: CIDADE.....
CEP:.....
TELEFONE: (.....)

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

Se houver etiqueta de identificação, colar aqui:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
Para crianças e adolescentes

Título da Pesquisa:

“Análise dos genes *ATRX* e *ZNRF3* como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical”

Pesquisador responsável: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Pesquisador executante: Vânia Balderrama Brondani (aluna de Doutorado Direto / HCFMUSP)

Departamento/Instituto: Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Geral, da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

Seu (sua) filho(a) está sendo convidado (a) a participar desta pesquisa. Leia este termo de consentimento livre e esclarecido. A decisão em participar deste estudo é voluntária **sendo garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento** e vocês poderão deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do tratamento na Instituição.

O tumor do córtex suprarrenal (tumor adrenocortical) é um tumor raro da glândula suprarrenal que pode ser causado por alterações genéticas, como a já conhecida mutação no gene *TP53*. Estudos recentes demonstraram a existência de novos genes envolvidos no desenvolvimento desses tumores, e entre eles estão o *ATRX* e o *ZNRF3*. **Essa pesquisa irá estudar a presença de mutação nos genes *ATRX* e *ZNRF3* em pacientes adultos e pediátricos que apresentam tumor do córtex da suprarrenal.**

Para estudar a presença destas mutações há necessidade de coleta de sangue para análise de material genético e dos tumores já operados. O sangue será coletado inicialmente, através de uma punção venosa com agulha. Dele e do tecido tumoral, que está conservado em bloco de parafina no arquivo da patologia deste Hospital ou armazenado em nitrogênio líquido no LIM42, serão extraídos o material genético para pesquisar as possíveis mutações relacionadas a esses dois genes (*ATRX* e *ZNRF3*).

O desconforto que o paciente pode vir a sentir é a picada da agulha em seu braço para a retirada do sangue. Os riscos desse procedimento são pequenos, como a formação de hematomas ou pequeno sangramento local.

Os benefícios que vocês poderão ter é a informação sobre o envolvimento desses genes com o desenvolvimento do tumor, e assim programar os exames de rastreamento mais precocemente.

O material biológico (sangue) obtido para esta pesquisa será armazenado de acordo com a resolução 441/2011 no Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM42), no 2º andar do Prédio dos Ambulatórios (PAMB) do Hospital das Clínicas. O pesquisador tem o compromisso de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa. Toda pesquisa só é realizada com aprovação do sistema CEP – CONEP, que são os órgãos que fiscalizam a ética em pesquisa no Hospital das Clínicas da FMUSP.

As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Vocês não terão despesas pessoais

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
Para crianças e adolescentes

para participar do estudo incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à participação.

Vocês terão acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é **Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso CRM 67.970** (Médica Endocrinologista, Chefe da Unidade de Suprarrenal – Matrícula: 48169) e o executante será a aluna de Doutorado Direto da Pós-Graduação da Faculdade de Medicina da USP: **Vânia Balderrama Brondani CRM 179.575**, que poderão ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 5º andar, bloco 4B do PAMB, tel: 26613358.

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, 225 – 5º andar – tel: 2661-7585 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

Qualquer informação coletada é estritamente confidencial. Os nomes nunca serão revelados nos relatórios do estudo e a identidade não será comunicada a terceiros, podendo serem fornecidos apenas aos médicos envolvidos nesta pesquisa. Os dados obtidos na pesquisa poderão ser utilizados para futuras publicações, respeitando-se a confidencialidade de cada paciente.

Fui suficientemente informado a respeito do estudo “*Análise dos genes ATRX e ZNRK3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical*”. Eu discuti as informações acima com os Pesquisadores Responsáveis **Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso** e/ou **Dra. Vânia Balderrama Brondani** sobre a decisão em participar nesse 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 um via rubricada pelo pesquisador.

_____/_____/_____
Data

Nome do paciente/RG

Assinatura do paciente ou responsável legal

Testemunha: Nome/RG

Pesquisador Executante: **Vânia Balderrama Brondani**

Pesquisador Responsável: **Maria Candida Barisson Villares Fragoso**

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
Para crianças e adolescentes

Título da Pesquisa:

“Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical”

Pesquisador responsável: Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso

Pesquisador executante: Vânia Balderrama Brondani (aluna de Doutorado Direto / HCFMUSP)

Departamento/Instituto: Serviço de Endocrinologia e Metabologia do Departamento de Clínica Geral, da Divisão de Clínica Médica I do Instituto Central – ICHC

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 NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº
Complemento..... BAIRRO: CIDADE.....
CEP:.....
TELEFONE: (.....)

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

Se houver etiqueta de identificação, colar aqui:

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Para crianças e adolescentes

Você está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “*Análise dos genes ATRX e ZNR3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical*” coordenada pela professora **Dra. Maria Candida Barisson Villares Fragoso CRM 67.970** e executada pela aluna de Doutorado **Vânia Balderrama Brondani CRM 179.575**, que poderão ser encontradas no endereço Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 5º andar, bloco 4B do PAMB, tel: 26613358.

Seus pais/responsáveis permitiram que você participe.

Queremos saber um pouco mais sobre o tumor da glândula suprarrenal. Os novos estudos mostraram que há alterações no DNA (carga genética) do tumor que fazem mudar o seu comportamento. Há uma alteração, que já conhecemos, no local *TP53* do DNA e estudos recentes demonstraram a existência de novas alterações, nos locais: *ATRX* e *ZNR3*. **Essa pesquisa irá estudar a presença dessas alterações no DNA dos tumores em pacientes adultos, adolescentes e crianças.**

A pesquisa será feita no Hospital das Clínicas. Para nosso estudo precisamos coletar sangue dos pacientes para análise do seu DNA e dos tumores já operados. O sangue será coletado, através de uma punção venosa com agulha. O desconforto que você pode vir a sentir é a picada da agulha em seu braço para a retirada do sangue. Os riscos da coleta do sangue são pequenos, como a formação de um roxo na pele ou uma pequena saída de sangue no local, que cicatriza rápido. Caso aconteça algo errado, ou se você tiver dúvidas, você pode nos procurar pelos telefones que estão no começo do texto. As coisas boas que podem acontecer com essa pesquisa é aprendermos mais sobre esse raro tumor, e podermos no futuro oferecer novos tratamentos e cuidados para os pacientes.

Você só precisa participar da pesquisa se quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir, ou não quiser participar.

Ninguém saberá que você está participando da pesquisa; não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Qualquer informação coletada é segredo. Seu nome nunca será revelado nos relatórios do estudo e sua identidade não será comunicada a pessoas estranhas, podendo apenas ser fornecida aos médicos envolvidos nesta pesquisa.

Os dados obtidos na pesquisa poderão ser utilizados para futuras publicações, para podermos ensinar outros médicos sobre o tumor, mas sem identificar as pessoas que participaram.

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, 225 – 5º andar – tel: 2661-7585 – E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br.

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO -
HCFMUSP

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
Para crianças e adolescentes

ASSENTIMENTO PÓS INFORMADO

Eu _____ aceito participar da pesquisa *“Análise dos genes ATRX e ZNRF3 como Fator Prognóstico do Carcinoma Adrenocortical”*

Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer.

Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir e que ninguém vai ficar com raiva de mim.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis.

Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Nome do menor/RG

Assinatura do menor

Testemunha: Nome/RG

Pesquisador Executante: **Vânia Balderrama Brondani**

Pesquisador Responsável: **Maria Candida Barisson Villares Fragoso**

Apêndice D. Desenho esquemático da coorte total de tumores de CAC e TAP

Apêndice E. Análise dos genes *ATRX* e *ZNRK3* usando MLPA

Análise do gene *ATRX* usando MLPA - amostra estudada da coorte adulta.

Paciente masculino, #10, apresentando número de cópias normal no gene *ATRX* ($0.8 < DQ < 1.2$).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio ^H	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
392	ATRX-35	Xq21.1	X-076.647410	1951	19811	1,04	0,05	=	=	77	0,0
436	ATRX-35	Xq21.1	X-076.650161	1367	14947	1,02	0,05	=	=	81	0,0
471	ATRX-34	Xq21.1	X-076.662928	1463	17006	1,06	0,05	=	=	82	0,0
207	ATRX-33	Xq21.1	X-076.663521	1689	16230	1,08	0,07	=	=	73	0,1
142	ATRX-32	Xq21.1	X-076.664443	2003	18243	1,09	0,06	=	=	59	0,0
244	ATRX-31	Xq21.1	X-076.665469	1832	17344	1,06	0,05	=	=	73	0,1
312	ATRX-30	Xq21.1	X-076.699666	1930	19578	1,05	0,05	=	=	87	0,0
185	ATRX-29	Xq21.1	X-076.700803	1884	17011	1,06	0,04	=	=	62	0,1
154	ATRX-28	Xq21.1	X-076.716366	1846	16008	0,94	0,04	=	=	59	0,0
454	ATRX-27	Xq21.1	X-076.731973	1179	13567	0,94	0,04	=	=	79	0,0
418	ATRX-26	Xq21.1	X-076.735871	1323	14229	1,12	0,05	>>	=	76	0,0
238	ATRX-25	Xq21.1	X-076.741577	1996	18809	1,03	0,04	=	=	68	0,0
346	ATRX-24	Xq21.1	X-076.741833	1509	15990	1,07	0,05	=	=	84	0,0
226	ATRX-23	Xq21.1	X-076.742585	2035	18991	1,05	0,05	=	=	73	0,0
196	ATRX-22	Xq21.1	X-076.758702	2017	18421	1,08	0,05	=	=	63	0,1
269	ATRX-21	Xq21.1	X-076.760931	1949	19646	1,07	0,05	=	=	81	0,0
202	ATRX-20	Xq21.1	X-076.762515	1935	17701	1,06	0,04	=	=	66	0,1
301	ATRX-19	Xq21.1	X-076.775446	1810	17921	1,07	0,05	=	=	70	0,0
263	ATRX-18	Xq21.1	X-076.775688	1596	15489	1,1	0,05	=	=	62	0,1
445	ATRX-17	Xq21.1	X-076.776713	1286	14983	0,99	0,04	=	=	96	0,0
275	ATRX-16	Xq21.1	X-076.778117	1792	17759	1,05	0,05	=	=	71	0,0
372	ATRX-15	Xq21.1	X-076.794342	1565	16953	0,99	0,05	=	=	83	-0,1
409	ATRX-14	Xq21.1	X-076.796324	1696	17847	1,02	0,05	=	=	79	0,0
319	ATRX-13	Xq21.1	X-076.798712	1836	18687	1,12	0,05	=	=	95	0,0
232	ATRX-12	Xq21.1	X-076.805644	1720	15581	0,97	0,04	=	=	63	0,1
355	ATRX-11	Xq21.1	X-076.806788	999	10893	0,93	0,04	=	=	72	0,0
256	ATRX-10	Xq21.1	X-076.818354	1856	17488	1,04	0,04	=	=	63	0,1
214	ATRX-9	Xq21.1	X-076.823865	2005	17725	1,03	0,04	=	=	67	0,1
283	ATRX-9	Xq21.1	X-076.826528	1828	18760	1,06	0,05	=	=	85	0,0
171	ATRX-8	Xq21.1	X-076.827110	1870	16956	1,02	0,06	=	=	67	0,0
250	ATRX-7	Xq21.1	X-076.831004	1987	20406	1,02	0,05	=	=	78	0,1
178	ATRX-6	Xq21.1	X-076.835982	1941	18462	1,02	0,05	=	=	74	0,1
481	ATRX-5	Xq21.1	X-076.838709	820	9362	0,94	0,04	=	=	64	0,0
328	ATRX-4	Xq21.1	X-076.839742	1767	19421	1,02	0,04	=	=	101	0,0
401	ATRX-3	Xq21.1	X-076.840582	1818	19690	1,09	0,05	=	=	91	0,0
364	ATRX-2	Xq21.1	X-076.859289	1654	18244	1,04	0,05	=	=	95	0,0
135	ATRX-1	Xq21.1	X-076.928192	1962	17168	1,05	0,05	=	=	63	0,0
383	Reference*	Xp22.13	X-018.547898	1647	16906	1,08	0,05	=	=	89	0,0
220	Reference*	Xp21.1	X-032.215616	1974	18153	1	0,04	=	=	60	0,0
160	Reference*	Xp11.4	X-041.299793	1786	16111	1	0,04	=	=	77	0,0
427	Reference*	Xp11.23	X-046.621896	1669	18684	0,96	0,04	=	=	85	0,0
490	Reference*	Xp11.22	X-053.471966	1370	15820	0,97	0,04	=	=	89	0,0
190	Reference*	Xq12	X-066.858434	1785	15898	1	0,04	=	=	58	0,0
337	Reference*	Xq22.1	X-100.513256	1740	17315	1,16	0,08	=	=	81	0,1
130	Reference*	Xq23	X-115.218140	1888	15895	1,03	0,06	=	=	65	0,0
148	Reference*	Xq25	X-123.332987	2169	18249	1,12	0,05	=	=	53	0,0
Median value all probe values:				1814	17416	1,04	0,05			73,5	0,02

Análise do gene ATRX usando MLPA - controle positivo.
Paciente masculino, controle positivo, apresentando deleção no gene ATRX (DQ=0).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio ⁷	Stddev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
392	ATRX-35	Xq21.1	X-076,647410	5286	43105	0,96	0,07	=	=	61	0,1
436	ATRX-35	Xq21.1	X-076,650161	4225	37508	1,02	0,07	=	=	64	0,0
471	ATRX-34	Xq21.1	X-076,662928	4490	39967	0,98	0,07	=	=	59	0,0
207	ATRX-33	Xq21.1	X-076,663521	4855	31100	1,06	0,07	=	=	40	0,0
142	ATRX-32	Xq21.1	X-076,664443	4713	32218	0,91	0,07	=	=	47	0,0
244	ATRX-31	Xq21.1	X-076,665469	5279	34828	1,02	0,08	=	=	24	0,0
312	ATRX-30	Xq21.1	X-076,699666	626	5159	0,11	0,01	<<*	<<*	57	0,0
185	ATRX-29	Xq21.1	X-076,700803	517	3608	0,1	0,01	<<*	<<*	42	0,0
154	ATRX-28	Xq21.1	X-076,716366	536	3351	0,1	0,01	<<*	<<*	22	0,0
454	ATRX-27	Xq21.1	X-076,731973	370	3149	0,1	0,01	<<*	<<*	39	-0,1
418	ATRX-26	Xq21.1	X-076,735871	421	3596	0,11	0,01	<<*	<<*	43	0,0
238	ATRX-25	Xq21.1	X-076,741577	604	4520	0,11	0,01	<<*	<<*	48	0,0
346	ATRX-24	Xq21.1	X-076,741833	524	3886	0,11	0,01	<<*	<<*	27	0,0
226	ATRX-23	Xq21.1	X-076,742585	621	4057	0,11	0,01	<<*	<<*	26	0,0
196	ATRX-22	Xq21.1	X-076,758702	578	4071	0,12	0,01	<<*	<<*	33	0,0
269	ATRX-21	Xq21.1	X-076,760931	607	4567	0,11	0,01	<<*	<<*	48	0,0
202	ATRX-20	Xq21.1	X-076,762515	488	3625	0,09	0,01	<<*	<<*	42	0,0
301	ATRX-19	Xq21.1	X-076,775446	571	4332	0,11	0,01	<<*	<<*	50	0,0
263	ATRX-18	Xq21.1	X-076,775688	415	2964	0,1	0,01	<<*	<<*	27	0,0
445	ATRX-17	Xq21.1	X-076,776713	397	3280	0,11	0,01	<<*	<<*	31	-0,1
275	ATRX-16	Xq21.1	X-076,778117	580	4188	0,11	0,01	<<*	<<*	32	0,0
372	ATRX-15	Xq21.1	X-076,794342	529	4596	0,1	0,01	<<*	<<*	40	0,0
409	ATRX-14	Xq21.1	X-076,796324	559	4478	0,1	0,01	<<*	<<*	33	0,0
319	ATRX-13	Xq21.1	X-076,798712	570	4238	0,12	0,01	<<*	<<*	35	0,0
232	ATRX-12	Xq21.1	X-076,805644	526	3927	0,1	0,01	<<*	<<*	50	0,0
355	ATRX-11	Xq21.1	X-076,806788	348	3021	0,1	0,01	<<*	<<*	44	0,0
256	ATRX-10	Xq21.1	X-076,818354	571	3804	0,11	0,01	<<*	<<*	34	0,0
214	ATRX-9	Xq21.1	X-076,823865	583	3851	0,11	0,01	<<*	<<*	31	0,0
283	ATRX-9	Xq21.1	X-076,826528	564	4180	0,11	0,01	<<*	<<*	28	0,0
171	ATRX-8	Xq21.1	X-076,827110	500	3375	0,1	0,01	<<*	<<*	36	0,0
250	ATRX-7	Xq21.1	X-076,831004	567	3900	0,11	0,01	<<*	<<*	25	0,0
178	ATRX-6	Xq21.1	X-076,835982	569	3748	0,1	0,01	<<*	<<*	38	0,0
481	ATRX-5	Xq21.1	X-076,838709	265	2495	0,1	0,01	<<*	<<*	41	-0,1
328	ATRX-4	Xq21.1	X-076,839742	567	4805	0,1	0,01	<<*	<<*	56	0,0
401	ATRX-3	Xq21.1	X-076,840582	532	4047	0,1	0,01	<<*	<<*	28	0,0
364	ATRX-2	Xq21.1	X-076,859289	556	4387	0,11	0,01	<<*	<<*	35	0,0
135	ATRX-1	Xq21.1	X-076,928192	5126	35376	1,03	0,07	=	=	69	0,0
383	Reference*	Xp22.13	X-018,547898	7663	64085	1,71	0,13	>>*	>>*	52	-0,1
220	Reference*	Xp21.1	X-032,215616	4881	34984	0,93	0,05	=	=	59	0,0
160	Reference*	Xp11.4	X-041,299793	4661	31177	0,96	0,06	=	=	53	0,0
427	Reference*	Xp11.23	X-046,621896	5235	44666	1,04	0,06	=	=	55	0,0
490	Reference*	Xp11.22	X-053,471966	3978	38040	0,97	0,07	=	=	53	-0,1
190	Reference*	Xq12	X-066,858434	4382	29658	0,94	0,05	=	=	60	0,0
337	Reference*	Xq22.1	X-100,513256	5497	41023	1,13	0,07	=	=	58	0,0
130	Reference*	Xq23	X-115,218140	4982	32027	0,96	0,08	=	=	52	0,0
148	Reference*	Xq25	X-123,332987	5460	35109	1,03	0,06	=	=	46	0,0
Median value all probe values:				574	4360	0,11*	0,01			42	0,01

Análise do gene ZNRF3 usando MLPA - amostra estudada da coorte adulta.
Paciente masculino, #17, apresentando número de cópias normal no gene ZNRF3 ($0.8 < DQ < 1.2$).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio ^H	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
301	CHEK2-3	22q12.1	22-027,451241	1881	17210	0,94	0,03	=	=	60	-0,1
220	HSCB-2	22q12.1	22-027,469901	1978	17824	1	0,04	=	=	69	-0,1
250	CCDC117-4	22q12.1	22-027,506949	1861	14313	0,98	0,03	=	=	44	-0,1
418	XBP1-5	22q12.1	22-027,521635	933	9810	1,05	0,03	=	=	87	0,0
382	ZNRF3-up	22q12.1	22-027,547939	1504	14383	0,97	0,03	=	=	77	-0,1
202	ZNRF3-1	22q12.1	22-027,609930	1824	13552	0,96	0,03	=	=	40	0,0
178	ZNRF3-2	22q12.1	22-027,643350	1866	13626	1	0,03	=	=	47	-0,1
238	ZNRF3-2	22q12.1	22-027,643411	2222	18196	1,01	0,03	=	=	63	-0,1
148	ZNRF3-3	22q12.1	22-027,713058	1935	15567	1,03	0,04	=	=	62	-0,1
256	ZNRF3-int3	22q12.1	22-027,752531	1873	15119	1,05	0,03	=	=	51	-0,1
310	ZNRF3-int3	22q12.1	22-027,757374	1805	17113	1,18	0,03	>>	=	90	-0,2
214	ZNRF3-4	22q12.1	22-027,768513	1923	15355	0,98	0,03	=	=	68	-0,1
142	ZNRF3-5	22q12.1	22-027,769333	1700	13400	0,93	0,04	=	=	70	-0,1
364	ZNRF3-6	22q12.1	22-027,770777	1815	18386	1,06	0,03	=	=	88	-0,1
232	ZNRF3-7	22q12.1	22-027,772828	2110	17579	0,98	0,03	=	=	69	-0,1
328	ZNRF3-8	22q12.1	22-027,774373	2031	18388	1,09	0,03	>>	=	62	-0,1
184	ZNRF3-9	22q12.1	22-027,775536	2187	17043	1,04	0,03	=	=	63	-0,1
160	ZNRF3-9	22q12.1	22-027,776142	1829	13409	1,02	0,04	=	=	44	-0,1
265	ZNRF3-10	22q12.1	22-027,779587	2195	18699	1,08	0,03	>>	=	82	-0,2
195	C22orf31-2	22q12.1	22-027,786476	1935	14796	0,93	0,04	=	=	47	0,0
355	KREMEN1-4	22q12.1	22-027,847389	1514	13873	1	0,03	=	=	56	-0,1
391	EMID1-3	22q12.2	22-027,941499	1651	16716	1,1	0,03	>>	=	96	0,0
292	AP1B1-1	22q12.2	22-028,114443	2224	20352	1	0,03	=	=	87	-0,1
165	NF2-12	22q12.2	22-028,399291	1630	12895	0,98	0,04	=	=	65	-0,1
409	UROD*	01p34.1	01-045,253029	1021	10830	1	0,03	=	=	74	0,0
377	F5*	01q24.2	01-167,750074	1356	13100	1	0,03	=	=	65	0,0
427	PSEN2*	01q42.13	01-225,138106	1305	13930	1,04	0,03	=	=	83	0,1
372	SPAST*	02p22.3	02-032,221933	1033	10133	0,9	0,03	<<	=	74	0,0
130	DYSF*	02p13.2	02-071,750347	1747	13188	1	0,04	=	=	65	0,0
154	EDAR*	02q13	02-108,906225	1825	14303	1,05	0,05	=	=	62	-0,1
208	SLC40A1*	02q32.2	02-190,138497	1894	16516	0,98	0,03	=	=	84	0,0
319	SCN5A*	03p22.2	03-038,570946	1500	14185	1,01	0,04	=	=	86	-0,2
274	CPOX*	03q11.2	03-099,790321	1871	16429	1,04	0,04	=	=	62	-0,2
172	PKHD1*	06p12.2	06-052,046209	1920	14217	0,96	0,03	=	=	42	-0,1
244	SIM1*	06q16.3	06-101,001941	1760	15382	0,99	0,03	=	=	66	-0,1
226	DNAI1*	09p13.3	09-034,480008	2251	18838	1,01	0,03	=	=	66	-0,1
400	UPF2*	10p14	10-012,018627	1584	16221	0,99	0,03	=	=	81	0,0
190	PCDH15*	10q21.1	10-055,389508	1906	14453	0,99	0,03	=	=	54	-0,1
340	SLC6A5*	11p15.1	11-020,615296	1474	14911	1,04	0,04	=	=	98	-0,2
433	ATL1*	14q22.1	14-050,168712	877	9623	0,95	0,03	=	=	87	0,1
284	HEXA*	15q24.1	15-070,424852	2057	18320	1,1	0,03	>>	=	95	-0,1
136	SGCA*	17q21.33	17-045,602992	1993	14651	0,96	0,05	=	=	58	0,0
Median value all probe values:				1845	14854	1	0,03			66	-0,08

Análise do gene ZNRF3 usando MLPA - amostra estudada da coorte adulta apresentando deleção de exons.

Paciente masculino, #22, apresentando deleção em heterozigose do gene ZNRF3 ($0.4 < DQ < 0.65$).

D [nt]	Gene-Exon	Chr.band	hg18 loc.	Height	Area	Ratio ^H	Stdev	[REF]	[Sam]	Width	d[nt]
301	CHEK2-3	22q12.1	22-027,451241	1388	14066	0,53	0,06	<<*	<*	73	0,0
220	HSCB-2	22q12.1	22-027,469901	1311	12133	0,6	0,07	<<*	<*	71	-0,1
250	CCDC117-4	22q12.1	22-027,506949	1335	11022	0,56	0,06	<<*	<*	60	0,0
418	XBP1-5	22q12.1	22-027,521635	667	7268	0,54	0,06	<<*	<*	79	0,0
382	ZNRF3-up	22q12.1	22-027,547939	1181	11542	0,52	0,06	<<*	<*	68	-0,1
202	ZNRF3-1	22q12.1	22-027,609930	1249	10568	0,59	0,07	<<*	?	60	0,0
178	ZNRF3-2	22q12.1	22-027,643350	1218	10163	0,62	0,07	<<*	<*	57	0,0
238	ZNRF3-2	22q12.1	22-027,643411	1511	13387	0,59	0,06	<<*	<*	75	0,0
148	ZNRF3-3	22q12.1	22-027,713058	1360	11329	0,63	0,07	<<*	?	43	0,0
256	ZNRF3-int3	22q12.1	22-027,752531	1313	11982	0,59	0,07	<<*	<*	67	0,0
310	ZNRF3-int3	22q12.1	22-027,757374	1173	11888	0,59	0,07	<<*	<*	87	0,0
214	ZNRF3-4	22q12.1	22-027,768513	1384	13053	0,61	0,07	<<*	<*	71	-0,1
142	ZNRF3-5	22q12.1	22-027,769333	1164	9057	0,62	0,07	<<*	<*	47	0,0
364	ZNRF3-6	22q12.1	22-027,770777	1338	14268	0,57	0,06	<<*	<*	78	0,0
232	ZNRF3-7	22q12.1	22-027,772828	1441	12822	0,6	0,07	<<*	?	62	0,0
328	ZNRF3-8	22q12.1	22-027,774373	1346	13309	0,57	0,06	<<*	<*	70	-0,1
184	ZNRF3-9	22q12.1	22-027,775536	1465	12478	0,62	0,07	<<*	?	63	0,0
160	ZNRF3-9	22q12.1	22-027,776142	1241	10192	0,63	0,07	<<*	?	43	-0,1
265	ZNRF3-10	22q12.1	22-027,779587	1458	14025	0,58	0,07	<<*	<*	69	-0,1
195	C22orf31-2	22q12.1	22-027,786476	1304	11472	0,56	0,06	<<*	<*	63	0,0
355	KREMEN1-4	22q12.1	22-027,847389	1185	12464	0,58	0,06	<<*	<*	72	0,0
391	EMID1-3	22q12.2	22-027,941499	1613	17841	0,77	0,09	<<	=	106	0,0
292	AP1B1-1	22q12.2	22-028,114443	1579	15056	0,58	0,06	<<*	<*	63	0,0
165	NF2-12	22q12.2	22-028,399291	1097	8783	0,6	0,07	<<*	<*	39	0,0
409	UROD*	01p34.1	01-045,253029	1631	19542	1,13	0,13	=	=	103	0,0
377	F5*	01q24.2	01-167,750074	1727	17341	0,9	0,1	=	=	67	0,0
427	PSEN2*	01q42.13	01-225,138106	1532	17592	0,86	0,1	=	=	86	0,1
372	SPAST*	02p22.3	02-032,221933	1531	15474	0,95	0,11	=	=	70	0,0
130	DYSF*	02p13.2	02-071,750347	2255	18396	1,21	0,13	=	=	58	0,0
154	EDAR*	02q13	02-108,906225	2097	18292	1,12	0,12	=	=	62	0,0
208	SLC40A1*	02q32.2	02-190,138497	2392	21345	1,09	0,12	=	=	58	0,0
319	SCN5A*	03p22.2	03-038,570946	2049	21169	0,98	0,11	=	=	81	-0,1
274	CPOX*	03q11.2	03-099,790321	1722	17000	0,76	0,09	<<	=	94	-0,1
172	PKHD1*	06p12.2	06-052,046209	2602	24691	1,14	0,12	=	=	85	0,0
244	SIM1*	06q16.3	06-101,001941	2115	19774	1,1	0,12	=	=	78	0,0
226	DNAI1*	09p13.3	09-034,480008	3605	34076	1,4	0,15	>>*	>*	82	0,0
400	UPF2*	10p14	10-012,018627	1908	21489	0,86	0,1	=	=	100	0,0
190	PCDH15*	10q21.1	10-055,389508	1353	11095	0,62	0,07	<<*	<*	55	0,0
340	SLC6A5*	11p15.1	11-020,615296	1788	18982	0,94	0,1	=	=	79	-0,1
433	ATL1*	14q22.1	14-050,168712	1469	18033	1,04	0,12	=	=	94	0,0
284	HEXA*	15q24.1	15-070,424852	2234	21952	1,03	0,11	=	=	71	0,0
136	SCGA*	17q21.33	17-045,602992	2050	16986	0,95	0,1	=	=	48	0,0
Median value all probe values:				1462	14046	0,62*	0,07			70	-0,01

Apêndice F. Banco de dados clínicos e hormonais dos pacientes com CAC e TAP

Banco de dados clínicos e hormonais dos pacientes com CAC

Paciente	Gênero	Idade ao diagnóstico	Apresentação clínica	CLU	Teste Pós-Dexa	CS	Testosterona	Androstenediona	SDHEA
1	F	31.70	Hipercortisolismo	1.26	SAC	3.17	0.93	0.72	-0.29
2	M	83.00	Hipercortisolismo	-0.18	ND	36.25	-0.87	0.08	1.39
3	M	37.60	Hipercortisolismo	-0.69	SAC	0.09	0.18	12.77	7.81
4	F	22.40	Não-hipercortisolismo	-0.46	PSAC	ND	-0.55	0.18	-0.60
5	F	40.45	Hipercortisolismo	6.45	ND	21.83	5.50	1.83	4.28
6	F	32.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
7	M	66.56	Hipercortisolismo	0.92	SAC	1.33	-0.85	0.59	-0.65
8	M	36.84	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
9	M	65.69	Hipercortisolismo	-0.39		0.42	-0.63	1.17	4.39
10	M	33.00	Hipercortisolismo	9.74	SAC		-0.45	-0.06	0.75
11	M	30.56	Hipercortisolismo	15.85		6.58	-0.37	2.12	5.15
12	F	54.30	Hipercortisolismo	-0.25	SAC	0.33	-0.66	-0.47	-0.48
13	F	29.73	Hipercortisolismo	1.05	SAC	1.85	22.27	0.48	9.29
14	F	22.87	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
15	F	32.00	Hipercortisolismo	-0.55	SAC	-0.67	-0.75	-0.75	-0.92
16	M	30.79	Tumor não-funcionante	-0.08	Normal		-0.75	-0.11	-0.25
17	M	54.18	Hipercortisolismo	-0.31	SAC	1.67	-0.86	-0.74	-0.93
18	F	67.92	Hipercortisolismo	6.66	SAC	6.01	0.67	-0.52	1.88
19	F	23.15	Hipercortisolismo	ND	ND	ND	-0.07	0.79	-0.48
20	F	17.72	Hipercortisolismo	3.17	SAC	ND	1.81	-0.35	-0.13
21	M	25.69	Hipercortisolismo	4.67	ND	4.80	-0.65	-0.05	-0.72
22	M	61.30	Hipercortisolismo	0.72	SAC	-0.64	-0.69	11.87	2.59
Paciente	Gênero	Idade ao diagnóstico	Apresentação clínica	CLU	Teste Pós-Dexa	CS	Testosterona	Androstenediona	SDHEA
23	F	54.45	Hipercortisolismo	5.16	SAC	4.83	1.98	2.66	2.67
24	F	69.18	Hipercortisolismo	-0.56	PSAC	-0.17	-0.89	-0.87	-0.97
25	F	53.00	Hipercortisolismo	1.32	SAC	6.29	0.26	ND	-0.63
26	M	53.55	Hipercortisolismo	-0.11	PSAC	0.75	-0.75	-0.70	-0.90
27	M	53.98	Hipercortisolismo	1.32	SAC	8.62	-0.90	-0.59	-0.93
28	F	60.00	Tumor não-funcionante	-0.86	Normal	-0.83	ND	ND	-0.66
29	M	38.00	Hipercortisolismo	18.50	ND	50.42	0.50	0.35	4.83
30	F	44.08	Não-hipercortisolismo	-0.68	Normal	ND	0.51	ND	-0.27
31	F	61.73	Hipercortisolismo	1.50	SAC	4.33	12.83	14.23	1.69
32	F	23.88	Hipercortisolismo	7.78	SAC	2.09	1.65	0.04	-0.82
33	M	38.06	Não-hipercortisolismo	-0.16	PSAC	-0.38	-0.87	2.57	1.07
34	F	44.85	Hipercortisolismo	5.26	SAC	1.68	0.54	-0.59	0.23
35	F	35.04	Não-hipercortisolismo	-0.65	PSAC	-0.25	1.44	ND	0.11
36	F	49.87	Hipercortisolismo	19.32	SAC	0.16	3.85	2.65	4.20
37	F	62.84	Não-hipercortisolismo	ND	PSAC	-0.50	0.86	1.94	-0.14

Paciente	Estradiol	Inibina	11-Deoxicortisol	17-Hidroxiprogesterona	Metastase ao diagnóstico	Recorrência	Diâmetro (cm)	Peso (g)
1	Não	Não	110.47	2.42	Sim	Não	16	1270
2	Sim	Sim	11.27	-0.71	Não	Não	12	ND
3	Sim	ND	188.30	1.16	Não	Não	12	ND
4	Não	ND	0.18	0.42	Sim	Sim	11	316
5	Não	Não	19.31	0.00	Sim	Não	14	380
6	ND	ND	ND	ND	Sim	Sim	20.2	2044
7	Não	Não	-0.13	-0.79	Sim	Sim	24	2468.9
8	ND	ND	ND	ND	Não	Sim	7.5	64.8
9	Não	Não	8.44	-0.42	Sim	Sim	13.5	489.4
10	Sim	ND	6.00	-0.32	Sim	Sim	19	1040
11	Sim	Sim	13.32	0.54	Sim	Não	14.5	758.4
12	Não	Não	1.11	-0.69	Sim	Não	12	ND
13	Sim	Sim	4.00	2.72	Não	Não	20	1370
14	ND	ND	ND	ND	ND	Não	ND	ND
15	Não	ND	0.00	-0.88	Não	Não	4.7	50.5
16	Sim	Sim	0.22	ND	Sim	Sim	11	330
17	Não	Não	-0.07	-0.75	Não	Não	8.5	351.8
18	Não	ND	5.28	-0.88	Sim	Não	7	718
19	Não	Não	7.07	-0.35	Sim	Sim	6	38
20	Sim	ND	14.80	0.29	ND	Não	10	117
21	Não	ND	14.84	ND	Sim	Não	19	ND
22	Sim	ND	ND	11.41	Sim	Não	15.7	148.5

Paciente	Estradiol	Inibina	11-Deoxicortisol	17-Hidroxiprogesterona	Metastase ao diagnóstico	Recorrência	Diâmetro (cm)	Peso (g)
23	Não	ND	76.36	-0.72	Sim	Sim	11.3	312.3
24	Não	Não	-0.62	-0.85	Não	Não	4.5	43g
25	Sim	ND	ND	ND	Não	Sim	9.5	150
26	Não	Não	-0.58	-0.79	Sim	Sim	17	1713
27	Não	Não	0.29	-0.64	ND	Não	6	15
28	ND	ND	ND	ND	Não	Não	7	16.3
29	Sim	ND	ND	2.17	Não	Não	14.5	850
30	Não	Não	0.88	-0.43	Sim	Sim	18	810
31	Sim	ND	22.48	-0.67	Sim	Não	18.40	1677
32	Não	ND	2.10	-0.87	Não	Não	3	21
33	Não	ND	40.08	-0.70	Não	Não	18.5	3011
34	Não	ND	1.70	-0.83	Sim	Sim	8	190.9
35	Sim	ND	9.96	-0.58	Sim	Sim	12.2	538.8
36	Não	ND	12.84	0.02	Sim	Sim	22.5	2480
37	Não	Não	ND	0.55	Sim	Sim	16	ND

Paciente	Weiss	Ki67	ENSAT	Helsinki	Weiss M.	Tempo de sobrevida global	Óbito
1	8	80%	4	88	7	12.23	Sim
2	8	10%	2	18	6	22.00	Sim
3	6	20%	3	25	4	18.60	Sim
4	6	ND	4	ND	5	85.53	Não
5	5	ND	4	ND	3	26.60	Sim
6	6	30%	2	38	6	69.20	Não
7	8	40%	4	48	7	17.23	Sim
8	7	ND	2	ND	6	185.80	Não
9	6	ND	4	ND	4	9.63	Sim
10	7	70%	4	75	5	2.47	Não
11	7	35%	4	43	6	16.13	Não
12	8	75%	4	83	7	15.07	Sim
13	3	ND	2	ND	2	146.17	Não
14	ND	ND	4	ND	ND	22.00	Sim
15	3	5%	1	5	3	26.20	Não
16	3	ND	3	ND	ND	11.90	Sim
17	3	1%	3	6	2	70.23	Não
18	5	ND	4	ND	4	0.90	Sim
19	5	ND	4	ND	3	123.70	Não
20	8	40%	2	48	7	7.07	Sim
21	8	50%	4	58	6	4.73	Sim
22	8	ND	4	ND	6	30.13	Não

Paciente	Weiss	Ki67	ENSAT	Helsinki	Weiss M.	Tempo de sobrevida global	Óbito
23	7	30%	4	38	6	0.00	Sim
24	3	5%	1	10	1	71.50	Não
25	4	20%	3	28	5	79.90	Não
26	9	70%	3	78	7	9.60	Sim
27	3	1%	2	1	2	101.53	Não
28	4	2.40%	2	2.4	3	29.17	Não
29	8	ND	4	ND	7	12.37	Sim
30	8	ND	4	ND	ND	35.57	Sim
31	9	30%	4	38	7	3.80	Sim
32	3	ND	1	ND	2	11.33	Não
33	ND	15%	1	20	ND	11.70	Não
34	9	80%	3	88	7	ND	Não
35	7	40%	4	48	6	46.47	Sim
36	9	80%	3	88	7	23.73	Sim
37	7	ND	3	ND	7	ND	Sim

*F: feminino; M: masculino, CLU: cortisol livre urinário; CS: cortisol salivar; WeissM.: escore de Weiss modificado; ND: dado não disponível; SAC: secreção autônoma de cortisol; PSAC: possível secreção autônoma de cortisol. *Valores laboratoriais normalizados para o VSN.

Banco de dados clínicos e hormonais dos pacientes com TAP

Paciente	Gênero	Idade	Apresentação clínica	CLU	Pós-Dexa	CS	Testosterona	SDHEA	11-Deoxicortisol	17-Hidroxiprogesterona
1	F	0.83	Sd. Virilizante	ND	SAC	ND	4.31	17.86	-0.75	-0.71
2	M	2.26	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	ND	-0.88	2.47	39.52	ND	0.42
3	M	2.19	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	F	3.28	Tumor Silente	ND	ND	ND	-0.70	-0.53	0.40	-0.41
5	F	15.42	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	0.87	SAC	ND	9.51	4.92	4.58	ND
6	M	2.71	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	ND	ND	8.50	-0.36	1.13	5.33
7	F	2.64	Sd. Virilizante	ND	Normal	ND	1.80	2.82	-0.38	0.80
8	F	3.33	Sd. Virilizante	ND	ND	ND	6.63	ND	ND	ND
9	M	6.07	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	-0.92	SAC	-0.89	4.42	1.64	24.54	-0.24
10	F	1.61	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	ND	ND	14.57	14.19	1.40	0.60
11	F	1.58	Sd. Virilizante	ND	Normal	-0.98	2.65	38.07	-0.51	ND
12	M	11.41	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	3.01	ND	1.64	3.38	-0.21	26.14	1.02
13	M	3.62	Sd. Virilizante	-0.20	ND	2.10	0.24	156.71	13.94	3.01
14	F	0.79	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	ND	16.26	1.44	71.42	5.34	-0.29
15	F	2.81	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	SAC	-0.38	0.46	68.54	0.00	-0.16
16	M	0.85	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	ND	SAC	2.72	-0.39	129.15	4.09	0.96

Paciente	Metástase	Recorrência	Diâmetro (cm)	Peso tumoral (g)	Weiss	Ki-67	Wieneke	MacFarlane	Óbito	Sobrevida(meses)
1	Sim	Não	6.9	41	8	30%	4	2	Não	11.37
2	Sim	Não	4.5	10.7	6	ND	3	1	Não	91.70
3	Não	Não	6	135	6	ND	2	2	Não	99.17
4	Não	Não	3.5	3.2	4	5%	1	1	Não	16.10
5	Sim	Não	20	1475	7	ND	7	4	Sim	21.50
6	Sim	Sim	6	70	7	ND	4	4	Sim	6.63
7	Não	Não	6.5	55	7	ND	3	2	Não	125.50
8	Não	Sim	6	37.9	5	40%	4	2	Não	88.50
9	Não	Não	4.5	34.4	3	ND	0	1	Não	28.70
10	Não	Não	4	31.3	3	ND	1	1	Não	98.47
11	Não	Não	5	74	5	ND	2	1	Não	54.37
12	Não	Não	2.5	45.6	2	ND	0	1	Não	29.97
13	Sim	Sim	10.7	270	8	40%	4	3	Não	19.07
14	Não	Não	4.8	31.4	7	50%	3	1	Não	4.20
15	Não	Não	6.5	48.5	5	13%	1	2	Não	11.97
16	Não	Não	8.5	89	9	10%	4	2	Sim	0.93

*F: feminino; M: masculino, CLU: cortisol livre urinário; CS: cortisol salivar; ND: dado não disponível; SAC: secreção autônoma de cortisol; PSAC: possível secreção autônoma de cortisol. *Valores laboratoriais normalizados para o VSN.

Apêndice G. Banco de dados dos resultados moleculares dos pacientes com CAC e TAP

Banco de dados dos resultados moleculares dos pacientes com CAC

Paciente	TP53	ATRX	ZNRF3	ATRX_Cyc	ATRX_Gusb	ZNRF3_Cyc	ZNRF3_Gusb
1	Sim	ND	Não	ND	ND	ND	ND
2	ND	Não	Não	1.06683224	2.651238884	3.371366179	8.378352983
3	Não	Não	Não	0.07838203	2.417194113	0.223239878	6.884411498
4	Não	Não	ND	ND	ND	ND	ND
5	Não	Não	Não	12.9361224	0.652176035	101.8286699	5.13370359
6	Não	Não	ND	ND	ND	ND	ND
7	Não	Não	Não	1.33483985	3.990768706	ND	ND
8	Não	Não	Sim	2.13366449	2.757447338	0.04113946	0.053166698
9	Não	Não	Sim	ND	ND	1.697407943	ND
10	Sim	Não	Sim	2.05622765	0.349492484	20.2521055	3.442205749
11	Não	Sim	Sim	ND	ND	ND	ND
12	ND	Não	Não	ND	ND	ND	ND
13	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND
14	Não	Não	Não	ND	ND	ND	ND
15	Não	Não	Sim	0.9862327	2.0139111	3.426336076	6.99666136
16	Não	Não	Não	10.6787188	2.821899614	51.15015358	13.51665878
17	Não	Não	Não	1.81084952	3.052518418	2.593679109	4.372121014
18	Sim	Não	Sim	ND	ND	ND	ND
19	Não	Não	Não	ND	ND	ND	ND
20	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
21	Sim	Não	Sim	2.19364996	2.894538475	6.48302289	8.554399989
22	ND	Não	Sim	1.19195794	0.909618394	0.267943366	0.204475515
Paciente	TP53	ATRX	ZNRF3	ATRX_Cyc	ATRX_Gusb	ZNRF3_Cyc	ZNRF3_Gusb
23	Não	Não	Sim	2.16845374	1.501772904	3.402668644	2.356534278
24	Não	Não	Não	2.74156561	2.046747784	10.24371182	7.647562541
25	Não	Não	Não	0.78821804	2.329467173	1.940820463	5.735820992
26	ND	Sim	Não	ND	ND	8.186991136	31.12495832
27	Não	Não	Sim	2.35653428	2.109157259	4.573609948	4.093495568
28	ND	Não	Não	1.13813103	7.835362381	1.189207115	8.186991136
29	Sim	Não	ND	ND	ND	ND	ND
30	Não	Não	Não	0.32533546	0.641712949	2.286804974	4.510643708
31	Sim	Sim	Não	0.06934809	0.02509134	2.5198421	0.911722489
32	ND	Não	Não	1.88339203	7.110741449	4.9588308	18.72205205
33	Não	ND	ND	ND	ND	ND	ND
34	Sim	ND	ND	0.409897	0.501156581	3.010493495	3.680750602
35	ND	ND	Sim	0.89709541	1.443929196	0.271683716	0.437291335
36	Não	ND	ND	0.37980567	1.021012126	0.001423179	0.003825861
37	ND	Não	Sim	ND	ND	ND	ND

**TP53: presença de variante patogênica germinativa no gene TP53; ATRX: presença de alteração no número de cópias no gene ATRX; ZNRF3: presença de alteração no número de cópias no gene ZNRF3, ATRX_Cyc: expressão do gene ATRX comparado ao gene CYC; ATRX_Gusb: expressão do gene ATRX comparado ao gene GUSB; ZNRF3_Cyc: expressão do gene ZNRF3 comparado ao gene CYC; ZNRF3_Gusb: expressão do gene ZNRF3 comparado ao gene GUSB; ND: dado não disponível.*

Banco de dados dos resultados moleculares dos pacientes com TAP

Paciente	TP53	ATRX	ZNRF3	ATRX_Cyc	ATRX_Gusb	ZNRF3_Cyc	ZNRF3_Gusb
1	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
2	Sim	Não	Não	35.09839935	ND	ND	ND
3	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
4	Sim	Sim	Sim	3.29436407	2.99661415	0.79922115	0.72698626
5	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
6	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
7	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND
8	Sim	Sim	Não	0.24856011	0.12659860	2.05385358	9.91766160
9	Não	Não	Sim	0.71532297	2.20381023	0.55478474	1.70921435
10	Não	Não	Sim	ND	ND	ND	ND
11	Sim	Não	Não	1.83189058	3.64688995	5.18136901	10.31496247
12	Sim	Não	Sim	ND	ND	ND	ND
13	Sim	ND	ND	ND	ND	2.96904714	32.89964245
14	Sim	ND	ND	0.13030822	0.10907054	0.22583380	0.18902732
15	Sim	ND	ND	1.06068774	1.13944661	ND	ND
16	Sim	Não	Não	ND	ND	ND	ND

**TP53: presença de variante patogênica germinativa no gene TP53; ATRX: presença de alteração no número de cópias no gene ATRX; ZNRF3: presença de alteração no número de cópias no gene ZNRF3, ATRX_Cyc: expressão do gene ATRX comparado ao gene CYC; ATRX_Gusb: expressão do gene ATRX comparado ao gene GUSB; ZNRF3_Cyc: expressão do gene ZNRF3 comparado ao gene CYC; ZNRF3_Gusb: expressão do gene ZNRF3 comparado ao gene GUSB; ND: dado não disponível.*

Apêndice H. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier da coorte adulta

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença da variante patogênica germinativa do *TP53* ($p=0,001$)

*0= ausência da variante; 1= presença da variante.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença de metástase ao diagnóstico ($p=0,016$)

*0= ausência de metástase; 1= presença de metástase.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença de mitoses atípicas ($p=0,031$)

*0= ausência de mitoses atípicas; 1= presença de mitoses atípicas.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença de necrose tumoral ($p=0,035$)

*0= ausência de necrose tumoral; 1= presença de necrose tumoral.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença de invasão sinusoidal ($p=0,047$)

*0= ausência de invasão sinusoidal; 1= presença de invasão sinusoidal.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Presença de invasão capsular ($p=0,001$)

*0= ausência de invasão capsular; 1= presença de invasão capsular.

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Idade ($p=0,0065$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Cortisol livre urinário ($p=0,01$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Testosterona ($p=0,029$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
SDHEA ($p=0,012$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
11-Deoxicortisol ($p=0,0062$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Diâmetro tumoral ($p=0,0038$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Peso tumoral ($p=0,0033$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Escore de Weiss ($p=0,011$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Marcador proliferativo Ki-67 >10% ($p=0,03$)

Curva de sobrevida de Kaplan-Meier
Sistema de estadiamento ENSAT ($p=0,03$)

Apêndice I. Banco de dados dos resultados imunohistoquímicos dos pacientes com CAC e TAP

Banco de dados dos resultados imunohistoquímicos dos pacientes com CAC

Paciente	Expressão ATRX	Expressão ZNRF3	Sexo	Idade	Apresentação clínica	ENSAT
1	0	0	F	41.13	Hipercortisolismo	2
2	0	0	M	38.69	Hipercortisolismo	2
3	0	0	F	36.06	Hipercortisolismo	4
4	0	0	F	22.48	Hipercortisolismo	3
5	0	0	F	85.46	Hipercortisolismo	3
6	0	3	F	46.03	Hipercortisolismo	4
7	0	0	F	19.73	Hipercortisolismo	2
8	0	0	F	37.31	Hipercortisolismo	2
9	ND	ND	F	36.45	Hipercortisolismo	2
10	0	0	F	29.28	Hipercortisolismo	4
11	0	0	M	30.03	Hipercortisolismo	4
12	0	0	F	17.33	Não-hipercortisolismo	4
13	4	0	F	28.77	Não-hipercortisolismo	2
14	2	3	F	49.35	Hipercortisolismo	2
15	4	0	F	23.57	Hipercortisolismo	2
16	0	0	F	45.82	Hipercortisolismo	3
17	0	0	F	33.28	Hipercortisolismo	4
18	4	5	F	72.24	Tumor silente	3
19	0	2	F	23.14	Hipercortisolismo	4
20	0	1	M	30.75	Tumor silente	3
21	0	0	M	42.89	Tumor silente	2
22	1	5	F	19.29	Hipercortisolismo	1
23	0	2	M	46.69	Tumor silente	3
24	4	6	M	66.98	Tumor silente	2
25	1	0	F	40.42	Hipercortisolismo	4
26	3	3	F	35.72	Hipercortisolismo	1
27	0	0	F	15.38	Hipercortisolismo	4
28	1	1	M	17.55	Hipercortisolismo	2
29	4	3	F	44.05	Não-hipercortisolismo	4
30	2	5	F	29.71	Não-hipercortisolismo	2
31	0	5	F	19.56	Hipercortisolismo	3
32	0	6	F	26.55	Hipercortisolismo	4
33	3	0	F	72.24	Tumor silente	3
34	0	0	M	43.41	Tumor silente	3
35	0	3	M	36.55	ND	ND
36	0	5	F	19.29	Hipercortisolismo	1
37	0	6	F	21.33	Hipercortisolismo	1
38	3	0	F	51.44	Não-hipercortisolismo	3
39	4	3	F	53.69	ND	2
40	4	6	F	40.46	Hipercortisolismo	3
41	0	5	M	54.81	Hipercortisolismo	4
42	0	5	F	58.77	Tumor silente	2
43	0	7	F	29.70	Hipercortisolismo	2
44	4	0	F	27.59	Hipercortisolismo	4
45	3	0	F	58.69	Não-hipercortisolismo	2
46	2	0	F	36.49	Hipercortisolismo	2
47	4	5	F	49.66	Não-hipercortisolismo	2
48	0	0	F	57.40	Tumor silente	1
49	1	0	F	63.37	Tumor silente	4
50	3	0	M	36.12	Tumor silente	2
51	2	3	F	17.71	Hipercortisolismo	4

Paciente	Expressão ATRX	Expressão ZNRF3	Sexo	Idade	Apresentação clínica	ENSAT
52	0	5	F	37.65	Hipercortisolismo	2
53	2	1	F	52.01	ND	2
54	3	5	F	22.61	Tumor silente	2
55	4	5	F	62.68	Hipercortisolismo	1
56	1	0	F	23.13	Hipercortisolismo	3
57	4	0	F	37.42	Não-hipercortisolismo	2
58	0	2	F	30.91	Hipercortisolismo	3
59	3	1	M	23.28	ND	2
60	3	6	F	55.59	Hipercortisolismo	3
61	2	0	F	65.33	Hipercortisolismo	2
62	4	7	M	51.15	Não-hipercortisolismo	2
63	3	6	M	53.95	Hipercortisolismo	1
64	0	0	F	22.38	Tumor silente	2
65	4	5	F	43.80	Hipercortisolismo	1
66	0	0	M	44.70	Tumor silente	2
67	3	5	F	81.00	Hipercortisolismo	2
68	0	5	F	31.68	Hipercortisolismo	4
69	1	5	F	30.39	Hipercortisolismo	2
70	3	5	F	55.73	Hipercortisolismo	2
71	3	0	M	66.52	Hipercortisolismo	2
72	ND	ND	F	79.58	Hipercortisolismo	3
73	4	0	M	54.14	Hipercortisolismo	3
74	4	0	M	53.51	Hipercortisolismo	3
75	2	2	F	30.37	Não-hipercortisolismo	2
76	0	5	F	23.39	Hipercortisolismo	3
77	4	5	M	65.65	Hipercortisolismo	4
78	2	0	F	66.19	Tumor silente	2
79	0	6	F	60.83	Tumor silente	2
80	3	6	F	35.70	Hipercortisolismo	4
81	4	3	F	69.13	Hipercortisolismo	1
82	0	5	F	37.44	ND	2

Paciente	Número de sítios de metástases	Peso tumoral (g)	Tamanho tumoral (cm)	Weiss	Ki-67
1	0	445.00	11.00	4	ND
2	0	810.00	15.00	7	ND
3	2	2000.00	21.00	8	ND
4	0	ND	21.00	9	5
5	0	150.00	9.00	7	5
6	2	640.00	18.00	6	1
7	0	360.00	11.00	6	10
8	0	320.00	10.00	6	ND
9	0	120.00	8.00	3	ND
10	1	550.00	12.00	6	ND
11	2	665.00	19.00	8	5
12	ND	825.00	15.00	4	10
13	0	150.00	6.50	3	5
14	0	930.00	15.50	4	15
15	0	35.00	6.20	7	2.5
16	0	280.00	10.00	8	15
17	3	1900.00	22.50	8	ND
18	0	1996.00	21.00	7	15
19	3	555.00	14.00	6	10
20	0	330.00	11.00	6	15
21	0	1850.00	21.00	5	2.5
22	0	15.00	2.50	4	5
23	0	1570.00	20.00	6	2.5
24	0	55.00	6.00	4	2.5
25	2	1080.00	17.00	7	15
26	0	40.00	2.20	3	2.5
27	1	1230.00	20.00	8	50
28	0	165.00	9.00	7	10
29	1	810.00	18.00	8	15
30	0	1370.00	20.00	3	1
31	0	1000.00	13.00	8	70
32	1	ND	16.30	7	15
33	0	1996.00	21.00	7	15
34	0	1420.00	17.50	5	10
35	ND	ND	ND	ND	ND
36	0	15.00	2.50	4	5
37	0	ND	3.50	4	2.5
38	0	2370.00	23.00	8	10
39	0	ND	6.50	6	10
40	0	10	3	3	2.5
41	1	705.00	14.00	4	70
42	0	365.00	10.00	5	2
43	0	ND	8.00	3	10
44	2	935.00	13.00	8	40
45	0	720.00	12.00	4	2
46	0	2600.00	12.00	ND	ND
47	0	ND	6.50	4	2.5
48	0	65.00	3.70	3	5
49	2	ND	9.00	4	20
50	0	205.20	11.00	8	40
51	2	117.00	10.00	8	40

Paciente	Número de sítios de metástases	Peso tumoral (g)	Tamanho tumoral (cm)	Weiss	Ki-67
52	0	ND	6.00	5	15
53	0	ND	12.50	7	20
54	0	325.00	13.00	6	8
55	ND	19.50	2.70	ND	ND
56	0	38.00	6.00	5	15
57	0	31.90	6.00	4	5
58	0	310.00	12.00	7	10
59	0	ND	10.00	3	20
60	0	176.00	10.50	8	50
61	0	104.20	7.00	4	10
62	0	12.30	6.00	3	2.5
63	0	15.00	3.00	3	1
64	0	316.00	11.00	6	15
65	0	ND	4.00	3	5
66	0	220.50	8.20	7	15
67	0	ND	14.00	4	10
68	1	1270.00	16.00	8	80
69	0	364.00	10.50	3	2.5
70	0	ND	10.00	4	5
71	0	2469.00	20.00	8	40
72	0	ND	6.50	3	1
73	0	351.80	8.50	3	1
74	0	1713.00	17.00	9	70
75	0	900.00	15.00	8	40
76	0	1038.00	11.00	6	15
77	1	489.40	13.50	6	15
78	0	637.00	15.00	4	15
79	0	ND	8.00	5	1
80	1	ND	ND	ND	30
81	0	ND	4.50	3	5
82	0	ND	12.00	ND	5

Paciente	Recorrência	Sobrevida livre de recorrência (meses)	Óbito	Sobrevida global (meses)
1	Não	381.6	ND	381.23
2	Sim	20	ND	ND
3	ND	ND	ND	ND
4	Sim	48	ND	ND
5	Não	9	ND	ND
6	ND	ND	Não	406.83
7	Não	102.7	ND	99.83
8	Sim	14	Sim	0.00
9	Não	104.6	Não	0.20
10	Sim	15	ND	0.37
11	ND	ND	Sim	0.23
12	Não	126.5	Sim	126.53
13	Não	24.5	Não	24.57
14	ND	252.4	Não	252.47
15	Não	253.3	Não	253.30
16	Não	233.6	Não	239.67
17	ND	ND	Sim	1.40
18	ND	ND	Sim	29.87
19	Sim	ND	Sim	15.40
20	Sim	3	Sim	12.17
21	Sim	11	Sim	19.00
22	ND	ND	Não	188.03
23	Não	200.3	Não	200.03
24	Não	169	Não	169.00
25	Sim	ND	Sim	37.20
26	Não	210	Não	220.00
27	ND	ND	Sim	21.83
28	ND	60.9	Sim	9.23
29	ND	ND	Sim	35.83
30	Não	156.9	Não	156.93
31	Sim	ND	ND	ND
32	ND	ND	ND	6.63
33	ND	ND	Sim	29.87
34	Não	3	Sim	4.50
35	Sim	3	Sim	190.90
36	ND	ND	Não	188.03
37	Não	185.8	Não	203.87
38	Sim	12	Sim	17.07
39	Sim	24	Sim	3.27
40	Não	51.1	Não	42.30
41	ND	ND	ND	24.60
42	Não	183.7	Sim	183.13
43	Sim	6	Sim	8.93
44	ND	ND	ND	9.80
45	Não	170.7	Não	184.30
46	Sim	5	Não	12.53
47	Não	147.6	Não	159.40
48	ND	46.9	Sim	46.70
49	ND	ND	Sim	23.20
50	Sim	21	Não	148.90
51	ND	ND	Não	7.07

Paciente	Recorrência	Sobrevida livre de recorrência (meses)	Óbito	Sobrevida global (meses)
52	Sim	7	Sim	33.93
53	Sim	4	Sim	8.27
54	Não	134.6	Não	143.80
55	ND	ND	Não	105.80
56	Sim	7	Não	124.47
57	ND	ND	Não	136.30
58	Sim	5	Sim	36.03
59	Sim	60	Sim	104.23
60	Sim	8	Sim	35.63
61	ND	13.5	Sim	13.53
62	Não	115.2	Não	115.27
63	Não	104.8	Não	112.07
64	Sim	25	Sim	86.07
65	Não	24.1	Sim	53.73
66	Sim	33	Sim	88.17
67	Sim	21	Sim	35.73
68	ND	ND	Sim	12.63
69	Não	27.4	ND	ND
70	Não	94.7	Não	102.70
71	Sim	7	Sim	18.30
72	Não	55.3	Não	55.53
73	Sim	81.9	Não	96.27
74	Sim	9	Sim	9.97
75	Não	41.9	Sim	41.97
76	Não	4.4	Não	4.40
77	ND	ND	Sim	9.63
78	Não	23.3	Sim	23.33
79	Sim	14	Sim	15.90
80	ND	ND	Sim	37.13
81	Não	79.8	Não	89.90
82	Não	173.06	Não	181.13

Banco de dados dos resultados imunohistoquímicos dos pacientes com TAP

Paciente	Expressão ATRX	Expressão ZNRF3	Sexo	Idade	Apresentação clínica	MacFarlane	Óbito	Ki67_ %
1	0	4	F	2.78	Sd. Virilizante	2	ND	ND
2	1	0	F	1.88	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	ND	ND
3	1	0	M	11.52	Sd. Virilizante	2	Não	ND
4	0	5	F	2.00	Sd. Virilizante	1	ND	ND
5	0	5	F	1.15	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	ND	ND
6	3	6	F	5.82	Sd. Virilizante	2	Não	ND
7	0	0	M	0.10	Sd. Virilizante	1	Não	ND
8	0	0	F	1.81	Sd. Virilizante	2	Não	ND
9	0	4	M	6.97	Sd. Virilizante	2	ND	ND
10	1	2	F	3.28	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	5
11	1	3	M	1.57	Sd. Virilizante	1	Não	15
12	0	2	F	0.72	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	15
13	1	1	M	2.52	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	4	ND	ND
14	1	0	F	4.54	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Sim	ND
15	0	0	F	0.66	Sd. Virilizante	1	Não	ND
16	2	2	F	9.45	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	4	ND	ND
17	0	5	F	2.91	Sd. Virilizante	1	Não	0
18	3	3	M	1.42	Sd. Virilizante	1	Não	5
19	4	5	M	2.23	Sd. Virilizante	2	Não	ND
20	2	3	M	2.63	Sd. Virilizante	1	Não	50
21	0	6	F	2.15	Sd. Virilizante	1	Não	5
22	4	7	F	1.88	Sd. Virilizante	1	Não	ND
23	1	0	M	2.63	Sd. Virilizante	1	Não	50
24	1	7	M	2.15	Sd. Virilizante	2	Não	10
25	0	5	M	1.37	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	ND	ND
26	1	4	F	0.99	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	5
27	2	7	F	12.56	Sd. Virilizante	2	Não	10
28	1	2	M	9.51	Sd. Cushing	1	Não	0
29	2	6	F	2.64	Sd. Virilizante	1	Não	ND
30	3	0	F	2.33	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	0
31	0	6	F	6.16	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	ND
32	1	6	F	2.35	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	10
33	3	5	F	2.48	Sd. Virilizante	1	Não	0
34	0	5	F	6.16	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	ND
35	0	2	F	0.98	Sd. Virilizante	2	Não	10
36	1	6	F	2.15	Sd. Virilizante	1	Não	5
37	2	5	F	1.26	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	10
38	0	6	M	2.60	Sd. Virilizante	2	Sim	ND
39	2	4	M	2.95	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	ND
40	1	5	M	2.31	Sd. Virilizante	1	Sim	30
41	4	2	F	13.02	Sd. Virilizante	2	Não	ND
42	4	6	F	1.61	Sd. Virilizante	1	Não	5
43	0	3	F	3.09	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	30
44	0	6	F	0.95	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	2	Não	20
45	2	5	M	2.26	Sd. Virilizante	1	Não	10
46	1	6	F	2.73	Sd. Virilizante	1	Não	5
47	0	0	F	3.32	Sd. Virilizante e Sd. Cushing	1	Não	40

Paciente	Metástase ao diagnóstico	Peso Tumoral (g)	Tamanho tumoral (cm)	Weiss	Wieneke	Sobrevida (meses)
1	Não	70	6	ND	ND	129.00
2	Não	210	8	6	ND	ND
3	Não	55	5.5	4	2	222.10
4	ND	10	3	6	ND	ND
5	Não	140	9	5	1	216.70
6	Não	35	7.5	5	2	190.63
7	Não	29	5	5	1	327.90
8	Não	190	21	6	ND	193.30
9	Não	ND	6	4	1	24.00
10	Não	40	5	6	2	384.57
11	Não	4	1.5	5	1	168.43
12	Não	40	3.5	6	2	312.53
13	Sim	250	12	7	3	4.40
14	Não	70	6.5	5	2	25.33
15	Não	42	4	6	2	354.63
16	Sim	140	9	7	3	18.00
17	Não	30	5	3	1	169.67
18	Não	30	5	4	1	166.50
19	Não	90	6.5	4	1	187.30
20	Não	3	2.5	4	1	289.83
21	Não	5	3	1	1	269.67
22	Não	45	5	2	ND	83.53
23	Não	3	2.5	4	1	289.83
24	Não	135	6	6	2	99.63
25	ND	40	5	7	ND	251.30
26	Não	60	6	2	1	238.50
27	Não	55	6.5	6	2	4.70
28	Não	20	4.5	2	0	106.33
29	Não	5	2.5	4	1	209.53
30	Não	55	7	2	ND	80.77
31	Não	55	7	8	4	16.03
32	Não	5	3.8	5	1	196.90
33	Não	10	4.5	1	0	198.07
34	Não	55	7	8	4	16.03
35	Não	135	8.5	4	3	152.80
36	Não	20	4	3	1	161.47
37	Não	10	3.7	5	1	3.90
38	Não	70	6	7	3	7.97
39	Não	30	3.5	4	0	90.63
40	Não	10	3.5	5	3	1.60
41	Não	51	6.5	1	0	13.80
42	Não	31.3	4	3	1	100.10
43	Não	650	13.5	7	6	2.97
44	Não	112.7	6.5	6	3	93.33
45	Não	10.7	4.5	6	2	107.10
46	Não	ND	1.8	3	0	103.03
47	Não	40	5	5	4	105.37

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. DACKIW A.P.B., LEE J.E., GAGEL R.F., EVANS D.B. Adrenal cortical carcinoma. **World Journal of Surgery**. v.25, n.7, p.914-26, 2001.
2. KEBEBEW E., REIFF E., DUH Q.Y., CLARK O.H., MCMILLAN A. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: Have we made progress? **World Journal of Surgery**. v.30, n.5, p.872-8, 2006.
3. BILIMORIA K.Y., SHEN W.T., ELARAJ D., BENTRERN D.J., WINCHESTER D.J., KEBEBEW E., et al. Adrenocortical Carcinoma in the United States Treatment Utilization and Prognostic Factors. **Cancer**. v.113, n.11, p.3130-6, 2008.
4. ELSE T., KIM A.C., SABOLCH A., RAYMOND V.M., KANDATHIL A., CAOILI E.M., et al. Adrenocortical Carcinoma. **Endocrine Reviews**. v.35, n.2, p.282-326, 2014.
5. RIES L.A.G., MELBERT D., KRAPCHO M., STINCHCOMB D.G., HOWLADER N., HORNER M.J., et al. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Cancer Statistics Review, 1975-2005. **Bethesda, MD: National Cancer Institute**. 2008. Disponível em: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2005/. Acesso em 01 fev.2021.
6. ICARD P., GOUDET P., CHARPENAY C., ANDREASSIAN B., CARNAILLE B., CHAPUIS Y., et al. Adrenocortical carcinomas: Surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. **World Journal of Surgery**. 2001;25(7):891-7.
7. FASSNACHT M., JOHANSEN S., QUINKLER M., BUCKSKY P., WILLENBERG H.S., BEUSCHLEIN F., et al. Limited Prognostic Value of the 2004 International Union Against Cancer Staging Classification for Adrenocortical Carcinomas. **Cancer**. 2009;115(2):243-50.
8. FASSNACHT M., LIBE R., KROISS M., ALLOLIO B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. **Nature Reviews Endocrinology**. 2011;7(6):323-35.
9. FASSNACHT M., TERZOLO M., ALLOLIO B., BAUDIN E., HAAK H., BERRUTI A., et al. Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. **New England Journal of Medicine**. 2012;366(23):2189-97.
10. FASSNACHT M., DEKKERS O.M., ELSE T., GAUDIN E., BERRUTI A., DE KRIJGER R.R., 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. **European Journal of Endocrinology**. 2018;179(4):G1-G46.
11. CAGLE P.T., HOUGH A.J., PYSHER T.J., PAGE D.L., JOHNSON E.H., KIRKLAND R.T., et al. COMPARISON OF ADRENAL-CORTICAL TUMORS IN CHILDREN AND ADULTS. **Cancer**. 1986;57(11):2235-7.
12. SULLIVAN M., BOILEAU M., HODGES C.V. ADRENAL-CORTICAL CARCINOMA. **Journal of Urology**. 1978;120(6):660-5.
13. MENDONÇA B.B., LUCON A.M., MENEZES C.A., SALDANHA L.B., LATRONICO A.C., ZERBINI C. et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. **Journal of Urology**. 1995 Dec. p. 2004-9.

14. WIENEKE J.A., THOMPSON L.D.R., HEFFESS C.S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **Am J Surg Pathol.** 2003 p. 867-81.
15. FARIA A.M., ALMEIDA M.Q. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. **Molecular and Cellular Endocrinology.** 2012;351(1):52-7.
16. SANDRINI R., RIBEIRO R.C., DELACERDA L. Childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 1997;82(7):2027-31.
17. WAJCHENBERG B.L., PEREIRA M.A.A., MENDONCA B.B., LATRONICO A.C., CARNEIRO P.C., ALVES V.A.F., et al. Adrenocortical carcinoma - Clinical and laboratory observations. **Cancer.** 2000;88(4):711-36.
18. RUSSELL R.P., MASI A.T., RICHTER E.D. Adrenal cortical adenomas and hypertension – Clinical pathologic analysis of 690 cases with matched controls and a review of literature. **Medicine.** 1972;51(3):211-&.
19. ANTONINI S.R.R., COLLI L.M., FERRO L., MERMEJO L., DE CASTRO M. Childhood adrenocortical tumors: from a clinical to a molecular approach. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia.** 2011;55(8):599-606.
20. RODRIGUEZ-GALINDO C., FIGUEIREDO B.C., ZAMBETTI G.P., RIBEIRO R.C. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatric Blood & Cancer.** 2005;45(3):265-73.
21. RIBEIRO R.C., SANDRINI F., FIGUEIREDO B., ZAMBETTI G.P., MICHALKIEWICZ E., LAFFERTY A.R., et al. A inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** 2001;98(16):9330-5.
22. LATRONICO A.C., PINTO E.M., DOMENICE S., FRAGOSO M., MARTIN R.M., ZERBINI M.C., et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 2001;86(10):4970-3.
23. PINTO E.M., BILLERBECK A.E.C., VILLARES M.C.B.F., DOMENICE S., MENDONCA B.B., LATRONICO A.C. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia.** 2004. p. 647-50.
24. CUSTODIO G., KOMECHEN H., FIGUEIREDO F.R.O., FACHIN N.D., PIANOVSKI M.A.D., FIGUEIREDO B.C. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. **Molecular and Cellular Endocrinology.** 2012;351(1):44-51.
25. ACHATZ M.I.W., OLIVIER M., CALVEZ-KELM F., MARTEL-PLANCHE G., LOPES A., ROSSI B.M., et al. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. **Cancer Letters.** 2007;245(1-2):96-102.
26. GARRITANO S., GEMIGNANI F., PALMERO E.I., OLIVIER M., MARTEL-PLANCHE G., CALVEZ-KELM F., et al. Detailed Haplotype Analysis at the TP53 Locus in p.R337H Mutation Carriers in the Population of Southern Brazil: Evidence for a Founder Effect. **Human Mutation.** 2010;31(2):143-50.

27. CHOMPRET A., ABEL A., STOPPA-LYONNET D., BRUGIERES L., PAGES S., FEUNTEUN J., et al. Sensitivity and predictive value of criteria for p53 germline mutation screening. **Journal of Medical Genetics**. 2001;38(1):43-7.
28. TEINTURIER C., PAUCHARD M.S., BRUGIERES L., LANDAIS P., CHAUSSAIN J.L., BOUGNERES P.F. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. **Medical and Pediatric Oncology**. 1999;32(2):106-11.
29. MICHALKIEWICZ E., SANDRINI R., FIGUEIREDO B., MIRANDA E.C.M., CARAN E., OLIVEIRA-FILHO A.G., et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: A report from the international pediatric adrenocortical tumor registry. **Journal of Clinical Oncology**. 2004;22(5):838-45.
30. FASSNACHT M., ALLOLIO B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2009;23(2):273-89.
31. BERRUTI A., FASSNACHT M., HAAK H., ELSE T., BAUDIN E., SPERONE P., et al. Prognostic Role of Overt Hypercortisolism in Completely Operated Patients with Adrenocortical Cancer. **European Urology**. 2014;65(4):832-8.
32. ARLT W., BIEHL M., TAYLOR A.E., HAHNER S., LIBE R., HUGHES B.A., et al. Urine Steroid Metabolomics as a Biomarker Tool for Detecting Malignancy in Adrenal Tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2011;96(12):3775-84.
33. BANCOS I., TAYLOR A.E., CHORTIS V., SITCH A.J., JENKINSON C., DAVIDGE-PITTS C.J., et al. Urine steroid metabolomics for the differential diagnosis of adrenal incidentalomas in the EURINE-ACT study: a prospective test validation study. **Lancet Diabetes & Endocrinology**. 2020;8(9):773-81.
34. JR YOUNG W.F. Conventional imaging in adrenocortical carcinoma: update and perspectives. **Horm Cancer**. 2011. p. 341-7.
35. SAHDEV A., REZNEK R.H. Imaging evaluation of the nonfunctioning indeterminate adrenal mass. **Trends in Endocrinology and Metabolism**. 2004;15(6):271-6.
36. HONIGSCHNABL S., GALLO S., NIEDERLE B., PRAGER G., KASERER K., LECHNER G., et al. How accurate is MR imaging in characterisation of adrenal masses: update of a long-term study. **European Journal of Radiology**. 2002;41(2):113-22.
37. FASSNACHT M., KENN W., ALLOLIO B. Adrenal tumors: How to establish malignancy? **Journal of Endocrinological Investigation**. 2004;27(4):387-99.
38. ILIAS L., SAHDEV A., REZNEK R.H., GROSSMAN A.B., PACAK K. The optimal imaging of adrenal tumours: A comparison of different methods. **Endocrine-Related Cancer**. 2007;14(3):587-99.
39. METSER U., MILLER E., LERMAN H., LIEVSHITZ G., AVITAL S., EVEN-SAPIR E. F-18-FDG PET/CT in the evaluation of adrenal masses. **Journal of Nuclear Medicine**. 2006;47(1):32-7.
40. WEISS L.M. COMPARATIVE HISTOLOGIC-STUDY OF 43 METASTASIZING AND NONMETASTASIZING ADRENOCORTICAL TUMORS. **American Journal of Surgical Pathology**. 1984;8(3):163-9.

41. AUBERT S., WACRENIER A., LEROY X., DEVOS P., CARNAILLE B., PROYE C., et al. Weiss system revisited - A clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. **American Journal of Surgical Pathology**. 2002;26(12):1612-9.
42. FUHRMAN S.A., LASKY L.C., LIMAS C. Prognostic-significance of morphologic parameters in renal-cell carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**. 1982;6(7):655-63.
43. LIBE R. Clinical and molecular prognostic factors in adrenocortical carcinoma. **Minerva Endocrinologica**. 2019;44(1):58-69.
44. LIBE R., BORGET I., RONCHI C.L., ZAGGIA B., KROISS M., KERKHOF T., et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. **Annals of Oncology**. 2015;26(10):2119-25.
45. BEUSCHLEIN F., WEIGEL J., SAEGER W., KROISS M., WILD V., DAFFARA F., et al. Major Prognostic Role of Ki67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2015;100(3):841-9.
46. MARTINS S.N., ALMEIDA M.Q., SOARES I., WAKAMATSU A., ALVES V.A.F., FRAGOSO M., et al. Clinical Impact of Pathological Features Including the Ki67 Labeling Index on Diagnosis and Prognosis of Adult and Pediatric Adrenocortical Tumors. **Endocrine Pathology**. 2013;24(1):1-10.
47. BRONDANI V.B., MONTENEGRO L., LACOMBE A.M.F., MAGALHAES B.M., NISHI M.Y., FUNARI M., et al. High Prevalence of Alterations in DNA Mismatch Repair Genes of Lynch Syndrome in Pediatric Patients with Adrenocortical Tumors Carrying a Germline Mutation on TP53. **Cancers**. 2020;12(3):12.
48. ABIVEN G., COSTE J., GROUSSIN L., ANRACT P., TISSIER F., LEGMANN P., et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: Poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2006;91(7):2650-5.
49. ASSIE G., ANTONI G., TISSIER F., CAILLOU B., ABIVEN G., GICQUEL C., et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2007;92(1):148-54.
50. PENNANEN M., HEISKANEN I., SANE T., REMES S., MUSTONEN H., HAGLUND C., et al. Helsinki score-a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. **Human Pathology**. 2015;46(3):404-10.
51. LUTON J.P., CERDAS S., BILLAUD L., THOMAS G., GUILHAUME B., BERTAGNA X., et al. Clinical-features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors and the effect of mitotane therapy. **New England Journal of Medicine**. 1990;322(17):1195-201.
52. MEDEIROS L.J., WEISS L.M. New developments in the pathological diagnosis of adrenal-cortical neoplasms – A review. **American Journal of Clinical Pathology**. 1992;97(1):73-83.
53. MCNICOL A.M., STRUTHERS A.J., NOLAN C.E., HERMANS J., HAAK H.R. Proliferation in adrenocortical tumors: Correlation with clinical outcome and p53 status. **Endocrine Pathology**. 1997;8(1):29-36.
54. VASSILOPOULOU-SELLIN R., SCHULTZ P.N. Adrenocortical carcinoma - Clinical outcome at the end of the 20th century. **Cancer**. 2001;92(5):1113-21.

55. STOJADINOVIC A., GHOSSEIN R.A., HOOS A., NISSAN A., MARSHALL D., DUDAS M., et al. Adrenocortical carcinoma: Clinical, morphologic, and molecular characterization. **Journal of Clinical Oncology**. 2002;20(4):941-50.
56. STURGEON C., SHEN W.T., CLARK O.H., DUH Q.Y., KEBEBEW E. Risk assessment in 457 adrenal cortical carcinomas: How much does tumor size predict the likelihood of malignancy? **Journal of the American College of Surgeons**. 2006;202(3):423-30.
57. MORIMOTO R., SATOH F., MURAKAMI O., SUZUKI T., ABE T., TANEMOTO M., et al. Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki67/MIB1 Labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. **Endocrine Journal**. 2008;55(1):49-55.
58. LAU S.K., WEISS L.M. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. **Human Pathology**. 2009;40(6):757-68.
59. ALMEIDA M.Q., SOARES I.C., RIBEIRO T.C., FRAGOSO M., MARINS L.V., WAKAMATSU A., et al. Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2010;95(3):1458-62.
60. DURAND J., LAMPRON A., MAZZUCO T.L., CHAPMAN A., BOURDEAU I. Characterization of Differential Gene Expression in Adrenocortical Tumors Harboring beta-Catenin (CTNNB1) Mutations. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2011;96(7):E1206-E11.
61. GAUJOUX S., GRABAR S., FASSNACHT M., RAGAZZON B., LAUNAY P., LIBE R., et al. beta-Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. **Clinical Cancer Research**. 2011;17(2):328-36.
62. AYALA-RAMIREZ M., JASIM S., FENG L., EJAZ S., DENIZ F., BUSAIDY N., ET al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. **European Journal of Endocrinology**. 2013;169(6):891-9.
63. ASSIE G., LETOUZE E., FASSNACHT M., JOUINOT A., LUSCAP W., BARREAU O., et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nature Genetics**. 2014;46(6):607-12.
64. ZHENG S.Y., CHERNIACK A.D., DEWAL N., MOFFITT R.A., DANILOVA L., MURRAY B.A., et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. **Cancer Cell**. 2016;29(5):723-36.
65. METE O., GUCER H., KEFELI M., ASA S.L. Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Adrenal Cortical Carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**. 2018;42(2):201-13.
66. METE O., ASA S.L., GIORDANO T.J., PAPOTTI M., SASANO H., VOLANTE M. Immunohistochemical Biomarkers of Adrenal Cortical Neoplasms. **Endocrine Pathology**. 2018;29(2):137-49.
67. AHMED A.A., THOMAS A.J., GANESHAN D.M., BLAIR K.J., LALL C., LEE J.T., et al. Adrenal cortical carcinoma: pathology, genomics, prognosis, imaging features, and mimics with impact on management. **Abdominal Radiology**. 2020;45(4):945-63.
68. KIRSCHNER L.S. Review: Emerging treatment strategies for adrenocortical carcinoma: A new hope. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2006;91(1):14-21.

69. TEINTURIER C., BRUGIERES L., LEMERLE J., CHAUSSAIN J.L., BOUGNERES P.F. Adrenocortical neoplasms in childhood: A retrospective study of 54 cases. **Archives De Pediatrie**. 1996;3(3):235-40.
70. RIBEIRO R.C., NETO R.S., SCHELL M.J., LACERDA L., SAMBAIO G.A., CAT I.. Adrenocortical carcinoma in children – a study of 40 cases. **Journal of Clinical Oncology**. 1990;8(1):67-74.
71. GULACK B.C., RIALON K.L., ENGLUM B.R., KIM J., TALBOT L.J., ADIBE O.O., et al. Factors associated with survival in pediatric adrenocortical carcinoma: An analysis of the National Cancer Data Base (NCDB). **Journal of Pediatric Surgery**. 2016;51(1):172-7.
72. ISAACS H. Fetal and newborn adrenocortical tumors. **Fetal and Pediatric Pathology**. 2010;29(2):99-107.
73. ISHIMOTO H., JAFFE R.B. Development and Function of the Human Fetal Adrenal Cortex: A Key Component in the Feto-Placental Unit. **Endocrine Reviews**. 2011;32(3):317-55.
74. GUPTA N., RIVERA M., NOVOTNY P., RODRIGUEZ V., BANCOS I., LTEIF A. Adrenocortical Carcinoma in Children: A Clinicopathological Analysis of 41 Patients at the Mayo Clinic from 1950 to 2017. **Hormone Research in Paediatrics**. 2018;90(1):8-18.
75. LATRONICO A.C., CHROUSOS G.P. Extensive personal, experience - Adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 1997;82(5):1317-24.
76. MAYER S.K., OLIGNY L.L., DEAL C., YAZBECK S., GAGNE N., BLANCHARD H. Childhood adrenocortical tumors: Case series and reevaluation of prognosis - A 24-year experience. **Journal of Pediatric Surgery**. 1997;32(6):911-5.
77. RIBEIRO R.C., FIGUEIREDO B. Childhood adrenocortical tumours. **European Journal of Cancer**. 2004;40(8):1117-26.
78. BRONDANI V.B., FRAGOSO M. Pediatric adrenocortical tumor - review and management update. **Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity**. 2020;27(3):177-86.
79. DAS S., SENGUPTA M., ISLAM N., ROY P., DATTA C., MISHRA P.K., et al. Weineke criteria, Ki67 index and p53 status to study pediatric adrenocortical tumors: Is there a correlation? **Journal of Pediatric Surgery**. 2016;51(11):1795-800.
80. PINTO E.M., RODRIGUEZ-GALINDO C., POUNDS S.B., WANG L., CLAY M.R., NEALE G., et al. Identification of Clinical and Biologic Correlates Associated With Outcome in Children With Adrenocortical Tumors Without Germline TP53 Mutations: A St Jude Adrenocortical Tumor Registry and Children's Oncology Group Study. **Journal of Clinical Oncology**. 2017;35(35):3956-+.
81. WANG Z.P., LIU G.B., SUN H.Q., LI K., DONG K.R., MA Y.Y., et al. Clinical characteristics and prognosis of adrenocortical tumors in children. **Pediatric Surgery International**. 2019;35(3):365-71.
82. GUNTIBOINA V.A., SENGUPTA M., ISLAM N., BARMAN S., BISWAS S.K., CHATTERJEE U., et al. Diagnostic and prognostic utility of SF1, IGF2 and p57 immunoexpression in pediatric adrenal cortical tumors. **Journal of Pediatric Surgery**. 2019;54(9):1906-12.
83. PICARD C., ORBACH D., CARTON M., BRUGIERES L., RENAUDIN K., AUBERT S., et al. Revisiting the role of the pathological grading in pediatric adrenal cortical tumors: results from a national cohort study with pathological review. **Modern Pathology**. 2019;32(4):546-59.

84. MACFARLANE D.A. Cancer of the Adrenal Cortex - The natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**. 1958. p. 155–86.
85. RIBEIRO R.C., PINTO E.M., ZAMBETTI G.P., RODRIGUEZ-GALINDO C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: Contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Molecular and Cellular Endocrinology**. 2012;351(1):37-43.
86. DALL'IGNA P., VIRGONE C., DE SALVO G.L., BERTORELLE R., INDOLFI P., DE PAOLI A., et al. Adrenocortical tumors in Italian children: Analysis of clinical characteristics and P53 status. Data from the national registries. **Journal of Pediatric Surgery**. 2014;49(9):1367-71.
87. BUGG M.F., RIBEIRO R.C., ROBERSON P.K., LLOYD R.V., SANDRINI R., SILVA J.B., et al. Correlation of pathological features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia – a study of a brazilian population. **American Journal of Clinical Pathology**. 1994;101(5):625-9.
88. WIENEKE J.A., THOMPSON L.D.R., HEFFESS C.S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population - A clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **American Journal of Surgical Pathology**. 2003;27(7):867-81.
89. PINTO E.M., BILLERBECK A.E.C., FRAGOSO M., MENDONCA B.B., LATRONICO A.C. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2005;90(5):2976-81.
90. RAGAZZON B., LIBE R., GAUJOUX S., ASSIE G., FRATTICCI A., LAUNAY P., et al. Transcriptome Analysis Reveals that p53 and beta-Catenin Alterations Occur in a Group of Aggressive Adrenocortical Cancers. **Cancer Research**. 2010;70(21):8276-81.
91. BERRUTI A., GRISANTI S., PULZER A., CLAPS M., DAFFARA F., LOLI P., et al. Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients With Radically Resected Adrenocortical Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2017;102(4):1358-65.
92. BERRUTI A., BAUDIN E., GELDERBLOM H., HAAK H.R., PORPIGLIA F., FASSNACHT M., et al. Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**. 2012;23:131-8.
93. TERZOLO M., DE FRANCIA S., ARDITO A., PEROTTI P., FERRARI L., BERRUTI A. A current perspective on treatment of adrenocortical carcinoma. **Expert Opinion on Orphan Drugs**. 2014;2(9):911-21.
94. TERZOLO M., DAFFARA F., ARDITO A., ZAGGIA B., BASILE V., FERRARI L., et al. Management of adrenal cancer: a 2013 update. **Journal of Endocrinological Investigation**. 2014;37(3):207-17.
95. BERGENSTAL D.M., LIPSETT M.B., MOY R.H., HERTZ R. Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in man by O,P' DDD. **Transactions of the Association of American Physicians**. 1959;72:341-50.
96. TERZOLO M., BAUDIN A.E., ARDITO A., KROISS M., LEBoulLEUX S., DAFFARA F., et al. Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. **European Journal of Endocrinology**. 2013;169(3):263-70.

97. VARGHESE J., HABRA M.A. Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. **Current Opinion in Endocrinology Diabetes and Obesity**. 2017;24(3):208-14.
98. FASSNACHT M., HAHNER S., POLAT B., KOSCHKE A.C., KENN W., FLENTJE M., et al. Efficacy of adjuvant radiotherapy of the tumor bed on local recurrence of adrenocortical carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2006;91(11):4501-4.
99. SABOLCH A., ELSE T., GRIFFITH K.A., BEN-JOSEF E., WILLIAMS A., MILLER B.S., et al. Adjuvant Radiation Therapy Improves Local Control After Surgical Resection in Patients With Localized Adrenocortical Carcinoma. **International Journal of Radiation Oncology Biology Physics**. 2015;92(2):252-9.
100. HABRA M.A., EJAZ S., FENG L., DAS P., DENIZ F., GRUBBS E.G., et al. A Retrospective Cohort Analysis of the Efficacy of Adjuvant Radiotherapy after Primary Surgical Resection in Patients with Adrenocortical Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2013;98(1):192-7.
101. GHARZAI L.A., GREEN M.D., GRIFFITH K.A., ELSE T., MAYO C.S., HESSELTINE E., et al. Adjuvant Radiation Improves Recurrence-Free Survival and Overall Survival in Adrenocortical Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2019;104(9):3743-50.
102. KROISS M., QUINKLER M., JOHANSEN S., VAN ERP N.P., LANKHEET N., POLLINGER A., et al. Sunitinib in Refractory Adrenocortical Carcinoma: A Phase II, Single-Arm, Open-Label Trial. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2012;97(10):3495-503.
103. GARCIA-DONAS J., POLO S.H., GUIX M., DURAN M.A.C., MENDEZ-VIDAL M.J., JIMENEZ-FONSECA P., ET al. Phase II study of dovitinib in first line metastatic or (non resectable primary) adrenocortical carcinoma (ACC): SOGUG study 2011-03. **Journal of Clinical Oncology**. 2014;32(15):1.
104. O'SULLIVAN C., EDGERLY M., VELARDE M., WILKERSON J., VENKATESAN A.M., PITTALUGA S., ET al. The VEGF Inhibitor Axitinib Has Limited Effectiveness as a Therapy for Adrenocortical Cancer. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2014;99(4):1291-7.
105. WORTMANN S., QUINKLER M., RITTER C., KROISS M., JOHANSEN S., HAHNER S., et al. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. **European Journal of Endocrinology**. 2010;162(2):349-56.
106. DOGHMAN M., WAKIL A. E L., CARDINAUD B., THOMAS E., WANG J.L., ZHAO W., et al. Regulation of Insulin-like Growth Factor-Mammalian Target of Rapamycin Signaling by MicroRNA in Childhood Adrenocortical Tumors. **Cancer Research**. 2010;70(11):4666-75.
107. LERARIO A.M., WORDEN F.P., RAMM C.A., HESSELTINE E.A., STADLER W.M., ELSE T., et al. The Combination of Insulin-Like Growth Factor Receptor 1 (IGF1R) Antibody Cixutumumab and Mitotane as a First-Line Therapy for Patients with Recurrent/Metastatic Adrenocortical Carcinoma: a Multi-institutional NCI-Sponsored Trial (vol 5, pg 232, 2014). **Hormones & Cancer**. 2014;5(6):424-.
108. NAING A., LORUSSO P., FU S., HONG D., CHEN H.X., DOYLE L.A., et al. Insulin growth factor receptor (IGF-1R) antibody cixutumumab combined with the mTOR inhibitor temsirolimus in patients with metastatic adrenocortical carcinoma. **British Journal of Cancer**. 2013;108(4):826-30.
109. ALYATEEM G., NILUBOL N. Current Status and Future Targeted Therapy in Adrenocortical Cancer. **Frontiers in Endocrinology**. 2021;12:11.

110. PINTO E.M., CHEN X., EASTON J., FINKELSTEIN D., LIU Z.F., POUNDS S., et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nature Communications**. 2015;6:10.
111. PICKETTS D.J., HIGGS D.R., BACHOO S., BLAKE D.J., QUARRELL O.W.J., GIBBONS R.J. ATRX encodes a novel member of the SNF2 family of proteins: Mutations point to a common mechanism underlying the ATR-X syndrome. **Human Molecular Genetics**. 1996;5(12):1899-907.
112. VILLARD L., LOSSI A.M., CARDOSO C., PROUD V., CHIARONI P., COLLEAUX L., et al. Determination of the genomic structure of the XNP/ATRX gene encoding a potential zinc finger helicase. **Genomics**. 1997;43(2):149-55.
113. WATSON L.A., GOLDBERG H., BERUBE N.G. Emerging roles of ATRX in cancer. **Epigenomics**. 2015;7(8):1365-78.
114. CLYNES D., HIGGS D.R., GIBBONS R.J. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. **Trends in Biochemical Sciences**. 2013;38(9):461-6.
115. DRANE P., OUARARHNI K., DEPAUX A., SHUAIB M., HAMICHE A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. **Genes & Development**. 2010;24(12):1253-65.
116. ELSASSER S.J., HUANG H.D., LEWIS P.W., CHIN J.W., ALLIS C.D., PATEL D.J. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. **Nature**. 2012;491(7425):560-+.
117. GOLDBERG A.D., BANASZYNSKI L.A., NOH K.M., LEWIS P.W., ELSAESSER S.J., STADLER S., et al. Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. **Cell**. 2010;140(5):678-91.
118. HEAPHY C.M., DE WILDE R.F., JIAO Y.C., KLEIN A.P., EDIL B.H., SHI C.J., et al. Altered Telomeres in Tumors with ATRX and DAXX Mutations. **Science**. 2011;333(6041):425-.
119. GIBBONS R.J., PELLAGATTI A., GARRICK D., WOOD W.G., MALIK N., AYYUB H., et al. Identification of acquired somatic mutations in the chromatin remodelling factor ATRX in the alpha thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). **American Journal of Human Genetics**. 2003;73(5):333-.
120. SHAY J.W. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. **Cancer Discovery**. 2016;6(6):584-93.
121. HE J., MANSOURI A., DAS S. Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-Linked, the Alternative Lengthening of Telomere Phenotype, and Gliomagenesis: Current Understandings and Future Potential. **Frontiers in Oncology**. 2018;7:6.
122. BANASZYNSKI LAB. H3.3 and gene activation. Disponível em: <https://www.banaszynskilab.org/projects>: Acesso em 17.abr.2019.
123. CESARE A.J., REDDEL R.R. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. **Nature Reviews Genetics**. 2010;11(5):319-30.
124. KOVATCHEVA M., KLEIN M.E., TAP W.D., KOFF A. Mechanistic understanding of the role of ATRX in senescence provides new insight for combinatorial therapies with CDK4 inhibitors. **Molecular & Cellular Oncology**. 2018;5(1):2.
125. WATSON J.D. Origin of concatemeric T7 DNA. **Nature-New Biology**. 1972;239(94):197-&.

126. OLOVNIKOV A.M. Theory of marginotomy – Incomplete copying of template margin in enzymic-synthesis of polynucleotides and biological significance of phenomenon. **Journal of Theoretical Biology**. 1973;41(1):181-90.
127. DER-SARKISSIAN H., BACCHETTI S., CAZES L., LONDONO-VALLEJO J.A. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. **Oncogene**. 2004;23(6):1221-8.
128. GREIDER C.W., BLACKBURN E.H. Identification of a specific telomere terminal transferase-activity in tetrahymena extracts. *Cell*. 1985;43(2):405-13.
129. BLACKBURN E.H. Telomerases. **Annual Review of Biochemistry**. 1992;61:113-29.
130. WU X., TANAKA H. Aberrant reduction of telomere repetitive sequences in plasma cell-free DNA for early breast cancer detection. **Oncotarget**. 2015;6(30):29795-807.
131. KIM N.W., PIATYSZEK M.A., PROWSE K.R., HARLEY C.B., WEST M.D., HO P.L.C., et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science**. 1994;266(5193):2011-5.
132. SHAY J.W., BACCHETTI S. A survey of telomerase activity in human cancer. **European Journal of Cancer**. 1997;33(5):787-91.
133. LOVEJOY C.A., LI W.D., REISENWEBER S., THONGTHIP S., BRUNO J., DE LANGE T., et al. Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. **Plos Genetics**. 2012;8(7):16.
134. EPISKOPOU H., DRASKOVIC I., VAN BENEDEN A., TILMAN G., MATTIUSSI M., GOBIN M., et al. Alternative Lengthening of Telomeres is characterized by reduced compaction of telomeric chromatin. **Nucleic Acids Research**. 2014;42(7):4391-405.
135. COLE T.R.P., MAY A., HUGHES H.E. Alpha-Thalassemia Mental-Retardation syndrome - report of a family supporting X-linked inheritance. **Journal of Medical Genetics**. 1991;28(11):734-7.
136. DONNAI D., CLAYTONSMITH J., GIBBONS R.J., HIGGS D.R. The nondeletion alpha-thalassemia mental-retardation syndrome – Further support for X-linkage. **Journal of Medical Genetics**. 1991;28(11):742-5.
137. WILKIE A.O.M., GIBBONS R.J., HIGGS D.R., PEMBREY M.E. X-linked Alpha-thalassemia Mental-retardation – Spectrum of clinical-features in 3 related males. **Journal of Medical Genetics**. 1991;28(11):738-41.
138. JIAO Y.C., SHI C.J., EDIL B.H., DE WILDE R.F., KLIMSTRA D.S., MAITRA A., et al. DAXX/ATR, MEN1, and mTOR Pathway Genes Are Frequently Altered in Pancreatic Neuroendocrine Tumors. **Science**. 2011;331(6021):1199-203.
139. GIBBONS R.J., PELLAGATTI A., GARRICK D., WOOD W.G., MALIK N., AYYUB H., et al. Identification of acquired somatic mutations in the gene encoding chromatin-remodeling factor ATRX in the alpha-thalassemia myelodysplasia syndrome (ATMDS). **Nature Genetics**. 2003;34(4):446-9.
140. BARTHEL F.P., ZHENG S.Y., VERHAAK R.G. Comprehensive analysis of telomere length and telomere maintenance mechanisms across 31 human cancer types. **Cancer Research**. 2017;77:2.

141. ALAN O., TELLI T.A., TUYLU T.B., ARIKAN R., DEMIRCAN N.C., ERCELEP O., et al. Prognostic factors in progressive high-grade glial tumors treated with systemic approach: A single center experience. **Journal of Oncology Pharmacy Practice**. 11.
142. LACAYO N.J., MESHINCHI S., KINNUNEN P., YU R., WANG Y., STUBER C.M., et al. Gene expression profiles at diagnosis in de novo childhood AML patients identify FLT3 mutations with good clinical outcomes. **Blood**. 2004;104(9):2646-54.
143. BOWER K., NAPIER C.E., COLE S.L., DAGG R.A., LAU L.M.S., DUNCAN E.L., et al. Loss of Wild-Type ATRX Expression in Somatic Cell Hybrids Segregates with Activation of Alternative Lengthening of Telomeres. **Plos One**. 2012;7(11):10.
144. LIU X.Y., GERGES N., KORSHUNOV A., SABHA N., KHUONG-QUANG D.A., FONTEBASSO A.M., et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. **Acta Neuropathologica**. 2012;124(5):615-25.
145. WIESTLER B., CAPPER D., HOLLAND-LETZ T., KORSHUNOV A., VON DEIMLING A., PFISTER S.M., et al. ATRX loss refines the classification of anaplastic gliomas and identifies a subgroup of IDH mutant astrocytic tumors with better prognosis. **Acta Neuropathologica**. 2013;126(3):443-51.
146. MARINONI I., KURRER A.S., VASSELLA E., DETTMER M., RUDOLPH T., BANZ V., et al. Loss of DAXX and ATRX Are Associated With Chromosome Instability and Reduced Survival of Patients With Pancreatic Neuroendocrine Tumors. **Gastroenterology**. 2014;146(2):453-+.
147. CAI J.Q., CHEN J., ZHANG W., YANG P., ZHANG C.B., LI M.Y., et al. Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors. **Oncotarget**. 2015;6(20):18105-15.
148. LEE J.C., JENG Y.M., LIAU J.Y., TSAI J.H., HSU H.H., YANG C.Y. Alternative lengthening of telomeres and loss of ATRX are frequent events in pleomorphic and dedifferentiated liposarcomas. **Modern Pathology**. 2015;28(8):1064-73.
149. FISHBEIN L., KHARE S., WUBBENHORST B., DESLOOVER D., D'ANDREA K., MERRILL S., et al. Whole-exome sequencing identifies somatic ATRX mutations in pheochromocytomas and paragangliomas. **Nature Communications**. 2015;6:6.
150. LIAU J.Y., LEE J.C., TSAI J.H., YANG C.Y., LIU T.L., KE Z.L., et al. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. **Modern Pathology**. 2015;28(12):1545-54.
151. YANG C.Y., LIAU J.Y., HUANG W.J., CHANG Y.T., CHANG M.C., LEE J.C., et al. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. **American Journal of Translational Research**. 2015;7(10):2072-81.
152. CAI J.Q., ZHU P., ZHANG C.B., LI Q.B., WANG Z.L., LI G.Z., et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. **Oncotarget**. 2016;7(13):16384-95.
153. FEDERICO S.M., CHEN X., EASTON J., WU J.R., MAO S.H., LIU Y.L., et al. Association of age at diagnosis and stage of disease with ATRX mutations in neuroblastoma. **Journal of Clinical Oncology**. 2016;34(15):2.

154. IKEMURA M., SHIBAHARA J., MUKASA A., TAKAYANAGI S., AIHARA K., SAITO N., et al. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. **Histopathology**. 2016;69(2):260-7.
155. BARTHEL F.P., WEI W., TANG M., MARTINEZ-LEDESMA E., HU X., AMIN S.B., et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. **Nature Genetics**. 2017;49(3):349-57.
156. SINGHI A.D., LIU T.C., RONCAIOLI J.L., CAO D.F., ZEH H.J., ZUREIKAT A.H., et al. Alternative Lengthening of Telomeres and Loss of DAXX/ATRX Expression Predicts Metastatic Disease and Poor Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. **Clinical Cancer Research**. 2017;23(2):600-9.
157. CHAN C.S., LADDHA S.V., LEWIS P.W., KOLETSKY M.S., ROBZYK K., DA SILVA E., et al. ATRX, DAXX or MEN1 mutant pancreatic neuroendocrine tumors are a distinct alpha-cell signature subgroup. **Nature Communications**. 2018;9:10.
158. CHOU A., ITCHINS M., DE REUVER P.R., ARENA J., CLARKSON A., SHEEN A., et al. ATRX loss is an independent predictor of poor survival in pancreatic neuroendocrine tumors. **Human Pathology**. 2018;82:249-57.
159. AHVENAINEN T.V., MAKINEN N.M., VON NANDELSTADH P., VAHTERISTO M.E.A., PASANEN A.M., BUTZOW R.C., et al. Loss of ATRX/DAXX expression and alternative lengthening of telomeres in uterine leiomyomas. **Cancer**. 2018;124(24):4650-6.
160. LU H.C., APICELLI A.J., EULO V., PEKMEZCI M., HIRBE A.C., DAHIYA S. Aberrant ATRX Protein Expression is Associated with Worse Survival in NF1-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. **Modern Pathology**. 2018;31:661-.
161. REN X.L., TU C., TANG Z.C., MA R.F., LI Z.H. Alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas (Review). **Oncology Letters**. 2018;15(5):7489-96.
162. ZEINELDIN M., FEDERICO S.M., GRIFFITH L., JEON J., CHEN X., EASTON J., et al. Synthetic lethality between ATRX mutations and MYCN amplification in neuroblastoma. **Cancer Research**. 2018;78(19):2.
163. FAN H.C., CHEN C.M., CHI C.S., TSAI J.D., CHIANG K.L., CHANG Y.K., et al. Targeting Telomerase and ATRX/DAXX Inducing Tumor Senescence and Apoptosis in the Malignant Glioma. **International Journal of Molecular Sciences**. 2019;20(1):21.
164. JOB S., DRASKOVIC I., BURNICHON N., BUFFET A., CROS J., LEPINE C., et al. Telomerase Activation and ATRX Mutations Are Independent Risk Factors for Metastatic Pheochromocytoma and Paraganglioma. **Clinical Cancer Research**. 2019;25(2):760-70.
165. OPPEL F., TAO T., SHI H., ROSS K.N., ZIMMERMAN M.W., HE S., et al. Loss of atrx cooperates with p53-deficiency to promote the development of sarcomas and other malignancies. **Plos Genetics**. 2019;15(4):22.
166. TERRA S., XIE H., BOLAND J.M., MANSFIELD A.S., MOLINA J.R., RODEN A.C. Loss of ATRX expression predicts worse prognosis in pulmonary carcinoid tumors. **Human Pathology**. 2019;94:78-85.

167. ZHENG B.Q., QU Y.T., WANG J., SHI Y.Q., YAN W.J. Pathogenic and Targetable Genetic Alterations in Resected Recurrent Undifferentiated Pleomorphic Sarcomas Identified by Targeted Next-generation Sequencing. **Cancer Genomics & Proteomics**. 2019;16(3):221-8.
168. HENSLEY M.L., CHAVAN S.S., SOLIT D.B., MURALI R., SOSLOW R., CHIANG S., et al. Genomic Landscape of Uterine Sarcomas Defined Through Prospective Clinical Sequencing. **Clinical Cancer Research**. 2020;26(14):3881-8.
169. MAZIERES J., HE B., YOU L., XU Z.D., JABLONS D.A. Wnt signaling in lung cancer. **Cancer Letters**. 2005;222(1):1-10.
170. TAKIGAWA Y., BROWN A.M.C. Wnt Signaling in Liver Cancer. **Current Drug Targets**. 2008;9(11):1013-24.
171. AREND R.C., LONDONO-JOSHI A.I., STRAUGHN J.M., BUCHSBAUM D.J. The Wnt/beta-catenin pathway in ovarian cancer: A review. **Gynecologic Oncology**. 2013;131(3):772-9.
172. HEATON J.H., WOOD M.A., KIM A.C., LIMA L.O., BARLASKAR F.M., ALMEIDA M.Q., et al. Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and beta-Catenin. **American Journal of Pathology**. 2012;181(3):1017-33.
173. FEARON E.R., SPENCE J.R. Cancer Biology: A New RING to Wnt Signaling. **Current Biology**. 2012;22(19):R849-R51.
174. MACDONALD B.T., TAMAI K., HE X. WNT/beta-Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. **Developmental Cell**. 2009;17(1):9-26.
175. VLAD-FIEGEN A., LANGERAK A., EBERTH S., MULLER O. The Wnt pathway destabilizes adherens junctions and promotes cell migration via beta-catenin and its target gene cyclin D1. **FEBS Open Bio**. 2012;2:26-31.
176. LIM X.H., NUSSE R. Wnt Signaling in Skin Development, Homeostasis, and Disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**. 2013;5(2):25.
177. STEINHART Z., ANGERS S. Wnt signaling in development and tissue homeostasis. **Development**. 2018;145(11):8.
178. KLAUS A., BIRCHMEIER W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. **Nature Reviews Cancer**. 2008;8(5):387-98.
179. PARK H.B., KIM J.W., BAEK K.H. Regulation of Wnt Signaling through Ubiquitination and Deubiquitination in Cancers. **International Journal of Molecular Sciences**. 2020;21(11):28.
180. PICKART C.M., EDDINS M.J. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. **Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research**. 2004;1695(1-3):55-72.
181. TAURIELLO D.V.F., MAURICE M.M. The various roles of ubiquitin in Wnt pathway regulation. **Cell Cycle**. 2010;9(18):3700-9.
182. LIU C.M., KATO Y., ZHANG Z.H., DO V.M., YANKNER B.A., HE X. beta-Trcp couples beta-catenin phosphorylation-degradation and regulates Xenopus axis formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. 1999;96(11):6273-8.
183. RAISCH J., COTE-BIRON A., RIVARD N. A Role for the WNT Co-Receptor LRP6 in Pathogenesis and Therapy of Epithelial Cancers. **Cancers**. 2019;11(8):23.

184. ROSLAN Z., MUHAMAD M., SELVARATNAM L., AB-RAHIM S. The Roles of Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Proteins 5, 6, and 8 in Cancer: A Review. **Journal of Oncology**. 2019;2019:6.
185. TU J.H., PARK S., YU W.S., ZHANG S., WU L., CARMON K., et al. The most common RNF43 mutant G659Vfs*41 is fully functional in inhibiting Wnt signaling and unlikely to play a role in tumorigenesis. **Scientific Reports**. 2019;9:12.
186. ZHONG Z., VIRSHUP D.M. Wnt Signaling and Drug Resistance in Cancer. **Molecular Pharmacology**. 2020;97(2):72-89.
187. DE LAU W., PENG W.C., GROS P., CLEVERS H. The R-spondin/Lgr5/Rnf43 module: regulator of Wnt signal strength. **Genes & Development**. 2014;28(4):305-16.
188. HAO H-X., XIE Y., ZHANG Y., CHARLAT O., OSTER E., AVELLO M., et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. **Nature**. 2012;485(7397):195-U76.
189. ENSEMBL DATABASE. ZNRF3 gene – ENSG00000183579. Disponível em: https://useast.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000183579;r=22:28883572-29057488 Acesso em 16. Mai. 2017.
190. ZHOU Y.H., LAN J., WANG W., SHI Q., LAN Y., CHENG Z.Y., et al. ZNRF3 acts as a tumour suppressor by the Wnt signalling pathway in human gastric adenocarcinoma. **Journal of Molecular Histology**. 2013;44(5):555-63.
191. HAO H.X., XIE Y., ZHANG Y., CHARLAT O., OSTER E., AVELLO M., et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. **Nature**. 2012;485(7397):195-U76.
192. QIN H.Z., CAI A.Z., XI H.Q., YUAN J., CHEN L. ZnRF3 Induces Apoptosis of Gastric Cancer Cells by Antagonizing Wnt and Hedgehog Signaling. **Cell Biochemistry and Biophysics**. 2015;73(2):361-7.
193. YU N.H., ZHU H., TAO Y.M., HUANG Y.P., SONG X.P., ZHOU Y., ET al. Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. **Oncotargets and Therapy**. 2016;9:6679-87.
194. BOND C.E., MCKEONE D.M., KALIMUTHO M., BETTINGTON M.L., PEARSON S.A., DUMENIL T.D., et al. RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. **Oncotarget**. 2016;7(43):70589-600.
195. QIU W.W., YANG Z.L., FAN Y.B., ZHENG Q. ZNRF3 is downregulated in papillary thyroid carcinoma and suppresses the proliferation and invasion of papillary thyroid cancer cells. **Tumor Biology**. 2016;37(9):12665-72.
196. SHI J.C., JIANG X.G., YU Z.J., HE G.Q., NING H.Y., WU Z.X., et al. ZNRF3 contributes to the growth of lung carcinoma via inhibiting Wnt/beta-catenin pathway and is regulated by miR-93. **Tumor Biology**. 2016;37(3):3051-7.
197. XU E.J., ZHAO J.Q., MA J., WANG C., ZHANG C.L., JIANG H., et al. miR-146b-5p promotes invasion and metastasis contributing to chemoresistance in osteosarcoma by targeting zinc and ring finger 3. **Oncology Reports**. 2016;35(1):275-83.

198. WANG Z.W., WANG Y.L., REN H.T., JIN Y.Y., GUO Y. ZNRF3 Inhibits the Invasion and Tumorigenesis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Inactivating the Wnt/beta-Catenin Pathway. **Oncology Research**. 2017;25(4):571-7.
199. QIAO G.E., DAI C.G., HE Y., SHI J.J., XU C.F. Effects of miR-106b-3p on cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition, and targeting of ZNRF3 in esophageal squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Medicine**. 2019;43(4):1817-29.
200. BASHAM K.J., RODRIGUEZ S., TURCU A.F., LERARIO A.M., LOGAN C.Y., RYSZTAK M.R., et al. A ZNRF3-dependent Wnt/beta-catenin signaling gradient is required for adrenal homeostasis. **Genes & Development**. 2019;33(3-4):209-20.
201. KONONEN J., BUBENDORF L., KALLIONIEMI A., BARLUND M., SCHRAML P., LEIGHTON S., et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nature Medicine**. 1998;4(7):844-7.
202. KULKARNI G., TURBIN D.A., AMIRI A., JEGANATHAN S., ANDRADE-NAVARRO M.A., WU T.D., et al. Expression of protein elongation factor eEF1A2 predicts favorable outcome in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**. 2007;102(1):31-41.
203. HASSAN S., FERRARIO C., MAMO A., BASIK M. Tissue microarrays: emerging standard for biomarker validation. **Current Opinion in Biotechnology**. 2008;19(1):19-25.
204. CAMP R.L., NEUMEISTER V., RIMM D.L. A Decade of Tissue Microarrays: Progress in the Discovery and Validation of Cancer Biomarkers. **Journal of Clinical Oncology**. 2008;26(34):5630-7.
205. GLASEL J.A. Validity of nucleic-acid purities monitored by 260NM/280NM absorbency ratios. **Biotechniques**. 1995;18(1):62-3.
206. ZONTA E., NIZARD P., TALY V. Assessment of DNA Integrity, Applications for Cancer Research. **Advances in Clinical Chemistry**, Vol 70. 2015;70:197-246.
207. MRC-HOLLAND. Salsa MLPA Probemix P013 ATRX. Disponível em: <https://www.mrcholland.com/product/P013/552> Acesso em: 20 fev.2019.
208. MRC-HOLLAND. Salsa MLPA Probemix P476 ZNRF3. Disponível em: <https://www.mrcholland.com/product/P476/4249> Acesso em 20 fev. 2019.
209. GIBSON U.E.M., HEID C.A., WILLIAMS P.M. A novel method for real time quantitative RT PCR. **Genome Research**. 1996;6(10):995-1001.
210. HEID C.A., STEVENS J., LIVAK K.J., WILLIAMS P.M. Real time quantitative PCR. **Genome Research**. 1996;6(10):986-94.
211. THERMO FISHER. Real-Time (qPCR) Learning Center - Introduction to Gene Expression Getting Started Guide. Disponível em: www.thermofisher.com/qpcr/education Acesso em 16 jan. 2019.
212. LACOMBE A.M.F., SOARES I.C., MARIANI B.M.D., NISHI M.Y., BEZERRA-NETO J.E., CHARCHAR H.D., et al. Sterol O-Acyl Transferase 1 as a Prognostic Marker of Adrenocortical Carcinoma. **Cancers**. 2020;12(1):12.
213. BRITO L.P., RIBEIRO T.C., ALMEIDA M.Q., JORGE A.A.D., SOARES I.C., LATRONICO A.C., et al. The role of fibroblast growth factor receptor 4 overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. **Endocrine-Related Cancer**. 2012;19(3):L11-L3.

214. THERMO FISHER. Real-Time (qPCR) Learning Center - Basics of Real Time. Disponível em: www.thermofisher.com/qpcr/education. Acesso em 03 mar. 2019.
215. LIVAK K.J., SCHMITTGEN T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(T)(-Delta Delta C) method. **Methods**. 2001;25(4):402-8.
216. YUAN J.S., REED A., CHEN F., STEWART C.N. Statistical analysis of real-time PCR data. **Bmc Bioinformatics**. 2006;7:12.
217. LAUSEN B., SCHUMACHER M. Maximally selected rank statistics. **Biometrics**. 1992;48(1):73-85.
218. ALMEIDA M.Q., FRAGOSO M.C., LOFTI C.F., SANTOS M.G., NISHI M.Y., COSTA M.H. et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. **Journal Clinical of Endocrinology and Metabolism**. ; 2008. p. 3524-31.
219. DE SOUSA G.R.V., SOARES I.C., FARIA A.M., DOMINGUES V.B., WAKAMATSU A., LERARIO A.M., et al. DAX1 Overexpression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Synergic Role with SF1 in Tumorigenesis. **Hormone and Metabolic Research**. 2015;47(9):656-61.
220. DE SOUSA G.R.V., RIBEIRO T.C., FARIA A.M., MARIANI B.M.P., LERARIO A.M., ZERBINI M.C.N., et al. Low DICER1 expression is associated with poor clinical outcome in adrenocortical carcinoma. **Oncotarget**. 2015;6(26):22724-33.
221. FARIA A.M., SBIERA S., RIBEIRO T.C., SOARES I.C., MARIANI B.M.P., FREIRE D.S., et al. Expression of LIN28 and its regulatory microRNAs in adult adrenocortical cancer. **Clinical Endocrinology**. 2015;82(4):481-8.
222. LANDIS J.R., KOCH G.G. Measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**. 1977;33(1):159-74.
223. PINHEIRO C., GRANJA S., LONGATTO A., FARIA A.M., FRAGOSO M., LOVISOLO S.M., et al. GLUT1 expression in pediatric adrenocortical tumors: a promising candidate to predict clinical behavior. **Oncotarget**. 2017;8(38):63835-45.
224. TADJINE M., LAMPRON A., OUADI L., HORVATH A., STRATAKIS C.A., BOURDEAU I. Detection of somatic beta-catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). **Clinical Endocrinology**. 2008;69(3):367-73.
225. COX D.R. Regression models and life-tables. **Journal of the Royal Statistical Society Series B-Statistical Methodology**. 1972;34(2):187-+.
226. SCHOENFELD D. Partial residuals for the proportional hazards regression-model. **Biometrika**. 1982;69(1):239-41.
227. GRAMBSCH P.M., THERNEAU T.M. Proportional hazards tests and diagnosis based on weighted residuals. **Biometrika**. 1994;81(3):515-26.
228. KAMILARIS C.D.C., HANNAH-SHMOUNI F., STRATAKIS C.A. Adrenocortical tumorigenesis: Lessons from genetics. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2020;34(3):19.
229. RAYMOND V.M., ELSE T., EVERETT J.N., LONG J.M., GRUBER S.B., HAMMER G.D. Prevalence of Germline TP53 Mutations in a Prospective Series of Unselected Patients with

Adrenocortical Carcinoma. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 2013;98(1):E119-E25.

230. WASSERMAN J.D., NOVOKMET A., EICHLER-JONSSON C., MALKIN D. Prevalence and function of p53 mutations among children with adrenocortical carcinoma (ADCC). **Cancer Research**. 2011;71:1.

231. NATIONAL CANCER INSTITUTE. The Cancer Genome Atlas – Adrenocortical carcinoma. Disponível em: <https://portal.gdc.cancer.gov/projects/TCGA-ACC> Acesso em 04 jan.2021.

232. DE REYNIES A., ASSIE G., RICKMAN D.S., TISSIER F., GROUSSIN L., RENE-CORRAIL F., et al. Gene Expression Profiling Reveals a New Classification of Adrenocortical Tumors and Identifies Molecular Predictors of Malignancy and Survival. **Journal of Clinical Oncology**. 2009;27(7):1108-15.

233. TOTH M., RACZ K., VARGA I., ADLEFF V., JAKAB C., FUTO L., et al. Plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in patients with hyperfunctioning and non-hyperfunctioning adrenal tumors before and after adrenal surgery. **European Journal of Endocrinology**. 1997;136(3):290-5.

234. BERTAGNA C., ORTH D.N. Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical-center (1951 to 1978). **American Journal of Medicine**. 1981;71(5):855-75.

235. OSELLA G., TERZOLO M., BORRETTA G., MAGRO G., ALI A., PIOVESAN A., et al. Endocrine evaluation of incidentally discovered adrenal masses (incidentalomas). **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**. 1994;79(6):1532-9.

236. SCHWEITZER S., KUNZ M., KURLBAUM M., VEY J., KENDL S., DEUTSCHBEIN T., et al. Plasma steroid metabolome profiling for the diagnosis of adrenocortical carcinoma. **European Journal of Endocrinology**. 2019;180(2):117-25.

237. SUZUKI S., MINAMIDATE T., SHIGA A., RUIKE Y., ISHIWATA K., NAITO K., et al. Steroid metabolites for diagnosing and predicting clinicopathological features in cortisol-producing adrenocortical carcinoma. **Bmc Endocrine Disorders**. 2020;20(1):9.

238. STILLER C.A.. International variations in the incidence of childhood carcinomas. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**. 1994;3(4):305-10.

239. PARLOWSKY T., BUCSKY P., HOF M., KAATSCH P. Malignant endocrine tumours in childhood and adolescence - Results of a retrospective analysis. **Klinische Padiatrie**. 1996;208(4):205-9.

240. LALLI E., FIGUEIREDO B.C. Pediatric adrenocortical tumors : what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)*; 2015 p. 6:23.

241. RIBEIRO R.C., MICHALKIEWICZ E.L., FIGUEIREDO B.C., DELACERDA L., SANDRINI F., PIANOVSKY M.D., et al. Adrenocortical tumors in children. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 2000;33(10):1225-34.

242. REDLICH A., BOXBERGER N., STRUGALA D., FRUHWALD M.C., LEUSCHNER I., KROPF S., et al. Systemic Treatment of Adrenocortical Carcinoma in Children: Data from the German GPOH-MET 97 Trial. **Klinische Padiatrie**. 2012;224(6):366-71.

243. FRAGOSO M., ALMEIDA M.Q., MAZZUCO T.L., MARIANI B.M.P., BRITO L.P., GONCALVES T.C., 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. **European Journal of Endocrinology**. 2012;166(1):61-7.
244. STECCHIN M.F., BRAID Z., MORE C.B., ARAGON D.C., CASTRO M., MOREIRA A.C., et al. Gonadotropin-dependent pubertal disorders are common in patients with virilizing adrenocortical tumors in childhood. **Endocrine Connections**. 2019;8(5):579-89.
245. DANEMAN A., CHAN H.S.L., MARTIN J.. Adrenal carcinoma and adenoma in children – a review of 17 patients. **Pediatric Radiology**. 1983;13(1):11-8.
246. LIMA, L.O. Estudo da Beta-catenina em tumores adrenocorticais humanos. 2014. Tese (Doutorado em Endocrinologia) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014. doi:10.11606/T.5.2014.tde-14082014-151107. Acesso em: 2021-04-29.
247. LIMA L.O., LERARIO A.M., ALENCAR G.A., BRITO L.P., ALMEIDA M.Q., DOMENICE S., et al. Clinical and molecular aspects of a pediatric metachronous adrenocortical tumor. **Arquivos Brasileiros De Endocrinologia E Metabologia**. 2011;55(1):72-7.
248. VARLEY J.M., MCGOWN G., THORNCROFT M., JAMES L.A., MARGISON G.P., FORSTER G., et al. Are there low-penetrance TP53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. **American Journal of Human Genetics**. 1999;65(4):995-1006.
249. LALLI E., FIGUEIREDO B.C.. Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. **Frontiers in Endocrinology**. 2015;6:9.
250. PINTO E.M., ZAMBETTI G.P., RODRIGUEZ-GALINDO C. Pediatric adrenocortical tumours. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**. 2020;34(3):14.
251. LIOU L.S., KAY R. Adrenocortical carcinoma in children - Review and recent innovations. **Urologic Clinics of North America**. 2000;27(3):403-+.
252. MAGRO G., ESPOSITO G., CECCHETTO G., DALL'IGNA P., MARCATO R., GAMBINI C., et al. Pediatric adrenocortical tumors: morphological diagnostic criteria and immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase type 2 and human leucocyte-associated antigen (HLA) class II antigens. Results from the Italian Pediatric Rare Tumor (TREP) Study project. **Human Pathology**. 2012;43(1):31-9.
253. CHATTERJEE G., DASGUPTA S., MUKHERJEE G., SENGUPTA M., ROY P., ARUN I., et al. Usefulness of Wienes criteria in assessing morphologic characteristics of adrenocortical tumors in children. **Pediatric Surgery International**. 2015;31(6):563-71.
254. ZHENG S., CHERNIACK A.D., DEWAL N., MOFFITT R.A., DANILOVA L., MURRAY B.A., et al. Comprehensive Pan-Genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Cancer Research**. 2015;75.
255. BORGES K.S., PIGNATTI E., LENG S., KARIYAWASAM D., RUIZ-BABOT G., RAMALHO F.S., et al. Wnt/beta-catenin activation cooperates with loss of p53 to cause adrenocortical carcinoma in mice. **Oncogene**. 2020;39(30):5282-91.
256. VATRANO S., VOLANTE M., DUREGON E., GIORCELLI J., IZZO S., RAPA I., et al. Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas. **Modern Pathology**. 2018;31(8):1257-69.

257. PARRALES A., IWAKUMA T. Targeting Oncogenic Mutant p53 for Cancer Therapy. **Frontiers in Oncology**. 2015;5:13.
258. MEEK D.W. Regulation of the p53 response and its relationship to cancer. **Biochemical Journal**. 2015;469:325-46.
259. LEVINE A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. **Cell**. 1997;88(3):323-31.
260. OREN M. Regulation of the p53 tumor suppressor protein. **Journal of Biological Chemistry**. 1999;274(51):36031-4.
261. PETITJEAN A., MATHE E., KATO S., ISHIOKA C., TAVTIGIAN S.V., HAINAUT P., et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: Lessons from recent developments in the IARC TP53 database. **Human Mutation**. 2007;28(6):622-9.
262. LIU J., STEVENS J., ROTE C.A., YOST H.J., HU Y.X., NEUFELD K.L., et al. Siah-1 mediates a novel beta-catenin degradation pathway linking p53 to the adenomatous polyposis coli protein. **Molecular Cell**. 2001;7(5):927-36.
263. MATSUZAWA S., REED J.C. Siah-1, SIP, and Ebi collaborate in a novel pathway for beta-catenin degradation linked to p53 responses. **Molecular Cell**. 2001;7(5):915-26.
264. DAS L., KOKATE S.B., DIXIT P., RATH S., ROUT N., SINGH S.P., et al. Membrane-bound beta-catenin degradation is enhanced by ETS2-mediated Siah1 induction in Helicobacter pylori-infected gastric cancer cells. **Oncogenesis**. 2017;6:12.
265. ROPERCH JP, ALVARO V, PRIEUR S, TUYNDER M, NEMANI M, LETHROSNE F, et al. Inhibition of presenilin 1 expression is promoted by p53 and p21(WAF-1) and results in apoptosis and tumor suppression. **Nature Medicine**. 1998;4(7):835-8.
266. ZHANG Z.H., HARTMANN H., DO V.M., ABRAMOWSKI D., STURCHLER-PIERRAT C., STAUFENBIEL M., et al. Destabilization of beta-catenin by mutations in presenilin-1 potentiates neuronal apoptosis. **Nature**. 1998;395(6703):698-702.
267. WANG J., SHOU J., CHEN X.B. Dickkopf-1, an inhibitor of the Wnt signaling pathway, is induced by p53. **Oncogene**. 2000;19(14):1843-8.
268. MIYAGISHI M., FUJII R., HATTA M., YOSHIDA E., ARAYA N., NAGAFUCHI A., et al. Regulation of Lef-mediated transcription and p53-dependent pathway by associating beta-catenin with CBP/p300. **Journal of Biological Chemistry**. 2000;275(45):35170-5.
269. SADOT E., GEIGER B., OREN M., BEN-ZE'EV A. Down-regulation of beta-catenin by activated p53. **Molecular and Cellular Biology**. 2001;21(20):6768-81.
270. SCHWARTZENTRUBER J., KORSHUNOV A., LIU X.Y., JONES D.T.W., PFAFF E., JACOB K., et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. **Nature**. 2012;482(7384):226-U119.
271. BERBEGALL A.P., VILLAMEN E., TADEO I., MARTINSSON T., CANETE A., CASTEL V., et al. Neuroblastoma after Childhood: Prognostic Relevance of Segmental Chromosome Aberrations, ATRX Protein Status, and Immune Cell Infiltration. **Neoplasia**. 2014;16(6):471-80.
272. BERRUTI A., TERZOLO M., SPERONE P., PIA A., DELLA CASA S., GROSS D.J., et al. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocrine-Related Cancer**. 2005;12(3):657-66.

273. DAVIDSON B., MCFADDEN E., HOLTH A., BRUNETTI M., FLORENES V.A.. Death domain-associated protein (DAXX) expression is associated with poor survival in metastatic high-grade serous carcinoma. **Virchows Archiv.** 2020;477(6):857-64.
274. MARGONIS G.A., KIM Y., TRAN T.B., POSTLEWAIT L.M., MAITHEL S.K., WANG T.S., et al. Outcomes after resection of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma. **American Journal of Surgery.** 2016;211(6):1106-13.
275. VANBRABANT T., FASSNACHT M., ASSIE G., DEKKERS O.M. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. **European Journal of Endocrinology.** 2018;179(6):429-36.
276. CLEMENTS W.M., WANG J., SARNAIK A., KIM O.J., MACDONALD J., FENOGLIO-PREISER C., et al. beta-catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. **Cancer Research.** 2002;62(12):3503-6.
277. HAO H-X., JIANG X., CONG F. Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. **Cancers.** 2016;8(6).
278. FAILLOT S., ASSIE G. The genomics of adrenocortical tumors. **European Journal of Endocrinology.** 2016;174(6):R249-R65.
279. ESPIARD S., BERTHERAT J. The genetics of adrenocortical tumors. In: J. B., editor.: **Endocrinology and Metabolism Clinics of North America** . 2015 Jun. p. 3 11 -34.
280. TISSIER F., CAVARD C., GROUSSIN L., PERLEMOINE K., FUMEY G., HAGNERE A.M., et al. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: Activation of the wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer Research.** 2005;65(17):7622-7.
281. GOMES D.C., LEAL L.F., MERMEJO L.M., SCRIDELI C.A., MARTINELLI C.E., FRAGOSO M., et al. Sonic Hedgehog Signaling Is Active in Human Adrenal Cortex Development and Deregulated in Adrenocortical Tumors. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism.** 2014;99(7):E1209-E16.
282. TERZOLO M., BOCCUZZI A., BOVIO S., CAPPIA S., DE GIULI P., ALI A., et al. Immunohistochemical assessment of Ki67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. **Urology.** 2001;57(1):176-82.
283. SASANO H., SUZUKI T., MORIYA T. Recent advances in histopathology and immunohistochemistry of adrenocortical carcinoma. **Endocrine Pathology.** 2007;17(4):345-54.
284. XIE Y.B., TAN Y.L., YANG C., ZHANG X.H., XU C., QIAO X.X., et al. Omics-based integrated analysis identified ATRX as a biomarker associated with glioma diagnosis and prognosis. **Cancer Biology & Medicine.** 2019;16(4):784-96.

Anexo 1. Protocolo para extração de DNA e RNA

AllPrep DNA/RNA Mini Handbook

For simultaneous purification of genomic
DNA and total RNA from the same animal
cell or tissue sample

Protocol: Simultaneous Purification of Genomic DNA and Total RNA from Animal Tissues

Determining the correct amount of starting material

It is essential to use the correct amount of starting material in order to obtain optimal nucleic acid yield and purity. A maximum amount of 30 mg fresh or frozen tissue or 15–20 mg RNeasy later stabilized tissue (which is partially dehydrated) can generally be processed. For most tissues, the DNA binding capacity of the AllPrep DNA spin column, the RNA binding capacity of the RNeasy spin column, and the lysing capacity of Buffer RLT Plus will not be exceeded by these amounts. However, smaller amounts may allow more efficient separation of DNA and RNA. Average DNA and RNA yields from various tissues are given in Table 2 (page 14).

For maximum RNA yields from liver, 50% ethanol (instead of 70% ethanol) should be used in step 6 of the procedure.

Some tissues, such as spleen and thymus, contain very high amounts of DNA, which will overload the AllPrep DNA spin column (unless less than 5 mg tissue is used as starting material). For these tissues, we recommend performing DNase digestion on the RNeasy spin column membrane if the eluted RNA will be used in downstream applications sensitive to very small amounts of DNA (for further details, see Appendix E, page 47).

RNA yields from skeletal muscle, heart, and skin tissue may be low due to the abundance of contractile proteins, connective tissue, and collagen. For purification of genomic DNA and total RNA from these tissues, we recommend using the DNeasy Tissue Kit and the RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit, respectively (see page 50 for ordering information).

If there is no information about the nature of your starting material, we recommend starting with no more than 10 mg tissue. Depending on nucleic acid yield and purity, it may be possible to use up to 30 mg tissue in subsequent preparations.

Do not overload the AllPrep DNA spin column, as this will lead to copurification of DNA with RNA. Do not overload the RNeasy spin column, as this will significantly reduce RNA yield and purity.

Important points before starting

- If using the AllPrep DNA/RNA Mini Kit for the first time, read “Important Notes” (page 12).
- If preparing RNA for the first time, read Appendix A (page 38).
- For optimal results, stabilize harvested tissues immediately in RNAlater RNA Stabilization Reagent (see the *RNAlater Handbook*). Tissues can be stored in the reagent for up to 1 day at 37°C, 7 days at 18–25°C, or 4 weeks at 2–8°C, or archived at –20°C or –80°C.
- Fresh, frozen, or RNAlater stabilized tissues can be used. Tissues can be stored at –70°C for several months. Flash-freeze tissues in liquid nitrogen, and immediately transfer to –70°C. Do not allow tissues to thaw during weighing or handling prior to disruption in Buffer RLT Plus. Homogenized tissue lysates from step 3 can also be stored at –70°C for several months. Incubate frozen lysates at 37°C in a water bath until completely thawed and salts are dissolved before continuing with step 4. Avoid prolonged incubation, which may compromise RNA integrity.
- If desired, more than 30 mg tissue can be disrupted and homogenized at the start of the procedure (increase the volume of Buffer RLT Plus proportionately). Use a portion of the homogenate corresponding to no more than 30 mg tissue for nucleic acid purification, and store the rest at –80°C.
- β -mercaptoethanol (β -ME) must be added to Buffer RLT Plus before use. Add 10 μ l β -ME per 1 ml Buffer RLT Plus. Dispense in a fume hood and wear appropriate protective clothing. Buffer RLT Plus is stable at room temperature (15–25°C) for 1 month after addition of β -ME.
- Buffer RPE, Buffer AW1, and Buffer AW2 are each supplied as a concentrate. Before using for the first time, add the appropriate volume of ethanol (96–100%), as indicated on the bottle, to obtain a working solution.
- Buffer RLT Plus may form a precipitate upon storage. If necessary, redissolve by warming, and then place at room temperature.
- Buffer RLT Plus, Buffer RW1, and Buffer AW1 contain a guanidine salt and are therefore not compatible with disinfecting reagents containing bleach. See page 6 for safety information.
- Perform all steps of the procedure at room temperature. During the procedure, work quickly.
- Perform all centrifugation steps at 20–25°C in a standard microcentrifuge. Ensure that the centrifuge does not cool below 20°C.

Procedure

Sample disruption and homogenization

1. **Excise the tissue sample from the animal or remove it from storage. Remove RNA*later* stabilized tissues from the reagent using forceps. Determine the amount of tissue. Do not use more than 30 mg.**

Weighing tissue is the most accurate way to determine the amount.

2. **Follow either step 2a or 2b.**

2a. For RNA*later* stabilized tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed to step 3.

If using only a portion of the tissue, cut it on a clean surface. Weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed to step 3.

RNA in RNA*later* stabilized tissues is protected during cutting and weighing of tissues at ambient temperature (18–25°C). It is not necessary to cut the tissues on ice or dry ice or in a refrigerated room. Remaining tissues can be stored in RNA*later* Reagent. Previously stabilized tissues can be stored at –80°C without the reagent.

2b. For unstabilized fresh or frozen tissues:

If using the entire tissue, place it directly into a suitably sized vessel for disruption and homogenization, and proceed immediately to step 3.

If using only a portion of the tissue, weigh the piece to be used, and place it into a suitably sized vessel for disruption and homogenization. Proceed immediately to step 3.

RNA in harvested tissues is not protected until the tissues are treated with RNA*later* Reagent, flash-frozen, or disrupted and homogenized in step 3. Frozen tissues should not be allowed to thaw during handling. The relevant procedures should be carried out as quickly as possible.

Note: Remaining fresh tissues can be placed into RNA*later* Reagent to stabilize RNA (see the RNA*later* Handbook). However, previously frozen tissues thaw too slowly in the reagent, preventing the reagent from diffusing into the tissues quickly enough to prevent RNA degradation.

3. **Disrupt the tissue and homogenize the lysate in Buffer RLT Plus (do not use more than 30 mg tissue) according to step 3a, 3b, 3c, or 3d.**

See “Disrupting and homogenizing starting material”, page 16, for more details on disruption and homogenization.

Note: Ensure that β -ME is added to Buffer RLT Plus before use (see “Important points before starting”).

After storage in RNAlater Reagent, tissues may become slightly harder than fresh or thawed tissues. Disruption and homogenization using standard methods is usually not a problem. For easier disruption and homogenization, we recommended using 600 μ l Buffer RLT Plus.

Note: Incomplete homogenization leads to significantly reduced RNA yields and can cause clogging of the AllPrep DNA and RNeasy spin columns. Homogenization with the TissueLyser or rotor–stator homogenizers generally results in higher nucleic acid yields than with other methods. However, prolonged homogenization with these homogenizers results in greater DNA fragmentation.

Table 7. Volumes of Buffer RLT Plus for Tissue Disruption and Homogenization

Amount of starting material	Volume of Buffer RLT Plus
<20 mg	350 μ l or 600 μ l*
20–30 mg	600 μ l

* Use 600 μ l Buffer RLT Plus for tissues stabilized in RNAlater Reagent or for difficult-to-lyse tissues.

3a. Disruption and homogenization using a rotor–stator homogenizer:

Place the weighed (fresh, frozen, or RNAlater stabilized) tissue in a suitably sized vessel. Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 7). Immediately disrupt and homogenize the tissue using a conventional rotor–stator homogenizer until it is uniformly homogeneous (usually 20–40 s). Proceed to step 4.

3b. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a QIAshredder homogenizer:

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNAlater stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 7). Pipet the lysate directly into a QIAshredder spin column placed in a 2 ml collection tube, and centrifuge for 2 min at maximum speed. Proceed to step 4.

3c. Disruption using a mortar and pestle followed by homogenization using a needle and syringe:

Immediately place the weighed (fresh, frozen, or RNA/later stabilized) tissue in liquid nitrogen, and grind thoroughly with a mortar and pestle. Decant tissue powder and liquid nitrogen into an RNase-free, liquid-nitrogen-cooled, 2 ml microcentrifuge tube (not supplied). Allow the liquid nitrogen to evaporate, but do not allow the tissue to thaw.

Add the appropriate volume of Buffer RLT Plus (see Table 7), and homogenize by passing lysate at least 5 times through a 20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe. Proceed to step 4.

3d. Disruption and homogenization using the TissueLyser:

See the *TissueLyser Handbook*. Then proceed to step 4.

4. Centrifuge the lysate for 3 min at maximum speed. Carefully remove the supernatant by pipetting, and transfer it to the AllPrep DNA spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 30 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm).

In some preparations, very small amounts of insoluble material will be present after the 3 min centrifugation, making the pellet invisible.

Note: Make sure that no liquid remains on the column membrane after centrifugation. If necessary, repeat the centrifugation until all liquid has passed through the membrane.

5. Place the AllPrep DNA spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and store at room temperature (15–25°C) or at 4°C for later DNA purification in steps 14–17. Use the flow-through for RNA purification in steps 6–13.

Note: Do not store the AllPrep DNA spin column at room temperature or at 4°C for long periods. Do not freeze the column.

Total RNA purification

6. Add 1 volume (usually 350 μ l or 600 μ l) of 70% ethanol to the flow-through from step 5, and mix well by pipetting. Do not centrifuge. Proceed immediately to step 7.

If some lysate was lost during homogenization and DNA removal, adjust the volume of ethanol accordingly.

Note: Precipitates may be visible after addition of ethanol, but this does not affect the procedure.

Note: For maximum RNA yields from liver, use 50% ethanol instead of 70% ethanol.

- 7. Transfer up to 700 μ l of the sample, including any precipitate that may have formed, to an RNeasy spin column placed in a 2 ml collection tube (supplied). Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm). Discard the flowthrough.***

Reuse the collection tube in step 8.

If the sample volume exceeds 700 μ l, centrifuge successive aliquots in the same RNeasy spin column. Discard the flow-through after each centrifugation.

- 8. Add 700 μ l Buffer RW1 to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.***

Reuse the collection tube in step 9.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Be sure to empty the collection tube completely.

Optional: If purifying RNA from tissues with high DNA content and if the RNA will be used in sensitive downstream applications, we recommend performing DNase digestion by following steps E1–E4 (Appendix E, page 47) instead of step 8.

- 9. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane. Discard the flow-through.**

Reuse the collection tube in step 10.

Note: Buffer RPE is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer RPE before use (see "Important points before starting").

- 10. Add 500 μ l Buffer RPE to the RNeasy spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to wash the spin column membrane.**

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during RNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the RNeasy spin column from the collection tube so that the column does not contact the flow-through. Otherwise, carryover of ethanol will occur.

- 11. Optional: Place the RNeasy spin column in a new 2 ml collection tube (supplied), and discard the old collection tube with the flow-through. Centrifuge at full speed for 1 min.**

Perform this step to eliminate any possible carryover of Buffer RPE, or if residual flow-through remains on the outside of the RNeasy spin column after step 10.

- 12. Place the RNeasy spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 30–50 μ l RNase-free water directly to the spin column membrane. Close the lid gently, and centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ ($\geq 10,000$ rpm) to elute the RNA.**

- 13. If the expected RNA yield is $>30 \mu$ g, repeat step 12 using another 30–50 μ l of RNase-free water, or using the eluate from step 12 (if high RNA concentration is required). Reuse the collection tube from step 12.**

If using the eluate from step 12, the RNA yield will be 15–30% less than that obtained using a second volume of RNase-free water, but the final RNA concentration will be higher.

Genomic DNA purification

- 14. Add 500 μ l Buffer AW1 to the AllPrep DNA spin column from step 5. Close the lid gently, and centrifuge for 15 s at $\geq 8000 \times g$ (10,000 rpm). Discard the flow-through.***

Reuse the spin column in step 15.

Note: Buffer AW1 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW1 before use (see "Important points before starting").

- 15. Add 500 μ l Buffer AW2 to the AllPrep DNA spin column. Close the lid gently, and centrifuge for 2 min at full speed to wash the spin column membrane.**

Note: Buffer AW2 is supplied as a concentrate. Ensure that ethanol is added to Buffer AW2 before use (see "Important points before starting").

The long centrifugation dries the spin column membrane, ensuring that no ethanol is carried over during DNA elution. Residual ethanol may interfere with downstream reactions.

Note: After centrifugation, carefully remove the AllPrep DNA spin column from the collection tube. If the column contacts the flow-through, empty the collection tube and centrifuge the spin column again for 1 min at full speed.

- 16. Place the AllPrep DNA spin column in a new 1.5 ml collection tube (supplied). Add 100 μ l Buffer EB directly to the spin column membrane and close the lid. Incubate at room temperature (15–25°C) for 1 min, and then centrifuge for 1 min at $\geq 8000 \times g$ (10,000 rpm) to elute the DNA.**

- 17. Repeat step 16 to elute further DNA.**

To prevent dilution of the first DNA eluate, use a new 1.5 ml collection tube (not supplied) to collect the second DNA eluate. To combine the first and second DNA eluates, reuse the collection tube from step 16.

Note: To achieve a higher DNA concentration, elute with 2 x 50 μ l Buffer EB. The final DNA yield, however, may be reduced.

Anexo 2. Protocolo para síntese de DNA complementar

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

For 200 and 1000 Reactions

Protocol

Using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits

Overview To synthesize single-stranded cDNA from total RNA using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits:

RNA Template Guidelines

For optimal performance of the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits, Applied Biosystems recommends using RNA that is:

- Free of inhibitors of reverse transcription and PCR
- Dissolved in PCR-compatible buffer or water
- Free of RNase activity

Note: If you suspect that the RNA contains RNase activity, add RNase Inhibitor to the reverse transcription reaction at a final concentration of 1.0 U/ μ L.

Input Amount of Total RNA

Use up to 2 μ g of total RNA per 20- μ L reaction.

Preparing the 2X Reverse Transcription Master Mix

Prepare the 2X RT master mix using the kit components before preparing the reaction plate.

To prepare the 2X RT master mix (per 20- μ L reaction):

1. Allow the kit components to thaw on ice.
2. Referring to the table below, calculate the volume of components needed to prepare the required number of reactions.

Note: Prepare the RT master mix on ice.

Component	Volume/Reaction (μ L)	
	Kit with RNase Inhibitor	Kit without RNase Inhibitor
10X RT Buffer	2.0	2.0
25X dNTP Mix (100 mM)	0.8	0.8
10X RT Random Primers	2.0	2.0
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1.0	1.0
RNase Inhibitor	1.0	—
Nuclease-free H ₂ O	3.2	4.2
Total per Reaction	10.0	10.0

IMPORTANT! Include additional reactions in the calculations to provide excess volume for the loss that occurs during reagent transfers.

WARNING **CHEMICAL HAZARD.** 10X Reverse Transcription Buffer may cause eye, skin, and respiratory tract irritation. Read the MSDS, and follow the handling instructions. Wear appropriate eyewear, clothing, and gloves.
3. Place the 2X RT master mix on ice and mix gently.

Preparing the cDNA Reverse Transcription Reactions

To prepare the cDNA RT reactions:

1.	Pipette 10 μ L of 2 $\times$ RT master mix into each well of a 96-well reaction plate or individual tube.
2.	Pipette 10 μ L of RNA sample into each well, pipetting up and down two times to mix.
3.	Seal the plates or tubes.
4.	Briefly centrifuge the plate or tubes to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.
5.	Place the plate or tubes on ice until you are ready to load the thermal cycler.

Performing Reverse Transcription

To perform reverse transcription:

1.	<p>Program the thermal cycler conditions using one of the thermal cyclers listed in Table 3 on page 4.</p> <p>IMPORTANT! These conditions are optimized for use with the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits.</p> <table><tr><td></td><td>Step 1</td><td>Step 2</td><td>Step 3</td><td>Step 4</td></tr><tr><td>Temperature (°C)</td><td>25</td><td>37</td><td>85</td><td>4</td></tr><tr><td>Time</td><td>10 min</td><td>120 min</td><td>5 min</td><td>∞</td></tr></table>						Step 1	Step 2	Step 3	Step 4	Temperature (°C)	25	37	85	4	Time	10 min	120 min	5 min	∞
	Step 1	Step 2	Step 3	Step 4																
Temperature (°C)	25	37	85	4																
Time	10 min	120 min	5 min	∞																
2.	Set the reaction volume to 20 μL .																			
3.	Load the reactions into the thermal cycler.																			
4.	Start the reverse transcription run.																			

Storing cDNA Reverse Transcription Reactions

You can store cDNA RT plates or tubes prepared using the High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits for short-term or long-term storage.

Storage Duration	Storage Temperature ($^{\circ}$ C)
Short-term (up to 24 hours before use) [‡]	2 to 6
Long-term	-15 to -25

[‡] For prolonged storage at 2 to 6 $^{\circ}$ C, add EDTA to a final concentration of 1 mM to chelate cations and to prevent nucleic acid degradation.

IMPORTANT! If required, briefly centrifuge the archive plates or tubes before storing to spin down the contents and to eliminate any air bubbles.

Anexo 3. Protocolo para técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

5. MLPA PROTOCOL - IN BRIEF

1. DNA DENATURATION
 - Heat a 5 µl DNA sample for 5 minutes at 98°C
2. HYBRIDISATION OF PROBES TO SAMPLE DNA
 - Cool down to room temperature, open tubes
 - Add 3 µl hybridisation master mix*
 - Incubate 1 minute at 95°C and hybridise for 16 hours at 60°C
3. LIGATION OF HYBRIDISED PROBES
 - Lower thermocycler temperature to 54°C, open tubes
 - Add 32 µl Ligase-65 master mix*, incubate 15 minutes at 54°C
 - Heat inactivate the ligase enzyme: 5 minutes 98°C
4. PCR AMPLIFICATION OF LIGATED PROBES
 - Cool down to room temperature, open tubes
 - Add 10 µl polymerase master mix* at room temperature
 - Start PCR (35 x {95°C 30 seconds, 60°C 30 seconds, 72°C 60 seconds}, 72°C 20 minutes, 15°C pause)
5. FRAGMENT SEPARATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS
6. ANALYSE RESULTS WITH COFFALYSER.NET

* Master mixes:

- Hybridisation: 1.5 µl SALSA probemix + 1.5 µl MLPA buffer, per reaction
- Ligase-65: 3 µl ligase buffer A + 3 µl ligase buffer B + 25 µl ultrapure water + 1 µl Ligase-65, per reaction
- Polymerase: 7.5 µl ultrapure water + 2 µl PCR primer mix + 0.5 µl SALSA polymerase, per reaction

6. MLPA PROTOCOL

6.1. THERMOCYCLER PROGRAM FOR THE MLPA REACTION

DNA denaturation			
1.	98°C	5 minutes	
2.	25°C	pause	
Hybridisation reaction			
3.	95°C	1 minute	
4.	60°C	16-20 hours	
Ligation reaction			
5.	54°C	pause	
6.	54°C	15 minutes	
7.	98°C	5 minutes	
8.	20°C	pause	
PCR reaction			
9.	35 cycles:		
		• 95°C	30 seconds
		• 60°C	30 seconds
		• 72°C	60 seconds
10.	72°C	20 minutes	
11.	15°C	pause	

Note: This thermocycler program should be followed unless stated otherwise in the probemix-specific product description.

6.2. DNA DENATURATION (DAY 1)

- Label 0.2 ml tubes, strips or plates.
- Add 5 µl DNA sample (50-250 ng; 50-100 ng is optimal) or TE (no-DNA control) to each tube.
- Place tubes in thermocycler; start MLPA thermocycler program steps 1-2 (see section 6.1).
- Ensure samples are at 25°C before removing tubes from the thermocycler.

6.3. HYBRIDISATION REACTION (DAY 1)

- Prepare hybridisation master mix. For each reaction, mix: 1.5 µl MLPA buffer (yellow cap) + 1.5 µl probemix (black cap). Mix well by pipetting or vortexing.
- After DNA denaturation, add 3 µl hybridisation master mix to each reaction. Accurate pipetting is critical. Mix well by pipetting gently up and down.
- Continue thermocycler program with steps 3-4.

6.4. LIGATION REACTION (DAY 2)

- Prepare a Ligase-65 master mix. For each reaction, mix: 25 µl ultrapure water + 3 µl ligase buffer A (transparent cap) + 3 µl ligase buffer B (white cap), then add 1 µl Ligase-65 enzyme (green cap). Mix well by pipetting gently up and down.
- Continue thermocycler program with step 5.
- When the thermocycler is at 54°C and **while the samples are IN the thermocycler**, add 32 µl Ligase-65 master mix to each MLPA reaction. Mix well by pipetting gently up and down.
- Continue thermocycler program with steps 6-8.

6.5. PCR REACTION (DAY 2)

- Prepare polymerase master mix. For each reaction, mix: 7.5 µl ultrapure water + 2 µl SALSA PCR primer mix (brown cap), then add 0.5 µl SALSA polymerase (orange cap). Mix well by pipetting gently up and down.
- **At room temperature**, add 10 µl polymerase master mix to each MLPA reaction. Mix well by pipetting gently up and down. **Immediately** place the tubes in the thermocycler and continue the thermocycler program with steps 9-11.
- After the PCR reaction, do not open tubes in the same room as the thermocycler. To avoid contamination, use different micropipettes for performing MLPA reactions and handling MLPA PCR products.
- PCR product can be stored shielded from light at 4°C for 1 week. For longer periods, store between -25°C and -15°C.

7. FRAGMENT SEPARATION BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

7.1. NOTES TO READ BEFORE YOU START

- Size standard, run conditions, polymer, fluorescent dye and volume of MLPA PCR reaction depend on the capillary electrophoresis instrument type. Use the default fragment analysis settings on your capillary electrophoresis instrument applicable for the application, polymer and capillary length. Instrument settings may require optimisation for proper fragment separation.
- Replace capillaries and polymer regularly, by following manufacturer recommendations. Polymer quickly deteriorates after prolonged exposure to >25°C. If size standard peaks are repeatedly low and broad, the capillaries or polymer may have deteriorated.
- Use high quality formamide and store it in aliquots at -20°C. Formamide can become acidic, causing depurination and fragmentation of DNA upon heating.

7.2. ELECTROPHORESIS SPECIFICATIONS

Instrument	Primer Dye	Capillaries	Injection mixture
SCIEX CEQ-2000 CEQ-8000 CEQ-8800 GeXP	Cy5	33 cm	1 µl PCR reaction ^a 0.5 µl CEQ - size standard 600 ^b 28.5 µl HiDi formamide / Beckman SLS Add one drop of high quality mineral oil.
ABI-Prism 3100 (Avant) ABI-3130 (xL) ABI-3500 ^c (xL) ABI-3730 (xL)	FAM	36, 50 cm	0.7 µl PCR reaction ^a 0.3 µl ROX or 0.2 µl LIZ GS 500 size standard 9 µl HiDi formamide Seal the injection plate. Heat 3 min at 86°C, cool for 2 min at 4°C ^d .
ABI-SeqStudio	FAM	28 cm	0.8 µl PCR reaction ^a 0.3 µl ROX/LIZ GS500 size standard 12 µl HiDi formamide Seal the injection plate. Heat 3 min at 86°C, cool for 2 min at 4°C ^d .

^a The volume of PCR product added should never exceed 10% of the total injection mixture.

^b Reduce volume of size standard if needed.

^c For ABI-3500: set run voltage to 15 kV and ensure sufficient run time.

^d Briefly heating the injection mixture before capillary electrophoresis is recommended.

The table below contains the optimal, minimum, and maximum signal ranges for the capillary electrophoresis instruments. If signals falls outside of these values, false results can be obtained. Optimisation of the fragment analysis settings may be required.

Instrument	Optimal signal range (in RFU)	Minimum signal (in RFU)	Maximum signal (in RFU)
SCIEX CEQ/GeXP	9,375 - 136,000	5000	170,000
ABI 310, 3100 & 3130 series	375 - 6,000	200	7,500
ABI 3500, 3730 series & SeqStudio	375 - 24,800	300	31,000

Anexo 4. Artigo publicado: “Low protein expression of both *ATRX* and *ZNRF3* as novel negative prognostic markers of adult adrenocortical carcinoma”

International Journal of
Molecular Sciences

Article

Low Protein Expression of both *ATRX* and *ZNRF3* as Novel Negative Prognostic Markers of Adult Adrenocortical Carcinoma

Vania Balderrama Brondani ^{1,*}, Amanda Meneses Ferreira Lacombe ¹, Beatriz Marinho de Paula Mariani ², Luciana Montenegro ^{2,3}, Iberê Cauduro Soares ^{4,5}, João Evangelista Bezerra-Neto ⁶, Fabio Yoshiaki Tanno ⁷, Victor Srougi ⁷, José Luis Chambo ⁷, Berenice Bilharinho Mendonça ^{1,2,3}, Madson Q. Almeida ^{1,2,8}, Maria Claudia Nogueira Zerbin ⁴ and Maria Candida Barisson Villares Frago ^{1,2,8,*}

- ¹ Unidade de Suprarrenal, 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 05403-900, Brazil; amflacombe@usp.br (A.M.F.L.); beremen@usp.br (B.B.M.); madson.a@hc.fm.usp.br (M.Q.A.)
- ² Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255, São Paulo 05403-900, Brazil; beatrizmariani@usp.br (B.M.d.P.M.); lucianam@usp.br (L.M.)
- ³ Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo 01246-903, Brazil
- ⁴ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 455, São Paulo 01246-903, Brazil; ibere.soares@hc.fm.usp.br (I.C.S.); czerbini@usp.br (M.C.N.Z.)
- ⁵ 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 01246-000, Brazil
- ⁶ Serviço de Oncologia, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Arnaldo, 251, São Paulo 01246-000, Brazil; joao.evangelista@hc.fm.usp.br
- ⁷ Serviço de Urologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo 05403-900, Brazil; fabio.tanno@hc.fm.usp.br (F.Y.T.); victor.srougi@usp.br (V.S.); chambojl@uol.com.br (J.L.C.)
- ⁸ 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 01246-000, Brazil
- * Correspondence: vbrondani@usp.com (V.B.B.); maria.villares@hc.fm.usp.br (M.C.B.V.F.); Tel.: +55-11-26613358 (M.C.B.V.F.)

Citation: Brondani, V.B.; Lacombe, A.M.F.; Mariani, B.M.d.P.; Montenegro, L.; Soares, I.C.; Bezerra-Neto, J.E.; Tanno, F.Y.; Srougi, V.; Chambo, J.L.; Mendonça, B.B.; et al. Low Protein Expression of both *ATRX* and *ZNRF3* as Novel Negative Prognostic Markers of Adult Adrenocortical Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, 1238. <https://doi.org/10.3390/ijms22031238>

Academic Editor: Rosario Pivonello
Received: 24 November 2020
Accepted: 22 January 2021
Published: 27 January 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2021 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignancy that is associated with a dismal prognosis. Pan-genomic studies have demonstrated the involvement of *ATRX* and *ZNRF3* genes in adrenocortical tumorigenesis. Our aims were to evaluate the protein expression of *ATRX* and *ZNRF3* in a cohort of 82 adults with ACC and to establish their prognostic value. Two pathologists analyzed immuno-stained slides of a tissue microarray. The low protein expression of *ATRX* and *ZNRF3* was associated with a decrease in overall survival (OS) ($p = 0.045$, $p = 0.012$, respectively). The Cox regression for *ATRX* protein expression of >1.5 showed a hazard ratio (HR) for OS of 0.521 (95% CI 0.273–0.997; $p = 0.049$) when compared with ≤ 1.5 ; for *ZNRF3* expression >2 , the HR for OS was 0.441 (95% CI, 0.229–0.852; $p = 0.015$) when compared with ≤ 2 . High *ATRX* and *ZNRF3* protein expressions were associated with optimistic recurrence-free survival (RFS) ($p = 0.027$ and $p = 0.005$, respectively). The Cox regression of RFS showed an HR of 0.332 (95%CI, 0.111–0.932) for *ATRX* expression >2.7 ($p = 0.037$), and an HR of 0.333 (95%CI, 0.140–0.790) for *ZNRF3* expression >2 ($p = 0.013$). In conclusion, low protein expression of *ATRX* and *ZNRF3* are negative prognostic markers of ACC; however, different cohorts should be evaluated to validate these findings.

Keywords: protein expression; *ATRX*; *ZNRF3*; prognostic factor; adrenocortical carcinoma

1. Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare and aggressive cancer deriving from the adrenal cortex gland with an incidence of 0.7–2 cases/million/year [1–3]. Despite a dismal

prognosis, the five-year overall survival (OS) rate varies, ranging from 60 to 80% when the tumor is restricted to the adrenal gland and from 0 to 28% in the advanced stages of the disease [3–8]. These data suggest that ACC is a heterogeneous adrenal disorder, presenting different behaviors, probably due to its different biology and genetic signatures [2,8,9].

In previous years, considerable advances in the genetic field of ACC tumorigenesis investigation have occurred, allowing patients to be stratified according to the combination of clinical–hormonal–pathological and genetic alterations.

Prognostic factors have an essential role in determining the aggressiveness of ACC. We can classify tumors according to (A) clinical data (age, hormone-related symptoms, and tumor stage); (B) pathological findings, genetic/protein background, and category of surgical procedure (Weiss system, modified Weiss system, Helsinki score, mitotic count, Ki-67 proliferation marker, SF-1, P53, β -catenin, and resection status); (C) clinical and pathological parameter associations (staging system of European Network for the Study of Adrenal Tumors modified by grade, resection status, age and symptoms—mENSAT plus GRAS); and (D) molecular classifications (chromosomal aberrations, methylome, gene expression alterations, microRNAs dysregulation, and gene mutations) [2–4,6,10–35].

Pan genomic studies have identified new genes related to adrenocortical carcinogenesis, providing a refinement of ACC taxonomy, and improving the development of new biomarkers for early diagnosis and staging, conducive to the development of molecularly targeted therapies.

ATRX is a chromatin structure regulator and telomere structure maintainer. Somatic pathogenic variants and structural variations, which cause the deletion of multiple exons of *ATRX* were associated with germline *TP53* pathogenic variants in a pediatric cohort [36]. Pinto et al. reported alterations in *TP53* and *ATRX* in 32% of their cohort, and these alterations were associated with advanced disease and poor event-free survival in pediatric patients with adrenocortical tumor [36]. Assie et al. identified somatic *ATRX* alterations in only 4% of their adult ACC cohort. In contrast, *ZNRF3* was the most frequently altered gene, corresponding to 21% of cases [27]. This gene encodes a cell surface transmembrane E3 ubiquitin ligase that acts as a negative feedback regulator of the canonical Wnt signaling (Wnt/ β -catenin signaling). Zheng et al. studied an adult ACC cohort and reported a frequency of 19.3% for ACCs with deletions or non-silent somatic pathogenic variants in the *ZNRF3* gene. In comparison, *ATRX* alterations were present in only four cases (4.3%) [31].

The Cancer Genome Atlas (TCGA) ACC Research Network and the European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) including the cohort of Assie et al. cohort [27], are two critical datasets for the study of ACC. TCGA-ACC, from National Cancer Institute, includes a cohort of 184 cases of ACC with a median age 48.5 years (14–83 years), 120 (65%) female, and a frequency of ENSAT staging system as follows: stage 1, 10% (18 of 180 cases); stage 2, 49% (88 cases); stage 3, 21% (38 cases); and stage 4, 20% (36 cases). TCGA-ACC registered 68 (37%) deaths (the data shown in the present study are based upon data generated by TCGA Research Network) [37]. The ENSAT and Assie et al. cohorts include a total of 130 ACC cases, with median age 46 years (18–86 years), 90 (69.2%) female, with a frequency of ENSAT stage as follows: stage 1, 7.2% (9 of 125 cases); stage 2, 53.6% (67 cases); stage 3, 16% (20 cases); and stage 4, 23.2% (29 cases). There were 46 (35.4%) deaths among 130 cases [27]. TCGA-ACC dataset registered the most mutated genes in ACC, including *TP53* (21%), *ZNRF3* (19%), *CDKN2A* (15%), *CTNNB1* (16%), *TERT* (14%), and *PPKARIA* (11%), while the *ATRX* gene had a frequency of 4.3% of cohort [31]. ENSAT with Assie et al. showed the most frequent mutated genes as *ZNRF3* (21%), *CTNNB1* (16%), *TP53* (16%), and *CDKN2A* (11%). Alterations on *ATRX* were present in 4% of cases [27]. Both cohorts present similar clinical and molecular data.

In this study, we aimed to evaluate the protein expression of the *ATRX* and *ZNRF3* genes in a cohort of 82 adult ACC patients from a unique Complex tertiary center to investigate their potential role as prognostic markers.

2. Results

2.1. ATRX Protein

Patients with ACC showing high *ATRX* expression, defined as tumor scored 2+ or higher, represented 47.5% of cohort (Figure 1). *ATRX* high expression group had a median age at diagnosis 52.5 years. In contrast, patients with ACC with low *ATRX* expression had a median age of 34.7 years ($Z = -3.349$; $p = 0.001$; Mann–Whitney U test). *ATRX* was highly expressed in 90% of cases without hypercortisolism at initial presentation, while it was expressed at a low level in 59.2% of cases with hypercortisolism ($\chi^2(2) = 8.759$; $p = 0.013$; Chi-squared test). The group with hypercortisolism presented a median *ATRX* expression score of 0.5 (ranging from 0 to 4), while the non-hypercortisolism group presented a median score of 3.08 (ranging from 0 to 4) ($\chi^2(2) = 6.728$; $p = 0.035$; Kruskal–Wallis test).

Figure 1. Adrenocortical carcinoma (ACC) samples of tissue microarray (TMA). Obj 40 $\times$. (a) ACC case 13 presenting high *ATRX* nuclear expression (score 4). Female patient, aged 28.7 y with virilizing syndrome, a Weiss score 3, and a European Network for the Study of Adrenal Tumors (ENSAT) system score of 2. (b) ACC case 32 with low *ATRX* nuclear expression (score 0). Female patient, aged 26.5 y with mixed syndrome (hypercortisolism and androgen excess), a Weiss score of 7, and an ENSAT system score of 4. (c) ACC case 77 with high *ZNRF3* cytoplasmic expression (score 5; extent = 4, intensity = 1). Male patient, aged 65.6 y with mixed syndrome (hypercortisolism and androgen excess), a Weiss score of 6, and an ENSAT system score of 4. (d) ACC case 5 with low *ZNRF3* cytoplasmic expression (score 0). Female patient, aged 85.4 y with hypercortisolism syndrome, a Weiss score of 7, and an ENSAT system score of 3. Scale bar = 50 μm .

The quantitative analysis of *ATRX* expression showed a positive correlation with age at diagnosis (coefficient 0.391; $p < 0.001$; Spearman's rank correlation coefficient) and negative correlations with tumor size (coefficient -0.263; $p = 0.02$; Spearman's rank correlation coefficient) and Weiss score (coefficient -0.245; $p = 0.0\beta3$; Spearman's rank correlation coefficient).

Thirty-nine patients from the cohort died due to ACC or its clinical complications during the study period. The *ATRX* expression cut-off point was statistically determined and used for the OS analysis. The cut-off value ≤ 1.5 for *ATRX* expression had an impact on the Kaplan–Meier survival curve ($\chi^2(1) = 4.021$; $p = 0.045$; Kaplan–Meier method and log rank test) (Figure 2). In addition, the Cox regression of OS showed a hazard ratio (HR)

of 0.521 (95%CI, 0.273–0.997) for *ATRX* expression of >1.5 when compared with expression of ≤1.5 (Wald = 3.881; df1; $p = 0.049$; Cox's proportional hazards model).

Figure 2. *ATRX* protein expression—overall survival (OS) Kaplan–Meier curve.

2.2. *ZNRF3* Protein

The high expression of *ZNRF3* protein was defined as the sum of extent and intensity parameters equaling ≥3+ (Figure 1). High *ZNRF3* expression was present in 46.25% of the cohort and was associated with a small tumor size (average size of 9.7 cm), while low expression was associated with a large tumor size (average size of 13.3 cm) at diagnosis ($Z = -2.665$; $p = 0.008$; Mann–Whitney U test). Tumors with high *ZNRF3* expression presented with lower Weiss score (average 4.7) than the group with low *ZNRF3* expression (average 6.1) ($Z = -2.942$; $p = 0.003$; Mann–Whitney U test). *ZNRF3* expression was related to the ENSAT staging system. High *ZNRF3* expression was present in almost 89 % of patients with an ENSAT staging system score of 1 at diagnosis, 42.9% with an ENSAT score of 2, 29.4% with an ENSAT score of 3, and 44.4% with an ENSAT score of 4 ($p = 0.033$, Fisher's exact test). *ZNRF3* protein expression had no relationship with hypercortisolism at clinical presentation ($\chi^2(2) = 2.035$; $p > 0.05$, Chi-squared test). Regarding the outcome analysis, 64.1% of patients with ACC who progressed to death presented with a low level of *ZNRF3* protein expression and had a median survival of 19 months ($\chi^2(1) = 4.716$; $p = 0.030$; Chi-squared test).

The quantitative expression of *ZNRF3* showed negative correlations with tumor weight (coefficient -0.282 ; $p = 0.026$, Spearman's rank correlation coefficient), tumor size (coefficient -0.313 ; $p = 0.005$; Spearman's rank correlation coefficient), and the Weiss score (coefficient -0.345 ; $p = 0.002$; Spearman's rank correlation coefficient). The *ZNRF3* expression cut-off of ≤2 had an impact on the OS analysis ($\chi^2(1) = 6.277$; $p = 0.012$; Kaplan–Meier method and log rank test) (Figure 3). The Cox regression of OS showed an HR of 0.441 (95% CI, 0.229–0.852) for *ZNRF3* expression >2 compared with the value for an expression level of ≤2 (Wald = 5.942; df1; $p = 0.015$; Cox's proportional hazards model).

Figure 3. ZNRF3 protein expression—OS Kaplan-Meier curve.

ZNRF3 is considered a suppressor of the Wnt/ β -catenin pathway. Due to this known function, we analyzed the status of β -catenin in the tumoral cells. Active Wnt/ β -catenin signaling was characterized by a cytoplasmic/nuclear staining for β -catenin [37]. The analysis demonstrated a positive correlation between ZNRF3 expression and β -catenin expression in the cell membrane (coefficient 0.202; $p = 0.004$; Spearman's rank correlation coefficient). These data support the function of ZNRF3 as a tumor suppressor, keeping β -catenin attached in the cell membrane (Figure 4).

Figure 4. Figure of TMA: (a) ACC case 22 with high ZNRF3 cytoplasmic expression (score 5). Female patient, aged 19.3 y with hypercortisolism syndrome, a Weiss score of 4, and an ENSAT system score of 1. (b) ACC case 22 with membranous β -catenin expression. (c) ACC case 50 with low ZNRF3 cytoplasmic expression (score 0). Male patient, aged 36.1y with a silent tumor, a Weiss score of 8, and an ENSAT system score of 2. (d) ACC case 50 with cytoplasmic and nuclear β -catenin expression. Scale bar = 50 μ m.

2.3. Ki-67 Proliferation Marker and Combined Analysis

The Ki-67 proliferation marker showed positive correlation with tumor weight (coefficient 0.377; $p = 0.01$, Spearman's rank correlation coefficient), tumor size (coefficient 0.344; $p = 0.007$, Spearman's rank correlation coefficient), and the Weiss score (coefficient 0.572; $p < 0.001$, Spearman's rank correlation coefficient). Furthermore, the categorization of Ki-67 into groups ($<10\%$, $\geq 10\%$ and $<20\%$, $\geq 20\%$) impacted the OS analysis ($\chi^2(2) = 29.363$; $p < 0.001$; Kaplan–Meier method and log rank test) (Figure 5). The Cox regression of OS from the analysis of Ki-67 expression showed an HR of 5.802 (95% CI, 2.447–13.726) for the Ki-67 expression grouped in $\geq 10\%$ and $<20\%$ (Wald = 15.925; df1; $p < 0.001$; Cox's proportional hazards model), and we calculated an HR of 9.041 (95% CI, 3.543–23.073) for the Ki-67 expression grouped in $\geq 20\%$ (Wald = 21.217; df1; $p < 0.001$; Cox's proportional hazards model).

Figure 5. Ki-67 proliferation marker—OS Kaplan–Meier curve.

Combined analysis was done in groups classified according to the Ki-67 value ($>10\%$ or $\leq 10\%$) and *ATRX* expression (>1.5 or ≤ 1.5), and according to the Ki-67 value ($>10\%$ or $\leq 10\%$) and *ZNRF3* expression (>2 or ≤ 2). The combination of Ki-67 with *ATRX* and *ZNRF3* did not impact the Kaplan–Meier survival curves ($\chi^2(3) = 5.206$; $p > 0.05$; and $\chi^2(3) = 6.619$; $p > 0.05$, respectively. Kaplan–Meier method and log rank test for both). However, the combination of low *ATRX* expression and low *ZNRF3* expression had an effect on the OS curve ($\chi^2(3) = 9.867$; $p = 0.02$; Kaplan–Meier method and log rank test) (Figure 6). The Cox regression of OS from the combined analysis of *ATRX* and *ZNRF3* expressions showed an HR of 0.314 (95% CI, 0.136–0.725) for the *ATRX* (>1.5) and *ZNRF3* (>2) expression levels (Wald = 7.363; df1; $p = 0.007$; Cox's proportional hazards model).

Figure 6. Overall survival curve of combined ATRX and ZNR3 protein expressions levels.

2.4. Recurrence-Free Survival

The recurrence-free survival (RFS) was defined as the period between the date of complete tumor resection and the date of the first radiological evidence of local or distant recurrence [38]. ATRX protein expression was associated with a better RFS when a cut-off > 2.7 was statistically established ($\chi^2(1) = 4.920$; $p = 0.027$; Kaplan-Meier method and log rank test) (Figure 7). The Cox regression of RFS showed an HR of 0.332 (95% CI, 0.111–0.932) for ATRX expression > 2.7 compared with the value for an expression level of ≤ 2.7 (Wald = 4.365; df1; $p = 0.037$; Cox's proportional hazards model). The presence of high ZNR3 protein expression (score > 2) was positively associated with RFS ($\chi^2(1) = 6.963$; $p = 0.008$; Kaplan-Meier method and log rank test) (Figure 8), which means that the cases with high protein expression presented a greater recurrence-free survival than the group with low protein expression. This corroborates to ZNR3 function of tumor suppressor. The Cox regression of RFS showed an HR of 0.333 (95% CI, 0.140–0.790) for ZNR3 expression > 2 compared with the value for an expression level of ≤ 2 (Wald = 6.222; df1; $p = 0.013$; Cox's proportional hazards model). Categorization of the Ki-67 proliferation marker into groups ($< 10\%$, $\geq 10\%$ and $< 20\%$, $\geq 20\%$) impacted the RFS curve ($\chi^2(2) = 16.357$; $p < 0.001$; Kaplan-Meier method and log rank test), as seen in Figure 9. The Cox regression of RFS from the analysis of Ki-67 expression showed an HR of 5.450 (95% CI, 1.872–15.866) for the Ki-67 expression grouped in $\geq 10\%$ and $< 20\%$ (Wald = 9.674; df1; $p = 0.002$; Cox's proportional hazards model), and we had an HR of 7.691 (95% CI, 2.278–25.963) for the Ki-67 expression grouped in $\geq 20\%$ (Wald = 10.801; df1; $p = 0.001$; Cox's proportional hazards model).

2.5. Other Variables with Prognostic Value

Overall survival was associated with a tumor weight of > 55 g ($\chi^2(1) = 13.534$; $p < 0.001$; Kaplan-Meier method and log rank test), a tumor size of > 7 cm ($\chi^2(1) = 11.462$; $p = 0.001$; Kaplan-Meier method and log rank test), a Weiss score of ≥ 5 ($\chi^2(1) = 15.231$; $p < 0.001$; Kaplan-Meier method and log rank test) and Ki-67 of $> 8\%$ ($\chi^2(1) = 18.294$; $p < 0.001$; Kaplan-Meier method and log rank test). The ENSAT staging system ($\chi^2(3) = 11.799$; $p = 0.008$; Kaplan-Meier method and log rank test), the presence of metastasis at diagnosis ($\chi^2(1) = 9.111$; $p = 0.003$; Kaplan-Meier method and log rank test), and the presence of local ($\chi^2(1) = 6.775$; $p = 0.009$; Kaplan-Meier method and log rank test), or distant recurrence ($\chi^2(1) = 8.688$; $p = 0.003$; Kaplan-Meier method and log rank test) also impacted the OS curves. The presence of hypercortisolism at the initial presentation did not impact the OS or RFS curves ($\chi^2(1) = 3.103$; $p > 0.05$; and $\chi^2(1) = 3.060$; $p > 0.05$, respectively. Kaplan-Meier method and log rank test for both).

The Cox regression analysis revealed the following independent variables for death due to ACC: tumor weight (HR 39.052; 95% CI 1.357–1123.525; Wald = 4.572; df1; $p = 0.032$; Cox's proportional hazards model), tumor size (HR 4.451; 95% CI 1.729–11.458; Wald = 9.577; df1; $p = 0.002$; Cox's proportional hazards model), Weiss score (HR 4.040; 95% CI 1.895–8.611; Wald = 13.073; df1; $p < 0.001$; Cox's proportional hazards model), Ki-67 proliferation marker (HR 6.360; 95% CI 2.434–16.618; Wald = 14.256; df1; $p < 0.001$; Cox's proportional hazards model), presence of metastasis at diagnosis (HR 2.971; 95% CI 1.415–6.237; Wald = 8.282; df1; $p = 0.004$; Cox's proportional hazards model), and disease recurrence (HR 14.985; 95% CI 1.358–165.390; Wald = 4.882; df1; $p = 0.027$; Cox's proportional hazards model). The principal Cox regression results for OS are presented in the Supplementary Material (Table S1).

Figure 7. ATRX expression—Recurrence-free survival Kaplan–Meier curve.

Figure 8. ZNRF3 expression—Recurrence-free survival Kaplan–Meier curve.

Figure 9. Ki-67 proliferation marker—Recurrence-free survival Kaplan–Meier curve.

3. Discussion

Malignancies develop protector mechanisms for self-survival. Generally, defects are harbored in evolutionarily conserved pathways, such as the Wnt/ β -catenin pathway [39]. However, nine acquired biological capabilities, known as cancer hallmarks, are involved in a multistep tumorigenesis process [40].

Telomeres are responsible for protecting genetic material and avoiding end-to-end fusion due to the repair process [41]. Telomeric shortening results from ineffective replication due to a problem in the DNA replication machinery [41–43]. When telomeres reach a critical length, the cell enters a state of senescence, which is considered to be a natural tumor suppressor mechanism in humans [44,45]. Some malignancies present an alternative lengthening of telomeres (ALT) pathway to avoid senescence and apoptosis [41,46]. The *ATRX* gene encodes a chromatin remodeler (*ATRX* protein), which functions in nucleosome stability, DNA replication, transcription, maintenance of telomere and heterochromatin structure and stability [46–50]. Lovejoy et al. suggested that the inactivation of *ATRX* is a significant step in the ALT pathway [51]. Bower et al. showed that the loss of wild-type *ATRX* expression in somatic cell hybrids results in the development of the ALT pathway [52]. Barthel et al. analyzed 9127 patients and 31 cancer types and showed that inactivation of *ATRX* is associated with telomere length elongation, reinforcing the idea of an association between *ATRX* and ALT [53]. *ATRX* is suggested to be a suppressor of the ALT pathway [47]. Cohorts of different malignancies have shown that *ATRX* alterations have prognostic value [54–65].

The Wnt/ β -catenin pathway is one of the central molecular mechanisms of embryonic development [66]. Although it is essential for the embryonic phase, the Wnt/ β -catenin has a role in various malignancies. *ZNRF3* is a transmembrane E3 ubiquitin ligase molecular target of R-spondin that is localized to the plasma membrane [67]. Hao et al. suggested that *ZNRF3* inhibits Wnt/ β -catenin signaling by promoting decreases in the membrane levels of frizzled and LRP6 [67]. Basham et al. reported *ZNRF3* homeostatic regulation of the adrenal cortex, showing that its loss leads to severe adrenocortical hyperplasia [68]. In the same way as the *ATRX* gene, multiple cohorts have reported the role of *ZNRF3* in tumorigenesis and its prognostic value in different malignancies [69–77].

We presented a younger cohort with median age 38.17 years (range 15.38–85.46 years), with more female patients (63, 76.8%), and more deaths (39, 55%), compared to TCGA-ACC and ENSAT and Assie et al. cohorts [27,37]. However, the frequency of ENSAT system in the cohort was very similar with those of both cohorts. Unfortunately, we did not have access to genetic samples to enable determination of the frequency of alterations in these

genes or to calculate correlations between molecular alterations and protein expression levels. Nevertheless, we were able to show the protein expression profiles of *ATRX* and *ZNRF3* in our cohort.

Our objective was to analyze the *ATRX* and *ZNRF3* protein expression in an ACC cohort; we chose the immunohistochemistry technique because of its availability and ease of use, aiming to bring pan-genomic studies closer to the clinical practice. The *ATRX* analysis considered the extent of cells. Unlike Mete et al. [32] who registered only the global loss of *ATRX* expression, we adapted the *ATRX* analysis from other neoplasia studies, intending to be more descriptive [78,79]. The *ZNRF3* evaluation was based on studies from Qiu et al. and Yu et al. [71,73], based their characterization of the extent and intensity of *ZNRF3* cytoplasmic staining.

ATRX protein expression is seen in the nuclear compartment of ACC cells (Figure 1). Mete et al. studied *ATRX* protein expression in 43 ACCs in a tissue microarray (TMA) and showed a global loss of nuclear *ATRX* expression in 48% of the cohort [32]. We registered the global loss of *ATRX* expression (score 0) in 47.5% ($n = 38$) of our cohort. The loss of *ATRX* protein expression and its association with disease-free survival or with the presence of adverse outcomes was not proven in the study by Mete et al. [32]. We demonstrated that low expression of *ATRX*, present in 52.5% of our cohort, impacted negatively on OS and RFS. Moreover, we proved the positive effect of *ATRX* expression (score >1.5) on prognosis with an HR of 0.521 (95% CI, 0.273–0.997) ($p = 0.049$).

Hypercortisolism has a negative impact on the OS and RFS of ACC, acting as a predictor of recurrence and death [26,80–82]. Although cortisol-secreting ACCs have been associated with a worse OS [83], this was not shown in our cohort. *ATRX* was highly expressed (median score of 3.08) in the non-hypercortisolism group, and it showed a low expression (median score of 0.5) in the hypercortisolism group. The role of *ATRX* in cortisol secretion is unknown.

The occurrence of Wnt/ β -catenin signaling has been established in different malignancies [37,84,85]. *ZNRF3* acts as a tumor suppressor of the Wnt/ β -catenin pathway [39,68,69,86–88]. Tissier et al. have already demonstrated the role of Wnt/ β -catenin in adrenal tumorigenesis [89]. They reported that 77% of an ACC cohort presented with active Wnt/ β -catenin signaling through diffuse cytoplasmic/nuclear β -catenin accumulation in tumor cells [89]. We demonstrated that the presence of *ZNRF3* expression is correlated with β -catenin expression in the cell membrane ($p = 0.004$), supporting the idea that *ZNRF3* keeps β -catenin attached in the cell membrane (Figure 4).

The high expression of *ZNRF3* was associated with smaller tumors in our cohort. *ZNRF3* expression was negatively correlated with tumor weight ($p = 0.026$) and tumor size ($p = 0.005$). Qin et al. assessed *ZNRF3* expression in a cohort of gastric cancer patients and showed an association of protein expression with smaller tumor size [70]. They also revealed that *ZNRF3* overexpression causes significantly more apoptosis and lowered proliferation of cancer cells by reducing the level of Lgr5, a component of Wnt/ β -catenin signaling, while also reducing Gli1, a component of Hedgehog signaling (SHH) [70]. Gomes et al. showed that the SHH pathway is upregulated in adult ACC and downregulated in pediatric adrenocortical tumors [90]. If *ZNRF3* has a role in the adrenal SHH pathway, it remains unclear.

Qiu et al. demonstrated the downregulation of *ZNRF3* protein expression in human papillary thyroid carcinoma cell lines [73]. They showed that *ZNRF3* overexpression strongly inhibits the migratory and invasive capacities of the cancer cells [73]. Yu et al. revealed that strong expression of *ZNRF3* had a significant association with disease-free survival and OS in a colorectal carcinoma cohort [71]. We showed that low *ZNRF3* expression impacted negatively on OS analysis in this ACC cohort. The Cox regression showed an HR of 0.441 (95% CI, 0.229–0.852) for tumors with high *ZNRF3* expression; furthermore, this factor was positively associated with a better RFS than the loss of its expression.

Ki-67 proliferation marker is considered a prognostic factor in localized ACC and is a powerful tool for predicting recurrence after complete surgical resection [28]. Some studies

have documented the importance of Ki-67 as a marker of cellular proliferation, providing a value in the ACC scenario [13,20,91,92]. We categorized the Ki-67 proliferation marker into groups (<10%, ≥10% and <20%, ≥20%), as suggested by Beuschlein et al. [28], and we confirmed the association of Ki-67 with OS and RFS. However, the expressions levels of *ATRX* and *ZNRF3* were not shown to be associated with the Ki-67 proliferation marker.

Since *ATRX* and *ZNRF3* are present in independent pathways, they were considered prognostic markers in this cohort, so we analyzed the association of low expression levels of both. When low expression levels were combined, a stronger negative prognostic value was found for this cohort (HR 0.314; 95% CI, 0.136–0.725; $p = 0.007$).

Tumors with active Wnt/ β -catenin signaling due to *CTNNB1*, *ZNRF3*, or *APC* mutations present a dismal prognosis, according to TCGA Research Network. TCGA reported a high expression of *ZNRF3* transcript by RNA sequencing (RNA-seq) levels is associated with a low survival rate in the ACC cohort. On the contrary, we showed that a low *ZNRF3* protein expression is linked to poor survival.

The protein and transcript levels are in agreement in most cases, and some hypotheses may explain the difference in the *ZNRF3* and ACC context. *ZNRF3* is a target gene of Wnt/ β -catenin signaling, and the levels of *ZNRF3* transcript can reflect the level of Wnt/ β -catenin signaling activity. However, *ZNRF3* deletions may influence its transcript levels, which could be undetectable due to biallelic deletion; simultaneously, the Wnt/ β -catenin signaling could be highly active due to the biallelic loss of its *ZNRF3* suppressor. The TCGA analyzed the *ZNRF3* transcript levels without excluding the biallelic deletions cases, and this could be a reason for the difference between transcript and protein expression. Another hypothesis is based on the function of *ZNRF3* negative regulator by R-spondin proteins in the Wnt/ β -catenin signaling. *ZNRF3* protein expression may be more dependent on R-spondin proteins activity, through LGR-dependent and LGR-independent mechanisms, reflecting their activity, than the absolute quantity of its transcript.

TCGA also reported *ATRX* transcript expression by RNA-seq levels in the ACC cohort; however, the *ATRX* expression did not impact the survival rate.

Patients classified as having a low or moderate risk of recurrence (ENSAT 1 or 2, presenting microscopically complete resection and Ki-67 ≤10%), according to Fassnacht et al. [8], may benefit from the use of this novel prognostic tool. The presence of low expression levels of *ATRX* and *ZNRF3*, which presented a negative prognostic value, could guide the medical approach used for these particular patients to early adjuvant treatment, since these prognostic markers showed associations with OS and RFS.

Regarding germline *TP53* pathogenic variants, two patients presented *TP53* p.R337H variant (cases 51 and 58), and one patient presented *TP53* p.R273H (case 68) (Table S2). Although all of them presented with hypercortisolism at initial presentation and died due to ACC (OS 7, 36, and 12 months, respectively), they presented with variable expression of *ATRX* (score 2, 0, and 0, respectively) and variable expression of *ZNRF3* (score 3, 2, and 5, respectively). It remains unclear as to whether an association between the loss of *ATRX* expression and germline *TP53* pathogenic variants exists and could impact OS in the adult ACC population. However, the association between genes has already been published in the pediatric adrenocortical tumor cohort and in other malignancy cohorts [36,57,93–95].

Tumor biology knowledge is an important step in the delivery of personalized medicine, allowing the design of better clinical approaches and targeted therapies. This study brought pan-genomic studies closer to clinical practice with an easily accessible tool to refine prognostication in adult patients with ACC. In conclusion, we demonstrated that low levels of protein expression of both *ATRX* and *ZNRF3* are negative prognostic markers of ACC; however, different cohorts should be evaluated in future studies to validate these findings.

4. Materials and Methods

The Ethics Committees of the Hospital das Clínicas—University of São Paulo approved this study (n.2.394.934/2017). Informed written consent was obtained from all patients.

All patients underwent an adrenalectomy due to ACC, and they were followed in a unique tertiary center by a team specialized in adrenal disorders. Detailed clinical data, including clinical and hormonal presentations, treatments, follow-up and survival data, imaging, and histopathological results, were collected from medical records. Laboratory results were adjusted according to the delta of reference value, aimed at carrying out a comparison since the laboratory tests were not performed in the same laboratory. ACCs were diagnosed according to Weiss Score (Weiss ≥ 3) [10]. The tumor stage was classified according to the ENSAT and Helsinki systems [5]. Enrolled patients were followed up in the Adrenal Ambulatory-HC/FMUSP and in the Instituto do Cancer do Estado de Sao Paulo—ICESP for an average time of 85.35 months (1.4–406.83 months) (Table 1).

Table 1. Summary of features of 82 adult patients with adrenocortical carcinoma (ACC) which tumors were used on TMA.

Variables	Parameters	Values—N (%)
Gender	Female	63 (76.8%)
	Male	19 (23.2%)
Age	Median	38.17 y
	Average	42.05 y
	Range	15.38–85.46 y
Clinical presentation	Hypercortisolism	51 (66.2%)
	No hypercortisolism	10 (13%)
	Silent tumor	16 (20.8%)
	Not available	5
ENSAT * staging system	1	9 (11.2%)
	2	36 (44.4%)
	3	18 (22.2%)
	4	18 (22.2%)
	Not available	1
Tumor weight	Median	445 g
	Average	707.46 g
	Range	10–2600 g
Tumor size	Median	11 cm
	Average	11.59 cm
	Range	2.2–23 cm
Weiss system	3	15 (19.5%)
	4	16 (20.8%)
	5	6 (7.8%)
	6	12 (15.6%)
	7	11 (14.3%)
	8	15 (19.5%)
	9	2 (2.5%)
Modified Weiss system	<3	15 (22.4%)
	3	13 (19.4%)
	4	6 (8.9%)
	5	11 (16.4%)
	6	8 (11.9%)

Table 1. Cont.

Variables	Parameters	Values—N (%)
Helsinki system	7	14 (20.8%)
	Not available	15
	≤8.5	21 (32.3%)
	>8.5	44 (67.7%)
	Not available	17
Ki-67 proliferation marker	<10%	31 (43%)
	≥10 and <20%	26 (36.1%)
	≥20%	15 (20.9%)
	Not available	10
Outcome	Death	39
	Alive	31
	Not available	12
Global survival	Median	39.58 months
	Average	85.35 months
	Range	1.4–406.83 months

* ENSAT: The stage classification proposed by the European Network for the Study of Adrenal Tumors.

A total of 82 adrenocortical carcinomas were evaluated in terms of the protein expression of *ATRX*, *ZNRF3*, and β -catenin. Detailed information about the cohort is presented in the Supplemental Material (Table S2).

ACCs present a large degree of intratumor heterogeneity [9,96], and therefore, two expert adrenal pathologists (I.C.S., M.C.N.Z.) selected the most representative areas of ACC tissues to construct a tissue microarray (TMA). The internal validation of the TMA process has already been published [22,38,97–99].

4.1. Tissue Microarrays (TMA) and Immunohistochemistry

The tumor series included a total of 82 formalin-fixed paraffin-embedded surgical cases of ACC. Representative areas of the ACCs (viable tumor tissue without necrosis) were identified on hematoxylin- and eosin-stained slides and marked on paraffin donor blocks by two experienced pathologists (I.C.S., M.C.N.Z.). The spotted areas of the donor blocks were punched (1.0 mm punch) and mounted into recipient paraffin blocks using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, USA), with a total of 3 cores per ACC case. The organization of cores was guided by a cartesian map constituting the three TMAs. Control samples (kidney and liver) were included for TMA orientation. One set of three slides was selected (one slide from each of the three TMA paraffin blocks of the triplicate) for staining with anti-*ATRX* rabbit polyclonal antibody (titer 1:1000; code HPA001906; lot BH115094; 100 μ L (0.2 mg/mL); Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, anti-*ZNRF3* rabbit polyclonal antibody (titer 1:100; code HPA036703; lot A86511; 100 μ L (0.1 mg/mL); Sigma-Aldrich, Germany), and anti- β -catenin mouse monoclonal antibody (titer 1:200; clone 14/ β -catenin; code 610154; lot 4351813, 150 μ g (0.6 mL, 250 μ g/mL) BD Transduction Laboratories). The positive control for immunostaining with *ATRX* and *ZNRF3* antibodies was an ACC sample with preserved *ATRX* immunoexpression and with a known wild type *ATRX* status, and a colon carcinoma, respectively. Tonsil tissue was used as a positive control for β -catenin and Ki-67 antibodies. A modified immunoperoxidase immunohistochemical method with humid heat antigen retrieval was used as previously described and validated [38,100]. The immunostaining evaluations were performed by two independent observers (I.C.S. and M.C.N.Z.), who were unaware of clinical data, who independently evaluated *ATRX*, *ZNRF3*, and β -catenin staining. The average value of the

two evaluations was taken for statistical analysis [22,97]. TMA samples were included in the analysis only if two or more evaluable cores were available after the staining procedure. Two ACC cases were excluded from analysis due to the loss of tissue sample (1.62%). The interobserver agreement coefficient (kappa) for the staining evaluation was 0.854 ($T = 11.76$; $p < 0.0001$; Cohen's kappa coefficient). A kappa coefficient >0.6 is considered to represent substantial agreement [101].

Nuclear staining for Ki-67 was also evaluated, and another set of three slides were stained with mouse monoclonal anti-human Ki-67 antigen (titer 1:40; clone MIB-1; code M7240; lot 95324; 0.2 mL (46 mg/L); Dako, Glostrup, Denmark). The stained slides were scanned by the Scanner of histological slides through Panoramic Viewer 1:15 software (3DHISTECH, Budapest, Hungary). Image Pro Plus 4.5 software (MediaCybernetics, Rockville, MD, USA) was used to process the images, and the positive and total nuclei were automatically counted.

Analysis of Immunohistochemistry

ATRX and *ZNRF3* expression levels were characterized by nuclear staining and cytoplasmic staining, respectively. Sections were scored semi-quantitatively for extent of *ATRX*, *ZNRF3*, and β -catenin expression in ACC cells as follows: 0, no immunoreactive cells; 1, $<25\%$ immunoreactive cells; 2, 25–50% immunoreactive cells; 3, 51–75% immunoreactive cells, and 4, $>75\%$ immunoreactive cells. A low expression level of *ATRX* was considered when the presence of $<25\%$ immunoreactive cells was identified. The intensity of staining for *ZNRF3* and β -catenin was also scored semi-qualitatively, as follows: 0, negative; 1, weak; 2, intermediate; and 3, strong. The final scores for *ZNRF3* and β -catenin expressions levels were taken as the sum of both parameters (extent and intensity) and grouped into low expression levels (scores of 0–2) and high expression levels (scores of 3–7) as previously reported [99,102]. β -catenin expression in the different cellular localizations (membranous versus cytoplasmic and/or nuclear) was evaluated separately [102–104] (Table 2).

Table 2. Summary of analysis of immunohistochemistry used on TMA for *ATRX* and *ZNRF3* expressions.

Protein Expression	Compartment of ACC Cells	Parameters	Values	Description
<i>ATRX</i>	Nuclear	Extent	0	No immunoreactive cells
			1	$<25\%$ immunoreactive cells
			2	25–50% immunoreactive cells
			3	51–75% immunoreactive cells
			4	$>75\%$ immunoreactive cells
<i>ZNRF3</i>	Cytoplasmic	Extent	0	No immunoreactive cells
			1	$<25\%$ immunoreactive cells
			2	25–50% immunoreactive cells
			3	51–75% immunoreactive cells
			4	$>75\%$ immunoreactive cells
		Intensity	0	Negative
			1	Weak
			2	Intermediate
			3	Strong

4.2. Statistical Analysis

The baseline patient characteristics were expressed as absolute and relative frequencies for qualitative variables and as the average, standard deviation, median, minimum, and maximum for quantitative variables. The association among qualitative variables were evaluated by the chi-squared test or Fisher's exact test. The Spearman's rank correlation

coefficient was calculated for the quantitative variables. The Kaplan–Meier estimator of the survival function was applied for survival analysis, and the log-rank test was used to compare the survival function between groups. Regarding the expression of *ZNRF3* and *ATRX*, the determination of two groups of observations for a simple cut-off point was estimated using the maximum of the standardized log-rank statistic proposed by Lausen and Schumacher in 1992 [105]. The Cox semiparametric proportional hazards model was fitted to describe the relationship between OS or RFS and the covariates [106]. OS was defined as the time from the date of ACC diagnosis to the date of disease-related death or the last follow-up visit. RFS was defined as the time from the date of complete tumor resection to the date of the first radiological evidence of local and/or distant recurrence [38]. The assumption of proportional hazards was assessed based on the so-called Schoenfeld residuals [107,108]. There was evidence that covariates had a constant effect over time in all cases. The significance level was fixed at 5% for all tests. Statistical analyses were performed using IBM SPSS Statistics version 23.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) and R software version 3.6 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria).

Supplementary Materials: Supplementary materials can be found at <https://www.mdpi.com/1422-0067/22/3/1238/s1>.

Author Contributions: V.B.B. and M.C.B.V.F. designed the study. V.B.B. and A.M.F.L. acquired the clinical data and patient information. V.B.B., M.C.N.Z. and I.C.S. performed the pathological review of all cases and selected representative areas of the ACCs for tissue microarray construction. M.C.N.Z. and I.C.S. performed the immunohistochemical scoring. V.B.B. and M.C.B.V.F. wrote the manuscript. V.B.B., A.M.F.L., B.M.d.P.M., L.M., I.C.S., J.E.B.-N., F.Y.T., V.S., J.L.C., B.B.M., M.Q.A., M.C.N.Z., and M.C.B.V.F. performed critical revision of the article. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was supported in part by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/26345-5) to MCBVF.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and it was approved by the Ethics Committee of the Hospital das Clínicas—University of São Paulo (protocol code n.2.394.934, date of approval 27/09/2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available in Supplementary Material (Tables S1 and S2).

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

References

1. Dackiw, A.P.B.; Lee, J.E.; Gagel, R.E.; Evans, D.B. Adrenal cortical carcinoma. *World J. Surg.* **2001**, *25*, 914–926. [CrossRef] [PubMed]
2. Kebebew, E.; Reiff, E.; Duh, Q.Y.; Clark, O.H.; McMillan, A. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: Have we made progress? *World J. Surg.* **2006**, *30*, 872–878. [CrossRef] [PubMed]
3. Bilimoria, K.Y.; Shen, W.T.; Elaraj, D.; Bentrén, D.J.; Winchester, D.J.; Kebebew, E. Adrenocortical Carcinoma in the United States Treatment Utilization and Prognostic Factors. *Cancer* **2008**, *113*, 3130–3136. [CrossRef]
4. Icard, P.; Goudet, P.; Charpenay, C.; Andreassian, B.; Carnaille, B.; Chapuis, Y.; Cougard, P.; Henry, J.-F.; Proye, C. Adrenocortical carcinomas: Surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J. Surg.* **2000**, *25*, 891–897. [CrossRef] [PubMed]
5. Fassnacht, M.; Johansson, S.; Quinkler, M.; Bucsky, P.; Willenberg, H.S.; Beuschlein, F.; Terzolo, M.; Mueller, H.-H.; Hahner, S.; Allolio, B.; et al. Limited Prognostic Value of the 2004 International Union Against Cancer Staging Classification for Adrenocortical Carcinomas. *Cancer* **2009**, *115*, 243–250. [CrossRef]
6. Fassnacht, M.; Libe, R.; Kroiss, M.; Allolio, B. Adrenocortical carcinoma: A clinician's update. *Nat. Rev. Endocrinol.* **2011**, *7*, 323–335. [CrossRef] [PubMed]
7. Fassnacht, M.; Terzolo, M.; Allolio, B.; Baudin, E.; Haak, H.; Berruti, A.; Welin, S.; Schade-Brittinger, C.; Lacroix, A.; Jarzab, B.; et al. Combination Chemotherapy in Advanced Adrenocortical Carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **2012**, *366*, 2189–2197. [CrossRef]

8. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T.; Baudin, E.; Berruti, A.; De Krijger, R.R.; Haak, H.R.; 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**, *179*, G1–G46. [\[CrossRef\]](#)
9. 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. [\[CrossRef\]](#)
10. Weiss, L.M. Comparative histologic-study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **1984**, *8*, 163–169. [\[CrossRef\]](#)
11. Luton, J.P.; Cerdas, S.; Billaud, L.; Thomas, G.; Guilhaume, B.; Bertagna, X.; Laudat, M.-H.; 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*, 1195–1201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Medeiros, L.J.; Weiss, L.M. New developments in the pathological diagnosis of adrenal-cortical neoplasms—A review. *Am. J. Clin. Pathol.* **1992**, *97*, 73–83. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. McNicol, A.M.; Struthers, A.J.; Nolan, C.E.; Hermans, J.; Haak, H.R. Proliferation in adrenocortical tumors: Correlation with clinical outcome and p53 status. *Endocr. Pathol.* **1997**, *8*, 29–36. [\[CrossRef\]](#)
14. Vassilopoulou-Sellin, R.; Schultz, P.N. Adrenocortical carcinoma—Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer* **2001**, *92*, 1113–1121. [\[CrossRef\]](#)
15. Stojadinovic, A.; Ghossein, R.A.; Hoos, A.; Nissan, A.; Marshall, D.; Dudas, M.; Cordon-Cardo, C.; Jaques, D.P.; Brennan, M.F. Adrenocortical carcinoma: Clinical, morphologic, and molecular characterization. *J. Clin. Oncol.* **2002**, *20*, 941–950. [\[CrossRef\]](#)
16. Aubert, S.; Wacrenier, A.; Leroy, X.; Devos, P.; Carnaille, B.; Proye, C.; Wemeau, J.L.; Lecomte-Houcke, M.; Leteurtre, E. Weiss system revisited—A clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am. J. Surg. Pathol.* **2002**, *26*, 1612–1619. [\[CrossRef\]](#)
17. Stojadinovic, A.; Brennan, M.F.; Hoos, A.; Omeroglu, A.; Leung, D.H.Y.; Dudas, M.E.; Nissan, A.; Cordon-Cardo, C.; Ghossein, R.A. Adrenocortical adenoma and carcinoma: Histopathological and molecular comparative analysis. *Mod. Pathol.* **2003**, *16*, 742–751. [\[CrossRef\]](#)
18. Sturgeon, C.; Shen, W.T.; Clark, O.H.; Duh, Q.Y.; Kebebew, E. Risk assessment in 457 adrenal cortical carcinomas: How much does tumor size predict the likelihood of malignancy? *J. Am. Coll. Surg.* **2006**, *202*, 423–430. [\[CrossRef\]](#)
19. Assie, G.; Antoni, G.; Tissier, F.; Caillou, B.; Abiven, G.; Gicquel, C.; Lebouilleux, S.; Travagli, J.-P.; Dromain, C.; Bertagna, X.; et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2007**, *92*, 148–154. [\[CrossRef\]](#)
20. Morimoto, R.; Satoh, F.; Murakami, O.; Suzuki, T.; Abe, T.; Tanemoto, M.; Abe, M.; Urno, A.; Ishidoya, S.; Arai, Y.; et al. Immunohistochemistry of a proliferation marker Ki-67/MIB1 in adrenocortical carcinomas: Ki-67/MIB1 Labeling index is a predictor for recurrence of adrenocortical carcinomas. *Endocr. J.* **2008**, *55*, 49–55. [\[CrossRef\]](#)
21. Lau, S.K.; Weiss, L.M. The Weiss system for evaluating adrenocortical neoplasms: 25 years later. *Hum. Pathol.* **2009**, *40*, 757–768. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
22. Almeida, M.Q.; Soares, I.C.; Ribeiro, T.C.; Fragoso, M.; Marins, L.V.; Wakamatsu, A.; Ressio, R.A.; Nishi, M.Y.; Jorge, A.A.L.; Lerario, A.M.; et al. Steroidogenic Factor 1 Overexpression and Gene Amplification Are More Frequent in Adrenocortical Tumors from Children than from Adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2010**, *95*, 1458–1462. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Durand, J.; Lampron, A.; Mazzucco, T.L.; Chapman, A.; Bourdeau, I. Characterization of Differential Gene Expression in Adrenocortical Tumors Harboring β -Catenin (CTNNB1) Mutations. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2011**, *96*, E1206–E1211. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Gaujoux, S.; Grabar, S.; Fassnacht, M.; Ragazzon, B.; Launay, P.; Libe, R.; Chokri, I.; Audebourg, A.; Royer, B.; Sbiera, S.; et al. β -Catenin Activation Is Associated with Specific Clinical and Pathologic Characteristics and a Poor Outcome in Adrenocortical Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **2011**, *17*, 328–336. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ayala-Ramirez, M.; Jasim, S.; Feng, L.; Ejaz, S.; Deniz, F.; Busaidy, N.; Waguespack, S.G.; Naing, A.; Sircar, K.; Wood, C.G.; et al. Adrenocortical carcinoma: Clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. *Eur. J. Endocrinol.* **2013**, *169*, 891–899. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
26. Berruti, A.; Fassnacht, M.; Haak, H.; Else, T.; Baudin, E.; Sperone, P.; Kroiss, M.; Kerkhofs, T.; Williams, A.R.; Ardito, A.; et al. Prognostic Role of Overt Hypercortisolism in Completely Operated Patients with Adrenocortical Cancer. *Eur. Urol.* **2014**, *65*, 832–838. [\[CrossRef\]](#)
27. Assié, G.; Letouzé, E.; Fassnacht, M.; Jouinot, A.; Luscap, W.; Barreau, O.; Omeiri, H.; Rodriguez, S.; Perlemoine, K.; René-Corail, F.; et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 607–612. [\[CrossRef\]](#)
28. 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 Ki-67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2015**, *100*, 841–849. [\[CrossRef\]](#)
29. Libé, R.; Borget, I.; Ronchi, C.L.; Zaggia, B.; Kroiss, M.; Kerkhofs, T.; Bertherat, J.; Volante, M.; Quinkler, M.; Chabre, O.; et al. Prognostic factors in stage III-IV adrenocortical carcinomas (ACC): An European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. *Ann. Oncol.* **2015**, *26*, 2119–2125. [\[CrossRef\]](#)
30. Pennanen, M.; Heiskanen, I.; Sane, T.; Remes, S.; Mustonen, H.; Haglund, C.; Arola, J. Helsinki score—a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. *Hum. Pathol.* **2015**, *46*, 404–410. [\[CrossRef\]](#)

31. Zheng, S.; Cherniack, A.D.; Dewal, N.; Moffitt, R.A.; Danilova, L.; Murray, B.A.; Lerario, A.M.; Else, T.; Knijnenburg, T.A.; Ciriello, G.; et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell*. **2016**, *29*, 723–736. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Mete, O.; Gucer, H.; Kefeli, M.; Asa, S.L. Diagnostic and Prognostic Biomarkers of Adrenal Cortical Carcinoma. *Am. J. Surg. Pathol.* **2018**, *42*, 201–213. [[CrossRef](#)]
33. Mete, O.; Asa, S.L.; Giordano, T.J.; Papotti, M.; Sasano, H.; Volante, M. Immunohistochemical Biomarkers of Adrenal Cortical Neoplasms. *Endocr. Pathol.* **2018**, *29*, 137–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Libe, R. Clinical and molecular prognostic factors in adrenocortical carcinoma. *Minerva Endocrinol.* **2019**, *44*, 58–69. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ahmed, A.A.; Thomas, A.J.; Ganeshan, D.M.; Blair, K.J.; Lall, C.; Lee, J.T.; Morshid, A.I.; Habra, M.A.; Elsayes, K.M. Adrenal cortical carcinoma: Pathology, genomics, prognosis, imaging features, and mimics with impact on management. *Abdom. Radiol.* **2020**, *45*, 945–963. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Pinto, E.M.; Chen, X.; Easton, J.; Finkelstein, D.; Liu, Z.; Pounds, S.; Rodriguez-Galindo, C.; Lund, T.C.; Mardis, E.R.; Wilson, R.K.; et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 10. [[CrossRef](#)]
37. The Cancer Genome Atlas Program. Available online: <https://www.cancer.gov/tcga> (accessed on 3 January 2021).
38. Giles, R.H.; van Es, J.H.; Clevers, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochim. Biophys. Acta* **2003**, *1653*, 1–24. [[CrossRef](#)]
39. Lacombe, A.M.F.; Soares, I.C.; Mariani, B.M.D.P.; Nishi, M.Y.; Bezerra-Neto, J.E.; Charchar, H.D.S.; Brondani, V.B.; Tanno, F.Y.; Srougi, V.; Chambo, J.L.; et al. Sterol O-Acyl Transferase 1 as a Prognostic Marker of Adrenocortical Carcinoma. *Cancers* **2020**, *12*, 247. [[CrossRef](#)]
40. Fearon, E.R.; Spence, J.R. Cancer Biology: A New RING to Wnt Signaling. *Curr. Biol.* **2012**, *22*, R849–R851. [[CrossRef](#)]
41. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **2011**, *144*, 646–674. [[CrossRef](#)]
42. Cesare, A.J.; Reddel, R.R. Alternative lengthening of telomeres: Models, mechanisms and implications. *Nat. Rev. Genet.* **2010**, *11*, 319–330. [[CrossRef](#)]
43. Watson, J.D. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat. New Biol.* **1972**, *239*, 197. [[CrossRef](#)]
44. Olovnikov, A.M. Theory of marginotomy—Incomplete copying of template margin in enzymic-synthesis of polynucleotides and biological significance of phenomenon. *J. Theor. Biol.* **1973**, *41*, 181–190. [[CrossRef](#)]
45. Shay, J.W. Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov.* **2016**, *6*, 584–593. [[CrossRef](#)]
46. Der-Sarkissian, H.; Bacchetti, S.; Cazes, L.; Londono-Vallejo, J.A. The shortest telomeres drive karyotype evolution in transformed cells. *Oncogene* **2004**, *23*, 1221–1228. [[CrossRef](#)]
47. Watson, L.A.; Goldberg, H.; Berube, N.G. Emerging roles of ATRX in cancer. *Epigenomics* **2015**, *7*, 1365–1378. [[CrossRef](#)]
48. Clynes, D.; Higgs, D.R.; Gibbons, R.J. The chromatin remodeller ATRX: A repeat offender in human disease. *Trends Biochem. Sci.* **2013**, *38*, 461–466. [[CrossRef](#)]
49. Drane, P.; Ouarrhni, K.; Depaux, A.; Shuaib, M.; Hamiche, A. The death-associated protein DAXX is a novel histone chaperone involved in the replication-independent deposition of H3.3. *Genes Dev.* **2010**, *24*, 1253–1265. [[CrossRef](#)]
50. Elsasser, S.J.; Huang, H.D.; Lewis, P.W.; Chin, J.W.; Allis, C.D.; Patel, D.J. DAXX envelops a histone H3.3-H4 dimer for H3.3-specific recognition. *Nature* **2012**, *491*, 560. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Goldberg, A.D.; Banaszynski, L.A.; Noh, K.-M.; Lewis, P.W.; Elsaesser, S.J.; Stadler, S.; Dewell, S.; Law, M.; Guo, X.; Li, X.; et al. Distinct Factors Control Histone Variant H3.3 Localization at Specific Genomic Regions. *Cell* **2010**, *140*, 678–691. [[CrossRef](#)]
52. Lovejoy, C.A.; Li, W.; Reisenweber, S.; Thongthip, S.; Bruno, J.; De Lange, T.; De, S.; Petrini, J.H.J.; Sung, P.A.; Jasin, M.; et al. Loss of ATRX, Genome Instability, and an Altered DNA Damage Response Are Hallmarks of the Alternative Lengthening of Telomeres Pathway. *PLoS Genet.* **2012**, *8*, 16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Bower, K.; Napier, C.E.; Cole, S.L.; Dagg, R.A.; Lau, L.M.S.; Duncan, E.L.; Moy, E.L.; Reddel, R.R. Loss of Wild-Type ATRX Expression in Somatic Cell Hybrids Segregates with Activation of Alternative Lengthening of Telomeres. *PLoS ONE* **2012**, *7*, 10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Barthel, F.P.; Wei, W.; Tang, M.; Martinez-Ledesma, E.; Hu, X.; Amin, S.B.; Akdemir, K.C.; Seth, S.; Song, X.; Wang, Q.; et al. Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nat. Genet.* **2017**, *49*, 349–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Wiestler, B.; Capper, D.; Holland-Letz, T.; Von Deimling, A.; Pfister, S.M.; Platten, M.; Weller, M.; Wick, W. ATRX loss refines the classification of anaplastic glioma and is a favorable prognostic marker. *Cancer Res.* **2013**, *73*, 1.
56. Marinoni, I.; Kurrer, A.S.; Vassella, E.; Dettmer, M.; Rudolph, T.; Banz, V.M.; Hunger, F.; Pasquinelli, S.; Speel, E.; Perren, A. Loss of DAXX and ATRX Are Associated With Chromosome Instability and Reduced Survival of Patients With Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Gastroenterology* **2014**, *146*, 453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Liao, J.-Y.; Lee, J.-C.; Tsai, J.-H.; Yang, C.-Y.; Liu, T.-L.; Ke, Z.-L.; Hsu, H.-H.; Jeng, Y.-M. Comprehensive screening of alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas. *Mod. Pathol.* **2015**, *28*, 1545–1554. [[CrossRef](#)]
58. Yang, C.-Y.; Liao, J.-Y.; Huang, W.-J.; Chang, Y.-T.; Chang, M.-C.; Lee, J.-C.; Tsai, J.-H.; Su, Y.-N.; Hung, C.-C.; Jeng, Y.-M. Targeted next-generation sequencing of cancer genes identified frequent TP53 and ATRX mutations in leiomyosarcoma. *Am. J. Transl. Res.* **2015**, *7*, 2072–2081.

59. Cai, J.; Chen, J.; Zhang, W.; Yang, P.; Zhang, C.; Li, M.; Yao, K.; Wang, H.; Li, Q.; Jiang, C.; et al. Loss of ATRX, associated with DNA methylation pattern of chromosome end, impacted biological behaviors of astrocytic tumors. *Oncotarget* **2015**, *6*, 18105–18115. [\[CrossRef\]](#)
60. Cai, J.; Zhu, P.; Zhang, C.; Li, Q.; Wang, Z.; Li, G.; Wang, G.; Yang, P.; Li, J.; Han, B.; et al. Detection of ATRX and IDH1-R132H immunohistochemistry in the progression of 211 paired gliomas. *Oncotarget* **2016**, *7*, 16384–16395. [\[CrossRef\]](#)
61. Singhi, A.D.; Liu, T.-C.; Roncalioli, J.L.; Cao, D.; Zeh, H.J.; Zureikat, A.H.; Tsung, A.; Marsh, J.W.; Lee, K.K.; Hogg, M.E.; et al. Alternative Lengthening of Telomeres and Loss of DAXX/ATRX Expression Predicts Metastatic Disease and Poor Survival in Patients with Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, 600–609. [\[CrossRef\]](#)
62. Ren, X.L.; Tu, C.; Tang, Z.C.; Ma, R.F.; Li, Z.H. Alternative lengthening of telomeres phenotype and loss of ATRX expression in sarcomas (Review). *Oncol. Lett.* **2018**, *15*, 7489–7496. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Chou, A.; Itchins, M.; De Reuver, P.R.; Arena, J.; Clarkson, A.; Sheen, A.; Sioson, L.; Cheung, V.; Perren, A.; Nahm, C.; et al. ATRX loss is an independent predictor of poor survival in pancreatic neuroendocrine tumors. *Hum. Pathol.* **2018**, *82*, 249–257. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Lu, H.C.; Apicelli, A.J.; Eulo, V.; Pekmezci, M.; Hirbe, A.C.; Dahiya, S. Aberrant ATRX Protein Expression is Associated with Worse Survival in NF1-Associated Malignant Peripheral Nerve Sheath Tumors. *Mod. Pathol.* **2018**, *31*, 661.
65. Terra, S.; Xie, H.; Boland, J.M.; Mansfield, A.S.; Molina, J.R.; Roden, A.C. Loss of ATRX expression predicts worse prognosis in pulmonary carcinoid tumors. *Hum. Pathol.* **2019**, *94*, 78–85. [\[CrossRef\]](#)
66. Hong, X.; Qiao, S.; Li, F.; Wang, W.; Jiang, R.; Wu, H.; Chen, H.; Liu, L.; Peng, J.; Wang, J.; et al. Whole-genome sequencing reveals distinct genetic bases for insulinomas and non-functional pancreatic neuroendocrine tumours: Leading to a new classification system. *Gut* **2020**, *69*, 877–887. [\[CrossRef\]](#)
67. Klaus, A.; Birchmeier, W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2008**, *8*, 387–398. [\[CrossRef\]](#)
68. Hao, H.-X.; Xie, Y.; Zhang, Y.; Charlat, O.; Oster, E.; Avello, M.; Lei, H.; Mikanin, C.; Liu, D.; Ruffner, H.; et al. ZNRF3 promotes Wnt receptor turnover in an R-spondin-sensitive manner. *Nat. Cell Biol.* **2012**, *485*, 195–200. [\[CrossRef\]](#)
69. Basham, K.J.; Rodriguez, S.; Turcu, A.F.; Lerario, A.M.; Logan, C.Y.; Rysztak, M.R.; Gomez-Sanchez, C.E.; Breault, D.T.; Koo, B.K.; Clevers, H.; et al. A ZNRF3-dependent Wnt/ β -catenin signaling gradient is required for adrenal homeostasis. *Genes. Dev.* **2019**, *33*, 209–220. [\[CrossRef\]](#)
70. Zhou, Y.; Lan, J.; Wang, W.; Shi, Q.; Lan, Y.; Cheng, Z.; Guan, H. ZNRF3 acts as a tumour suppressor by the Wnt signalling pathway in human gastric adenocarcinoma. *J. Mol. Histol.* **2013**, *44*, 555–563. [\[CrossRef\]](#)
71. Qin, H.Z.; Cai, A.Z.; Xi, H.Q.; Yuan, J.; Chen, L. ZNRF3 Induces Apoptosis of Gastric Cancer Cells by Antagonizing Wnt and Hedgehog Signaling. *Cell Biochem. Biophys.* **2015**, *73*, 361–367. [\[CrossRef\]](#)
72. Yu, N.; Zhu, H.; Tao, Y.; Huang, Y.; Song, X.; Zhou, Y.; Li, Y.; Pei, Q.; Tan, Q.; Pei, H. Association between prognostic survival of human colorectal carcinoma and ZNRF3 expression. *Oncol. Targets Ther.* **2016**, *9*, 6679–6687. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Bond, C.E.; McKeone, D.M.; Kalimutho, M.; Bettington, M.L.; Pearson, S.-A.; Dumenil, T.D.; Wockner, L.E.; Burge, M.; Leggett, B.A.; Whitehall, V.L. RNF43 and ZNRF3 are commonly altered in serrated pathway colorectal tumorigenesis. *Oncotarget* **2016**, *7*, 70589–70600. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Qiu, W.W.; Yang, Z.L.; Fan, Y.B.; Zheng, Q. ZNRF3 is downregulated in papillary thyroid carcinoma and suppresses the proliferation and invasion of papillary thyroid cancer cells. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 12665–12672. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Shi, J.C.; Jiang, X.G.; Yu, Z.J.; He, G.Q.; Ning, H.Y.; Wu, Z.X.; Cai, Y.; Yu, H.; Chen, A. ZNRF3 contributes to the growth of lung carcinoma via inhibiting Wnt/ β -catenin pathway and is regulated by miR-93. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 3051–3057. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Xu, E.; Zhao, J.; Ma, J.; Wang, C.; Zhang, C.; Jiang, H.; Cheng, J.; Gao, R.; Zhou, X. miR-146b-5p promotes invasion and metastasis contributing to chemoresistance in osteosarcoma by targeting zinc and ring finger 3. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 275–283. [\[CrossRef\]](#)
77. Wang, Z.W.; Wang, Y.L.; Ren, H.T.; Jin, Y.Y.; Guo, Y. ZNRF3 Inhibits the Invasion and Tumorigenesis in Nasopharyngeal Carcinoma Cells by Inactivating the Wnt/ β -Catenin Pathway. *Oncol. Res.* **2017**, *25*, 571–577. [\[CrossRef\]](#)
78. Qiao, G.E.; Dai, C.G.; He, Y.; Shi, J.J.; Xu, C.F. Effects of miR-106b-3p on cell proliferation and epithelial-mesenchymal transition, and targeting of ZNRF3 in esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **2019**, *43*, 1817–1829. [\[CrossRef\]](#)
79. Berbegall, A.P.; Villamen, E.; Tadeo, I.; Martinsson, T.; Canete, A.; Castel, V.; Navarro, S.; Noguera, R. Neuroblastoma after Childhood: Prognostic Relevance of Segmental Chromosome Aberrations, ATRX Protein Status, and Immune Cell Infiltration. *Neoplasia* **2014**, *16*, 471–480. [\[CrossRef\]](#)
80. Davidson, B.; McFadden, E.; Holth, A.; Brunetti, M.; Florenes, V.A. Death domain-associated protein (DAXX) expression is associated with poor survival in metastatic high-grade serous carcinoma. *Virchows Arch.* **2020**, *477*, 857–864. [\[CrossRef\]](#)
81. Berruti, A.; Terzolo, M.; Sperone, P.; Pia, A.; Della Casa, S.; Gross, D.J.; Carnaghi, C.; Casali, P.; Porpiglia, F.; Mantero, F.; 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*, 657–666. [\[CrossRef\]](#)
82. Abiven, G.; Coste, J.; Groussin, L.; Anract, P.; Tissier, F.; Legmann, P.; Dousset, B.; Bertagna, X.; Bertherat, J. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: Poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2006**, *91*, 2650–2655. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Margonis, G.A.; Kim, Y.; Tran, T.B.; Postlewait, L.M.; Maithel, S.K.; Wang, T.S.; Glenn, J.A.; Hatzaras, I.; Shenoy, R.; Phay, J.E.; et al. Outcomes after resection of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma. *Am. J. Surg.* **2016**, *211*, 1106–1113. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

84. Vanbrabant, T.; Fassnacht, M.; Assie, G.; Dekkers, O.M. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: Systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Endocrinol.* **2018**, *179*, 429–436. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Clements, W.M.; Wang, J.; Sarnaik, A.; Kim, O.J.; MacDonald, J.; Fenoglio-Preiser, C.; Groden, J.; Lowy, A.M. β -catenin mutation is a frequent cause of Wnt pathway activation in gastric cancer. *Cancer Res.* **2002**, *62*, 3503–3506.
86. De La Coste, A.; Romagnolo, B.; Billuart, P.; Renard, C.A.; Buendia, M.A.; Soubrane, O.; Fabre, M.; Chelly, J.; Beldjord, C.; Khan, A.; et al. Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 8847–8851. [[CrossRef](#)]
87. Hao, H.-X.; Jiang, X.; Cong, F. Control of Wnt Receptor Turnover by R-spondin-ZNRF3/RNF43 Signaling Module and Its Dysregulation in Cancer. *Cancers* **2016**, *8*, 25. [[CrossRef](#)]
88. Faillot, S.; Assie, G. The genomics of adrenocortical tumors. *Eur. J. Endocrinol.* **2016**, *174*, R249–R265. [[CrossRef](#)]
89. Espiard, S.; Bertherat, J. The genetics of adrenocortical tumors. *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.* **2015**, *44*, 311–334. [[CrossRef](#)]
90. Tissier, F.; Cavard, C.; Groussin, L.; Perlemoine, K.; Fumey, G.; Hagnere, A.M.; Rene-Corail, F.; Jullian, E.; Gicquel, C.; Bertagna, X.; et al. Mutations of β -catenin in adrenocortical tumors: Activation of the wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 7622–7627. [[CrossRef](#)]
91. Gomes, D.C.; Leal, L.F.; Mermejo, L.M.; Scrideli, C.A.; Martinelli, C.E.; Fragoso, M.C.B.V.; Latronico, A.C.; Tone, L.G.; Tucci, S.; Yunes, J.A.; et al. Sonic Hedgehog Signaling Is Active in Human Adrenal Cortex Development and Deregulated in Adrenocortical Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2014**, *99*, E1209–E1216. [[CrossRef](#)]
92. Terzolo, M.; Boccuzzi, A.; Bovio, S.; Cappia, S.; De Giulio, P.; Ali, A.; Paccotti, P.; Porpiglia, F.; Fontana, D.; Angeli, A. Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* **2001**, *57*, 176–182. [[CrossRef](#)]
93. Sasano, H.; Suzuki, T.; Moriya, T. Recent advances in histopathology and immunohistochemistry of adrenocortical carcinoma. *Endocr. Pathol.* **2007**, *17*, 345–354. [[CrossRef](#)]
94. Xie, Y.; Tan, Y.; Yang, C.; Zhang, X.; Xu, C.; Qiao, X.; Xu, J.; Tian, S.; Fang, C.; Kang, C. Omics-based integrated analysis identified ATRX as a biomarker associated with glioma diagnosis and prognosis. *Cancer Biol. Med.* **2019**, *16*, 784–796.
95. Ikemura, M.; Shibahara, J.; Mukasa, A.; Takayanagi, S.; Aihara, K.; Saito, N.; Aburatani, H.; Fukayama, M. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. *Histopathology* **2016**, *69*, 260–267. [[CrossRef](#)]
96. Liu, X.-Y.; Gerges, N.; Korshunov, A.; Sabha, N.; Khuong-Quang, D.-A.; Fontebasso, A.M.; Fleming, A.; Hadjadj, D.; Schwartzentruber, J.; Majewski, J.; et al. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta Neuropathol.* **2012**, *124*, 615–625. [[CrossRef](#)]
97. Duregon, E.; Volante, M.; Bollito, E.; Goia, M.; Buttigliero, C.; Zaggia, B.; Berruti, A.; Scagliotti, G.V.; Papotti, M. Pitfalls in the diagnosis of adrenocortical tumors: A lesson from 300 consultation cases. *Hum. Pathol.* **2015**, *46*, 1799–1807. [[CrossRef](#)]
98. Faria, A.M.; Sbiera, S.; Ribeiro, T.C.; Soares, I.C.; Mariani, B.M.; Freire, D.S.; De Sousa, G.R.; Lerário, A.M.; Ronchi, C.L.; Deutschbein, T.; et al. Expression of LIN28 and its regulatory microRNAs in adult adrenocortical cancer. *Clin. Endocrinol.* **2015**, *82*, 481–488. [[CrossRef](#)]
99. De Sousa, G.R.V.; Soares, I.C.; Faria, A.M.; Domingues, V.B.; Wakamatsu, A.; Lerário, A.M.; Alves, V.A.F.; Zerbini, M.C.N.; De Mendonça, B.B.; Fragoso, M.C.B.V.; et al. DAX1 Overexpression in Pediatric Adrenocortical Tumors: A Synergic Role with SF1 in Tumorigenesis. *Horm. Metab. Res.* **2015**, *47*, 656–661. [[CrossRef](#)]
100. De Sousa, G.R.V.; Ribeiro, T.C.; Faria, A.M.; Mariani, B.M.P.; Lerario, A.M.; Zerbini, M.C.N.; Soares, I.C.; Wakamatsu, A.; Alves, V.A.F.; Mendonça, B.B.; et al. Low DICER1 expression is associated with poor clinical outcome in adrenocortical carcinoma. *Oncotarget* **2015**, *6*, 22724–22733. [[CrossRef](#)]
101. 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](#)]
102. Landis, J.R.; Koch, G.G. Measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics* **1977**, *33*, 159–174. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
103. Pinheiro, C.; Granja, S.; Longatto, A.; Faria, A.M.; Fragoso, M.; Lovisolo, S.M.; Bonatelli, M.; Costa, R.F.A.; Lerario, A.M.; Almeida, M.Q.; et al. GLUT1 expression in pediatric adrenocortical tumors: A promising candidate to predict clinical behavior. *Oncotarget* **2017**, *8*, 63835–63845. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Heaton, J.H.; Wood, M.A.; Kim, A.C.; Lima, L.O.; Barlasakar, F.M.; Almeida, M.Q.; Fragoso, M.C.B.V.; Kuick, R.; Lerario, A.M.; Simon, D.P.; et al. Progression to Adrenocortical Tumorigenesis in Mice and Humans through Insulin-Like Growth Factor 2 and β -Catenin. *Am. J. Pathol.* **2012**, *181*, 1017–1033. [[CrossRef](#)]
105. Tadjine, M.; Lampron, A.; Ouadi, L.; Horvath, A.; Stratakis, C.A.; Bourdeau, I. Detection of somatic β -catenin mutations in primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD). *Clin. Endocrinol.* **2008**, *69*, 367–373. [[CrossRef](#)]
106. Lausen, B.; Schumacher, M. Maximally selected rank statistics. *Biometrics* **1992**, *48*, 73–85. [[CrossRef](#)]
107. Cox, D.R. Regression models and life-tables. *J. R. Stat. Soc.* **1972**, *34*, 187. [[CrossRef](#)]
108. Schoenfeld, D. Partial residuals for the proportional hazards regression-model. *Biometrika* **1982**, *69*, 239–241. [[CrossRef](#)]

Anexo 5. Artigo publicado: “High prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes of Lynch syndrome in pediatric patients with adrenocortical tumors carrying a germline mutation on *TP53*”

cancers

Article

High Prevalence of Alterations in DNA Mismatch Repair Genes of Lynch Syndrome in Pediatric Patients with Adrenocortical Tumors Carrying a Germline Mutation on *TP53*

Vania Balderrama Brondani ^{1,*}, Luciana Montenegro ^{2,*}, Amanda Meneses Ferreira Lacombe ¹ , Breno Marchiori Magalhães ¹, Mirian Yumie Nishi ², Mariana Ferreira de Assis Funari ², Amanda de Moraes Narcizo ³, Lais Cavalcá Cardoso ³, Sheila Aparecida Coelho Siqueira ⁴, Maria Claudia Nogueira Zerbini ⁴ , Francisco Tibor Denes ⁵, Ana Claudia Latronico ^{1,2}, Berenice Bilharinho Mendonça ^{1,2}, Madson Queiroz Almeida ^{1,2,6}, Antonio Marcondes Lerario ⁷, Ibere Cauduro Soares ⁸ and Maria Candida Barisson Villares Fragoso ^{1,2,6,*}

¹ Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Unidade de Suprarrenal, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; amflacombe@usp.br (A.M.F.L.); breno.marchiori@fm.usp.br (B.M.M.); anacl@usp.br (A.C.L.); beremen@usp.br (B.B.M.); madson.a@hc.fm.usp.br (M.Q.A.)

² Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; minishi@usp.br (M.Y.N.); marianafunari@usp.br (M.F.d.A.F.)

³ Laboratório de Sequenciamento em Larga Escala (SELA), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; amnarcizo@usp.br (A.d.M.N.); lais.cavalca@fm.usp.br (L.C.C.)

⁴ Departamento de Anatomia Patológica, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; sheila.siqueira@hc.fm.usp.br (S.A.C.S.); czerbini@usp.br (M.C.N.Z.)

⁵ Serviço de Urologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; francisco.denes@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, São Paulo 0540396, Brasil

⁷ Department of Internal Medicine, Division of Metabolism, Endocrinology and Diabetes, University of Michigan, Ann Arbor, MI 48109, USA; alerario@umich.edu

⁸ Serviço de Anatomia Patológica, Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo 0540396, Brasil; ibere.soares@hc.fm.usp

* Correspondence: vbrondani@usp.br (V.B.B.); lucianam@usp.br (L.M.); maria.villares@hc.fm.usp.br (M.C.B.V.F.); Tel.: +55-11-26617512e (M.C.B.V.F.)

Received: 4 February 2020; Accepted: 4 March 2020; Published: 7 March 2020

Abstract: Adrenocortical cancer is a rare malignant neoplasm associated with a dismal prognosis. Identification of the molecular pathways involved in adrenal tumorigenesis is essential for a better understanding of the disease mechanism and improvement of its treatment. The aim of this study is to define the prevalence of alterations in DNA mismatch repair (MMR) genes in Lynch syndrome among pediatric patients with adrenocortical neoplasia from southern Brazil, where the prevalence of a specific *TP53* germline mutation (p.Arg337His) is quite high. Thirty-six pediatric patients were retrospectively evaluated. Immunohistochemistry (IHC) for the MMR enzymes MLH1, MSH2, MSH6, and PMS2, as well as next-generation sequencing (NGS) were performed. For IHC, 36 pediatric tumors were tested. In all of them, the expression of all evaluated MMR proteins was well-preserved. For NGS, 35 patients with pediatric tumor were tested. Three patients (8.57%) with the *TP53* p.Arg337His germline mutation presented pathogenic and likely pathogenic variants in the *MMR* genes (two in *MLH1* and one in *MSH6*). The prevalence of altered *MMR* genes among pediatric patients was elevated (8.57%) and higher than in colorectal and endometrial cancer cohorts. Pediatric patients with adrenocortical tumors should, thus, be strongly considered as at genetic risk for Lynch syndrome.

Keywords: adrenal tumor; DNA mismatch repair; *TP53*

1. Introduction

Adrenocortical cancer (ACC) is a rare malignant neoplasm, presenting a general incidence of one to two cases/million/year [1,2] and an overall age-adjusted incidence of 0.72 cases/million/year in the United States [3]. ACC has been associated with a variable clinical presentation [4]; in most cases, it is characterized by hormonal hypersecretion [5], and Cushing's syndrome is responsible for one-third of cases [3]. ACC usually presents a dismal prognosis [3]. On the other hand, pediatric patients with adrenocortical tumors (ACTs) generally have better prognoses than adult patients [6–8]. The incidence of pediatric adrenocortical tumors in Southern Brazil has been estimated to be 3.4–4.2 cases/million children/year [6], which represents a rate that is ten to fifteen times higher than the global incidence rate. This notorious difference is due to the high prevalence of the germline mutation *TP53* p.Arg337His in this region of Brazil [6,9–12]. Among pediatric patients, germline mutations are responsible for most cases and *TP53* mutations are present in 50–90% of cases [5,11]; this differs from the adult ACC group, in which sporadic cases are the most common [5]. Li-Fraumeni syndrome (LFS), first described in 1969, is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome in pediatric cases and in young adults, which results from germline mutations in the *TP53* tumor suppressor gene [13]. LFS families present ACC in 3–10% of cases, showing that germline mutations in *TP53* are linked to adrenal tumorigenesis [14]. Other genetic syndromes have been related to the occurrence of ACT and ACC, such as Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS), multiple endocrine neoplasia type 1 (MEN1), familial adenomatous polyposis (FAP), neurofibromatosis type 1, Werner syndrome, and Lynch syndrome (LS) [5]. The identification of molecular pathways responsible for adrenal tumorigenesis is essential for a better understanding of the disease and better treatments for the patient.

LS is an autosomal dominant inherited condition. It was first described in 1966 by Lynch et al. [15] in two large families from Nebraska and Michigan. Although the Nebraska proband presented ACC, adrenal tumors are not recognized as LS-associated tumors and are not mentioned in the clinical criteria for diagnosis. Amsterdam I and II clinical criteria [16] and the Revised Bethesda Guidelines [17] are the clinical criteria used for LS diagnosis, which are based on the occurrence of colorectal cancer (CCR) and the presence of familial cancer history. They also indicate LS-associated tumors, such as endometrial, small bowel, ureter, and pelvic renal cancers. Germline mutations in *MMR* genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*) have been associated with this syndrome since 1993 [18–21]. Germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* account for more than 90% of cases [22]. Inactivation of one of the *MMR* genes causes loss of MMR protein expression and is responsible for LS [22,23]. Other genetic alterations can cause LS-like disease with a clinical presentation similar to LS, such as the germline mutation in the *EPCAM* gene that causes *MSH2* silencing and the somatic mutation on *BRAF* gene that causes *MLH1* methylation [22,24]. In 2013, Raymond et al. [25] showed, in an adult cohort of ACC, an important prevalence of LS of 3.2%, which is comparable to the prevalence of colorectal and endometrial cancer in LS patients. This important contribution suggests the role of *MMR* genes in adrenal tumorigenesis.

The aim of this study is to define the prevalence of alterations in *MMR* genes of LS among pediatric patients with adrenocortical tumor.

2. Results

2.1. Patients

Thirty-six pediatric patients with adrenocortical tumor (ACT) were included in this retrospective study. Twenty-eight patients had their tumor tissue studied by IHC/Tissue microarray (TMA) and eight cases were studied by IHC/Formalin-fixed and paraffin-embedded tumor sections (FFPE). All

of them underwent genetic analysis. Twenty-three (63.9%) were female, with a F:M ratio of 1.76:1. The median age was 2.2 years (ranging from 0.8 to 15 years old). Nineteen (55.88%) patients presented isolated virilization, fourteen (41.17%) presented virilization associated with hypercortisolism, and one (2.94%) presented isolated hypercortisolism (two patients were excluded from this analysis, due to a lack of data). All patients underwent the *TP53* genetic test, from which it was found that 33 (91.6%) patients were positive for *TP53* germline pathogenic variants. Thirty-one (31/33, 93.9%) patients exhibited the classical c.1010G > A variant on exon 10 (p.Arg337His), while only two patients presented others described germline pathogenic variants: patient 24, c.818G > A (p.Arg273His); and patient 26, c.733G > A (p.Gly245Ser). All patients underwent surgical resection of the adrenocortical tumors, and histopathology examination was performed by an expert pathologist (MCNZ) and the adrenocortical origin of the tumors confirmed. This cohort presented ACTs with a median weight of 38.95 g (3–1230 g) and a median size of 5 cm (1.5–20 cm). Six patients (16.6%) showed metastatic disease and 3 patients had a fatal outcome. The median follow-up time was 8.6 years (0.03–31.6 years; see Table S1).

2.2. Immunohistochemistry

Of the 45 pediatric ACTs assembled on a previous TMA, nine were excluded due to technical issues in the staining procedure (no internal positive control). Of the remaining 36 tumors, only 28 cases presented available DNA for genetic analysis, who were included in this study. Eight pediatric patients with ACT and with DNA available for genetic analysis were posteriorly included, and their tumor tissue underwent FFPE for IHC.

All the cases studied (i.e., with TMA and with FFPE) presented preserved MLH1/PMS2 and MSH2/MSH6 immunoeexpression (positive nuclear staining for all four mismatch repair enzymes; Figure 1).

Figure 1. Representative adrenocortical tumor of a female patient, 2.7 years of age, with mutation on *TP53* (c.818G > A, p.Arg273His) and presenting wild-type *MMR* genes. These sections present preserved MLH1 (A), PMS2 (B), MSH2 (C), and MSH6 (D) immunostaining (positive nuclear staining), 400 $\times$.

2.3. Genetic Analysis

Thirty-six patients underwent next-generation sequencing (NGS). One patient (patient 29) was excluded from this genetic analysis, due to low-quality DNA. Six patients (17.1%) presented alterations in *MMR* genes (Table 1; Table S1).

Table 1. Next-generation sequencing (NGS) analysis.

Patients	Gender	Age (yrs)	Clinical Presentation	Metastasis	Global Survival Time (yrs)	MMR Genes Variants	InSIGHT DNA Variant Database	ACMG Classification	
#6	M	2.2	V	No	7.54	<i>MLH1</i> -c.1500_1502del p.Ile501del	Class 3: uncertain	Likely pathogenic	PM1; PM2; PM4; PP3
#9	M	2.1	V	No	8.19	<i>MLH1</i> -c.1808C > T p.Pro603Leu	Not identified	Likely pathogenic	PM1, PM2, PP2, PP3
#16	F	3.3	V/C	Yes	8.07	<i>MSH6</i> -c.2420A > G p.Tyr807Cys	Not identified	VUS	PM2, PP3, BP1
#21	F	3	V/C	No	31.61	<i>MSH6</i> -c.359T > C p.Ile120Thr	Not identified	Likely benign	PM1, PM2, BP3, BP4
#33	M	11.5	V/C	No	3.14	<i>MSH6</i> -c.328C > T p.Arg110X	Not identified	Pathogenic	PVS1, PM1, PM2, PP3, PP5
#35	M	2.3	V	No	0.08	<i>MSH6</i> -c.643G > T p.Val215Leu	Not identified	Likely benign	PM1, PM2, BP3, BP4

All the patients presented *TP53* Arg337His allelic variant. M: Male; F: Female; V: Virilization; C: Cushing's syndrome; VUS: Variant of uncertain significance. PVS1—Null variant (nonsense, frameshift, canonical ± 1 or 2 splice sites, initiation codon, single or multiexon deletion) in a gene where loss of function (LOF) is a known mechanism of disease. PM1—Located in a mutational hot spot and/or critical and well-established functional domain (e.g., active site of an enzyme) without benign variation. PM2—Absent from controls (or at extremely low frequency, if recessive) in Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project, or Exome Aggregation Consortium. PM4—Protein length changes as a result of in-frame deletions/insertions in a non-repeat region or stop-loss variants. PP2—Missense variant in a gene that has a low rate of benign missense variation and in which missense variants are a common mechanism of disease. PP3—Multiple lines of computational evidence support a deleterious effect on the gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.). PP5—Reputable source recently reports variant as pathogenic, but the evidence is not available to the laboratory to perform an independent evaluation. PB1—Missense variant in a gene for which primarily truncating variants are known to cause disease. PB2—Observed in trans with a pathogenic variant for a fully penetrant dominant gene/disorder or observed in cis with a pathogenic variant in any inheritance pattern. PB3—In-frame deletions/insertions in a repetitive region without a known function. PB4—Multiple lines of computational evidence suggest no impact on gene or gene product (conservation, evolutionary, splicing impact, etc.).

2.3.1. Pathogenic and Likely Pathogenic Variants

Three of thirty-five (8.57%) patients presented germline pathogenic and likely pathogenic variants on *MMR* genes identified on NGS, and all of them presented the *TP53* germline mutation (c.1010G > A, p.Arg337His). The expression of MMR proteins was preserved in immunohistochemistry analyses. Details of NGS are described below.

Patient #6. NGS analyses revealed an in-frame deletion variant in the *MLH1* gene [c.1500_1502del, p.Ile501del (rs587778920)]. This variant was localized in a hot spot area with 23 described non-VUSs. gnomAD exome data showed a low allele frequency (0.0000119), and the variant was not found in the gnomAD genome data. It is an in-frame deletion in a non-repeat area and computational prediction analysis also classified it as a pathogenic variant. This variant was classified as class 3/uncertain in the InSiGHT variant database, presenting a probability of pathogenicity between 0.05–0.949 using a multifactorial likelihood model.

Patient #9. NGS analyses identified a missense variant in the *MLH1* gene [c.1808C > T, p.Pro603Leu (rs63750876)]. This is a rare variant with a gnomAD exome allele frequency of 0.0000159. It is localized in a hot spot area, with 25 described non-VUSs in the area, and 11 prediction programs classified it as a pathogenic variant (DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, and SIFT).

Patient #33. NGS analyses showed a nonsense variant in the *MSH6* gene [c.328C > T, p.Arg110* (rs63750019)] (Figure 2). Nonsense variants in *MSH6* are a known mechanism of disease. This specific variant is rare and is localized in a hot spot area; computational analysis programs predicted the variant as pathogenic, and ClinVar lists it as pathogenic.

Figure 2. Figure of Sanger sequencing. I—Index case: patient #33 presenting a nonsense variant in the *MSH6* gene (c.328C > T, p.Arg110*; rs63750019); II—mother of index case; and III—father of index case.

2.3.2. Variant of Uncertain Significance (VUS)

Three out of thirty-five (8.57%) patients presented a variant of uncertain significance (VUS) in NGS, and all of them presented the *TP53* germline mutation (c.1010G > A, p.Arg337His) and preserved protein expression of MMR proteins in immunohistochemistry analyses.

Patient #16. Patient 16 was a female patient of 3.3 years who presented virilization associated with hypercortisolism at clinical admission. During the surgical procedure, the tumor capsule ruptured. After six months, disease recurrence was diagnosed and chemotherapy (etoposide, doxorubicin, and cisplatin plus mitotane) was prescribed. Although chemotherapy was administered, there was disease progression and a new surgical procedure was indicated (partial hepatectomy). Another chemotherapy cycle was prescribed, resulting in stabilized disease. The mitotane was withdrawn due to side effects and the patient is under recurrence surveillance. She has been followed for 8.07 years.

NGS data showed a missense variant in *MSH6* (c.2420A > G, p.Tyr807Cys) that has not been previously described as being associated with Lynch syndrome. However, it is a rare variant not present in the gnomAD bank (exome and genome), and computational predictions from DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, and SIFT ranked it as pathogenic; while MutationAssessor predicted it as benign.

Patient #21. NGS analysis found a missense variant in *MSH6* [c.359T > C, p.Ile120Thr (rs775971872)]. This variant is rare (gnomAD exome allele frequency less than 0.001) and is located in a mutational hot spot area with 6 described pathogenic variants. This variant has already been published and associated to LS [26,27].

Patient #35. Although there was no disease recurrence or metastasis, the patient had a fatal outcome due to surgical complications. NGS showed a missense variant in *MSH6* [c.643G > T, p.Val215Leu (rs145959653)]. In addition, this variant is not in the gnomAD exome or genome data sets, nine computational prediction sites considered it as benign (DANN, DEOGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, and SIFT), and only one site predicted it to be pathogenic (M-CAP). Additionally, the position was not conserved. This variant was considered as likely benign in the InSight variant database, although it was not classified in the MMR gene variant classification criteria. This germline variant has been reported in a patient with endometrial tumor; unfortunately, no detail of clinical evolution nor outcome was published [28].

2.3.3. Copy Number Variation

MLPA was performed to confirm the results of copy number variation given by CONTRA. MLPA specific to *MLH1/MSH2* showed normal copy numbers of these genes.

2.4. Family History of Lynch Syndrome-Associated Tumors

Five patients (#6, #9, #16, #21, and #33) were investigated in terms of their family history of Lynch syndrome-associated tumors, four of which presented family histories of tumors (#6: skin, breast, and mouth cancer, and leukemia; #16: breast and colorectal cancer; #21: breast cancer and adrenocortical carcinoma; and #33: prostate and breast cancer). However, only two patients (#6 and #16) had family histories with tumors associated to Lynch syndrome (skin cancer and colorectal carcinoma, respectively). At present, patient #9 did not identify any cases of tumors in their family. Unfortunately, we had no data regarding the family history of patient #35.

3. Discussion

DNA mismatch repair is a system which guarantees the post-replicative integrity of the genome [23]. Heterozygous mutations in one of the four genes involved in MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*) are the cause of Lynch syndrome, while biallelic mutations outline a more severe phenotype and are used to identify constitutional mismatch repair deficiency syndrome [23,29]. The MMR system detects and corrects spontaneous errors that occur during DNA replication [30]. If the function of the system is impaired, genes that regulate cell division can become inactivated, leading to failure to control cell growth and differentiation, which consequently stimulates tumorigenesis [31]. Germline mutations in MMR genes cause loss of function of the encoded protein, which results in microsatellite instability (MSI) and, thus, facilitates a hypermutated status [30]. The loss of MMR protein expression has led to the use of immunohistochemistry (IHC) to determine the levels of MMR proteins as markers for deeper issues. Aberrant MMR protein levels, similar to the presence of MSI, are considered as a sign that the MMR system is not functioning normally [23,30]. Although MSI and IHC are used as the first steps in LS screening, their clinical sensitivities are 69–85% and 83%, and clinical specificities are 90.2% and 88.8%, respectively [32].

As LS is a cancer predisposition syndrome, patients with LS present a lifetime risk of colorectal cancer between 30–70%, which is 5–12-fold higher than that in the general population [16,23,33,34]. Regarding endometrial cancer, the cumulative risk of LS patients by 70 years is between 32% and 42%;

this risk is 12–16-fold higher than that found in the general female population [22,31,35]. Patients with LS are at an increased risk for the developing colorectal and extracolonic cancers at an early age [22]. Although LS is rare, it is associated with significant morbidity and mortality [36].

This pediatric cohort with ACT was subjected to NGS and a complimentary workup to define the prevalence of alterations in *MMR* genes. This tested cohort was of particular interest, due to the high prevalence of *TP53* mutations, mainly the c.1010G > A, p.Arg337His mutation. Unfortunately, we could not apply the Amsterdam and Bethesda clinical criteria before genetic analyses, although we conducted familial genetic segregation in first-degree relatives. Pathogenic variants on the *MMR* genes were found in 8.57% (3/35) of our pediatric cohort (two were localized in *MLH1*, and one in *MSH6*) and VUS were found in 8.57% (3/35). All VUS were localized in the *MSH6* gene. Interestingly, 3464 variants have been described in *MSH6*, according to UniProt, ClinVar, Varsome, and Pubmed, 1916 of which are missense variants. In these missense variants, 1844 (96.24%) were classified as VUS, the frequency of which is considered high, when compared to other genes such as *TP53* and *CTNNB1*, which showed 66.98% and 22.72% missense variants as VUS, respectively. The International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors (InSiGHT) [37] has suggested a new scheme for the standardized classification of *MMR* variants, categorizing the variants into five classes of pathogenicity. Our six variants were classified with this InSiGHT scheme and only #6 (*MLH1*, c.1500_1502del, p.Ile501del) was found, which was categorized as Class 3/Uncertain. Class 3 variants present a probability of pathogenicity between 0.05–0.949, according to the InSiGHT multifactorial likelihood model. The #9, #16, #21, #33, and #35 variants were not registered in the InSiGHT *MMR* classification. Dominguez-Valentin et al. [38] reported the findings of the Prospective Lynch Syndrome Database, classifying the variants using the InSiGHT scheme, and proposed that LS should be considered as a generic term for a group of four clinically different inherited cancer risk syndromes. This new suggestion is due to the different results of cancer risk by gene, age, and gender of the class 4 and 5 *MMR* variants [38].

When we compared our data with that of a previous study with adult cohorts associated with LS-related cancers, we noticed an important prevalence of *MMR* variants in our ACT pediatric cohort. Adult colorectal cancer (CRC) cohorts show a prevalence of LS of approximately 3% [39,40], endometrial cancer cohorts demonstrate a LS prevalence of 2.1% [41], and ACC adult cohorts present a prevalence of 3.2% [25].

One point that should be considered is related to IHC. We presented three patients with *MMR* pathogenic variants that probably alter the encoded protein; however, the IHC analyses showed positive immunopositivity of all *MMR* proteins. In most cases, *MMR* pathogenic variants result in loss of protein expression in the tumor tissue. Nonetheless, there are cases where pathogenic variants negatively alter protein function but do not alter its immunogenicity, due to protein heterodimerization [41,42].

In our cohort, we demonstrated a high prevalence of *MMR* pathogenic variants in a cohort of patients who also presented *TP53* mutations. Nevertheless, we could not identify any difference in tumor behavior associated with the presence of variants in both genes. In LS patients with colorectal cancer, it was possible to identify that *TP53* variants modulated the age of development of CRC, with the age of tumor development being earlier in patients with *TP53* mutations than in LS patients who presented wild-type (WT) *TP53* [43]. In a breast cancer cohort, the association of *TP53* variants with *MSH* variants also impacted the age at diagnosis [44]. Young et al. studied the *in vivo* association between *MSH6* and *TP53* and their combined role in the suppression of tumorigenesis, cell survival, and genomic stability. They demonstrated that *TP53* and *MSH6* are functionally inter-related and that concomitant variants in both genes lead these tumor suppressors to act together to accelerate tumorigenesis [45].

Heath et al. reported no significant difference in the prevalence of childhood cancer in LS families, when compared to that of controls [46]. Although we showed positive data about the prevalence of *MMR* pathogenic variants in an ACT pediatric cohort, we cannot indicate or establish a recommendation for surveillance in this group. Further follow-up studies are necessary to prove whether *MMR* variant carriers who have already presented ACT are more likely to develop other

cancers at an early age. Whether the association of *MMR* variants with *TP53* variants could affect tumor behavior, in turn impacting clinical outcomes and the survival rate, also needs to be addressed. However, we do encourage patients with both mutations to be followed with surveillance, according to the U.S. Multi-Society task force guideline [22] and the modified Toronto protocol [47].

4. Materials and Methods

Thirty-six pediatric patients with adrenocortical tumor were included in this cohort. All patients underwent adrenalectomy due to ACT. Patients had been followed in a unique tertiary center, the Faculty of Medicine of the University of São Paulo. All patients or their legal responses who donated adrenocortical tumor tissue and underwent genetic analyses gave written informed consent for tissue, clinical data, and blood sample collection. The study was approved by the ethics committee (16.686/2017) of the University of São Paulo. Detailed clinical data, including clinical and hormonal presentations, treatments, follow-up data, and survival data, in addition to histopathological data, were collected for all patients.

4.1. Immunohistochemistry

4.1.1. Tissue Microarray (TMA) and Immunohistochemical Analysis of the TMA

Representative areas of 45 pediatric adrenocortical tumors from 45 different patients (viable tumor tissue without necrosis) were identified on hematoxylin and eosin-stained slides and marked on paraffin donor blocks. The spotted areas of donor blocks were punched (1.0 mm punch), and the cores were mounted into three paraffin blocks using a precision microarray instrument (Beecher Instruments, Sun Prairie, WI) with a total of 3 cores per patient/sample. One set of three slides was selected (one slide from each of the three TMA paraffin blocks of the triplicate) for staining with anti-MLH1, anti-PMS2, anti-MSH2, and anti-MSH6 ready-to-use Leica Biosystems antibodies (PA0610, PMS2-L-CE, PA0048, and PA0804, respectively). The reactions were carried out in an automated Leica Biosystems Bond-II machine (Leica Biosystems, Nussloch, Germany), which performed an automated modified immunoperoxidase immunohistochemical method with heat antigen retrieval.

TMA samples were included in the analysis only if at least one core with an internal nuclear positive control in either vessels or stromal cells was available after the staining procedure. Nuclear staining was evaluated as negative-deficient immunoexpression (no nuclear staining on neoplastic cells) or positive-preserved immunoexpression (nuclear staining present on neoplastic cells, regardless of percentage of positive cells) for the four antibodies.

4.1.2. Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Tumor Sections

Formalin-fixed and paraffin-embedded tumor sections were cut at 4 µm thickness and stained on a Ventana Bench Mark Ultra Autostainer (Ventana Medical System, Tucson, Arizona) with the following antibodies: MLH-1 (clone M1, Ventana), MSH2 (clone G219-1129, Ventana), MSH6 (clone SP93, Ventana), and PMS2 (A16-4, Ventana). Rabbit monoclonal primary antibodies and paraffin-embedded tissue sections were utilized for these assays. The specific antibodies were visualized using an OptiView DAB IHC Detection Kit (Cat. No. 760-700), followed by an OptiView Amplification Kit (Cat. No. 760-099). Nuclear staining was also evaluated as negative-deficient immunoexpression (no nuclear staining on neoplastic cells) or positive-preserved immunoexpression (nuclear staining present on neoplastic cells, regardless of percentage of positive cells) for the four antibodies.

4.2. Genetic Analysis

4.2.1. Panel Sequencing and Data Analysis

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the salting-out method from 36 patients. The genomic DNA was analyzed by the research assay HNPCC MASTR Plus (Agilent Technologies,

Santa Clara, CA) to identify single-nucleotide variants in four genes associated with Lynch syndrome (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*) and the 3' UTR of *EPCAM*, according to the manufacturer's instructions. The sequences were generated using the MiSeq platform (Illumina, San Diego, CA) running in paired-end mode. Reads were aligned to the GRCh37/hg19 assembly of the human genome with the Burrows–Wheeler (BWA-mem) aligner. Variant calling included single-nucleotide variants, small insertions, and deletions, and was performed using the Freebayes platform. The resulting data (in variant call format) were annotated with ANNOVAR. The median coverage of the target bases was 7139.12X, with 100% of the targets having bases with $\geq 10\times$ coverage.

The variants were screened for rare variants (minor allele frequency $<0.1\%$ in public and in-house databases) located in exonic regions and consensus splice site sequences. Subsequently, variant filtration prioritized their potential to be pathogenic: loss-of-function variants and variants predicted to be pathogenic by multiple in silico programs. The sequencing reads carrying candidate variants were inspected visually using the Integrative Genomics Viewer (Broad Institute, Cambridge, MA).

The databases gnomAD exome data, gnomAD genome data, and ClinVar, and computational prediction sites DANN, DEGEN2, EIGEN, FATHMM-MKL, M-CAP, MVP, MutationAssessor, MutationTaster, PrimateAI, REVEL, and SIFT were considered for classification of the variants. Additionally, the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (InSiGHT) variant database was also used, in order to characterize variants according to MMR classification (Classes 1–5).

Copy number variation analyses were performed using Copy Number Targeted Resequencing Analysis (CONTRA), a software which is able to call CNVs for a target region based on the normalized depth of coverage [48]. The variants were classified, according to the ACMG (American College Medical Genome) guidelines, by the Varsome platform [49].

4.2.2. Sanger Sequencing

Sanger sequencing was used to confirm the allelic variants found and for the segregation analysis. The region corresponding to the allelic variants in the *PMS2*, *MLH1*, and *MSH6* genes (GenBank accession numbers NM_000535.7, NM_001354630, and NM_000179, respectively) was amplified by polymerase chain reaction (PCR), followed by automatic sequencing of the products using the Sanger method. The PCR primers and conditions are available upon request.

Sanger sequencing was also used to confirm the allelic variants of the *TP53* gene.

4.2.3. MLPA

MLPA analysis was carried out using the commercial kits P008-C1 *PMS2* and P003-D1 *MLH1/MSH2* (MRC Holland), which are designed to detect exonic deletions/duplications across the coding regions of *PMS2*, *MLH1*, and *MSH2*. The assays were performed according to the manufacturer's instructions. In brief, genomic DNA (20 ng) was denatured and hybridized overnight with the MLPA probe mix. After ligation, PCR amplification was carried out with specific SALSA FAM PCR primers. Amplicons were run on an ABI3130XL genetic analyzer (Applied Biosystems) using the ROX size standard. The peak area for each fragment was measured with GeneMapper 5.0 (Applied Biosystems). The obtained dates were analyzed by Coffalyser.Net (MRC Holland).

5. Conclusions

MMR genes may play a role in pediatric adrenocortical tumorigenesis, as seen in adult cohorts. Whether the association with *TP53* variants can influence tumor behavior and promote early clinical presentation remains unclear. However, patients with both mutations must be followed, according to the U.S. Multi-Society Task Force guidelines and the modified Toronto protocol, and genetic counselling must be offered to the proband family.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2072-6694/12/3/621/s1>, Table S1: Pediatric cohort.

Author Contributions: Conceptualization, V.B.B. and M.C.B.V.F.; formal analysis, V.B.B.; funding acquisition, M.C.B.V.F.; investigation, V.B.B., L.M., M.Y.N., S.A.C.S. and I.C.S.; methodology, L.M., M.Y.N., M.F.d.A.F., A.d.M.N., L.C.C., S.A.C.S., M.C.N.Z., A.M.L., I.C.S. and M.C.B.V.F.; project administration, V.B.B., L.M. and M.C.B.V.F.; resources, L.M., M.Y.N., M.F.d.A.F. and I.C.S.; software, A.M.L.; supervision, M.C.B.V.F.; visualization, V.B.B. and L.M.; writing—original draft, V.B.B. and L.M.; writing—review and editing, V.B.B., L.M., A.M.F.L., B.M.M., M.Y.N., M.F.d.A.F., A.d.M.N., L.C.C., S.A.C.S., M.C.N.Z., F.T.D., A.C.L., B.B.M., M.Q.A., A.M.L., I.C.S. and M.C.B.V.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/26345-5).

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

References

1. Bilimoria, K.Y.; Shen, W.T.; Elaraj, D. Adrenocortical Carcinoma in the United States: Treatment utilization and prognostic factors. *Cancer* **2008**, *113*, 3130–3136. [\[CrossRef\]](#)
2. Dackiw, A.P.; Lee, J.E.; Gagel, R.F.; Evans, D.B. Adrenal cortical carcinoma. *World J. Surg.* **2001**, *25*, 914–926. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Kebebew, E.; Reiff, E.; Duh, Q.Y.; Clark, O.H.; McMillan, A. Extent of disease at presentation and outcome for adrenocortical carcinoma: Have we made progress? *World J. Surg.* **2006**, *30*, 872–878. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Fassnacht, M.; Dekkers, O.M.; Else, T. 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*, G1–G46. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Else, T.; Kim, A.C.; Sabolch, A. Adrenocortical Carcinoma. *Endocr. Rev.* **2014**, *35*, 282–326. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Sandrini, R.; Ribeiro, R.C.; DeLacerda, L. Childhood adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1997**, *82*, 2027–2031. [\[CrossRef\]](#)
7. Wajchenberg, B.L.; Albergaria Pereira, M.A.; Mendonca, B.B. Adrenocortical carcinoma-clinical and laboratory observations. *Cancer* **2000**, *88*, 711–736. [\[CrossRef\]](#)
8. Almeida, M.Q.; Fragoso, M.C.; Lotfi, C.F. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93*, 3524–3531. [\[CrossRef\]](#)
9. Pinto, E.M.; Billerbeck, A.E.; Villares, M.C.; Domenice, S.; Mendonca, B.B.; Latronico, A.C. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.* **2004**, *48*, 647–650. [\[CrossRef\]](#)
10. Latronico, A.C.; Pinto, E.M.; Domenice, S. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2001**, *86*, 4970–4973. [\[CrossRef\]](#)
11. Custodio, G.; Komechen, H.; Figueiredo, F.R.; Fachin, N.D.; Pianovski, M.A.; Figueiredo, B.C. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *351*, 44–51. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Ribeiro, R.C.; Sandrini, F.; Figueiredo, B. A inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 9330–9335. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Li, F.P.; Fraumeni, J.F., Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms. A familial syndrome? *Ann. Intern. Med.* **1969**, *71*, 747–752. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Fassnacht, M. Epidemiology of adrenocortical carcinoma. In *Adrenocortical Carcinoma*, 1st ed.; Hammer, G., Else, T., Eds.; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 23–29.
15. Lynch, H.T.; Shaw, M.W.; Magnuson, C.W.; Larsen, A.L.; Krush, A.J. Hereditary Factors In Cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* **1966**, *117*, 206–212. [\[CrossRef\]](#)
16. Vasen, H.F.A.; Watson, P.; Mecklin, J.P.; Lynch, H.T. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative Group n HNPCC. *Gastroenterology* **1999**, *116*, 1453–1456. [\[CrossRef\]](#)
17. Umar, A.; Boland, C.R.; Terdiman, J.P. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl. Cancer Inst.* **2004**, *96*, 261–268. [\[CrossRef\]](#)
18. Fishel, R.; Lescoe, M.K.; Rao, M.R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* **1993**, *75*, 1027–1038. [\[CrossRef\]](#)

19. Leach, F.S.; Nicolaides, N.C.; Papadopoulos, N. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* **1993**, *75*, 1215–1225. [\[CrossRef\]](#)
20. Papadopoulos, N.; Nicolaides, N.C.; Wei, Y.F. Mutation of a mutL homolog in hereditary colo cancer. *Science* **1994**, *263*, 1625–1629. [\[CrossRef\]](#)
21. Bronner, C.E.; Baker, S.M.; Morrison, P.T. Mutation in the DNA mismatch repair gene homolog hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* **1994**, *368*, 258–261. [\[CrossRef\]](#)
22. Giardiello, F.M.; Allen, J.I.; Axilbund, J.E. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: A consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology* **2014**, *147*, 502–526. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Lynch, H.T.; Snyder, C.L.; Shaw, T.G.; Heinen, C.D.; Hitchins, M.P. Milestones of Lynch syndrome: 1895–2015. *Nat. Rev. Cancer* **2015**, *15*, 181–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Kovacs, M.E.; Papp, J.; Szentirmay, Z.; Otto, S.; Olah, E. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum. Mutat.* **2009**, *30*, 197–203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Raymond, V.M.; Everett, J.N.; Furtado, L.V. Adrenocortical carcinoma is a Lynch syndrome-associated cancer. *J. Clin. Oncol.* **2013**, *31*, 3012–3018. [\[CrossRef\]](#)
26. Mandelker, D.; Dal Cin, P.; Jacene, H.A.; Armand, P.; Stone, R.M.; Lindeman, N.I. Refractory myeloid sarcoma with a FIP1L1-PDGFR α rearrangement detected by clinical high throughput somatic sequencing. *Exp. Hematol. Oncol.* **2015**, *4*, 30. [\[CrossRef\]](#)
27. Wielandt, A.M.; Zarate, A.J.; Hurtado, C. Lynch syndrome: Selection of families by microsatellite instability and immunohistochemistry. *Rev. Med. Chile* **2012**, *140*, 1132–1139. [\[CrossRef\]](#)
28. Le Gallo, M.; O'Hara, A.J.; Rudd, M.L. Exome sequencing of serous endometrial tumors identifies recurrent somatic mutations in chromatin-remodeling and ubiquitin ligase complex genes. *Nat. Genet.* **2012**, *44*, 1310–1315. [\[CrossRef\]](#)
29. Fishel, R. Mismatch Repair. *J. Biol. Chem.* **2015**, *290*, 26395–26403. [\[CrossRef\]](#)
30. Chang, L.; Chang, M.; Chang, H.M.; Chang, F. Microsatellite Instability: A Predictive Biomarker for Cancer Immunotherapy. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **2018**, *26*, e15–e21. [\[CrossRef\]](#)
31. Caron, O. Endometrial cancers and predisposition. *Bull. Cancer* **2012**, *99*, 99–105. [\[CrossRef\]](#)
32. Palomaki, G.E.; McClain, M.R.; Melillo, S.; Hampel, H.L.; Thibodeau, S.N. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet. Med.* **2009**, *11*, 42–65. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Boland, C.R.; Thibodeau, S.N.; Hamilton, S.R. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* **1998**, *58*, 5248–5257. [\[PubMed\]](#)
34. Vasen, H.F.; Mecklin, J.P.; Khan, P.M.; Lynch, H.T. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis. Colon Rectum* **1991**, *34*, 424–425. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Ries, L.A.G.; Melbert, D.; Krapcho, M.; Stinchcomb, D.G.; Howlander, N.; Horner, M.J.; Mariotto, A.; Miller, B.A.; Feuer, E.J.; Altekruse, S.F.; et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2005*; National Cancer Institute: Bethesda, MD, USA, 2008.
36. Huang, S.C.; Durno, C.A.; Erdman, S.H. Lynch syndrome: A pediatric perspective. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **2014**, *58*, 144–152. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Thompson, B.A.; Spurdle, A.B.; Plazzer, J.P. Application of a 5-tiered scheme for standardized classification of 2360 unique mismatch repair gene variants in the InSiGHT locus-specific database. *Nat. Genet.* **2014**, *46*, 107–115. [\[CrossRef\]](#)
38. Dominguez-Valentin, M.; Sampson, J.R.; Seppälä, T.T. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: Findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. *Genet. Med.* **2020**, *22*, 15–25. [\[CrossRef\]](#)
39. Vasen, H.F.; Boland, C.R. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* **2005**, *293*, 2028–2030. [\[CrossRef\]](#)
40. Moreira, L.; Balaguer, F.; Lindor, N. Identification of Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *JAMA* **2012**, *308*, 1555–1565. [\[CrossRef\]](#)

41. Dillon, J.L.; Gonzalez, J.L.; DeMars, L.; Bloch, K.J.; Tafe, L.J. Universal screening for Lynch syndrome in endometrial cancers: Frequency of germline mutations and identification of patients with Lynch-like syndrome. *Hum Pathol.* **2017**, *70*, 121–128. [\[CrossRef\]](#)
42. McCarthy, A.J.; Capo-Chichi, J.M.; Spence, T. Heterogenous loss of mismatch repair (MMR) protein expression: A challenge for immunohistochemical interpretation and microsatellite instability (MSI) evaluation. *J. Pathol. Clin. Res.* **2019**, *5*, 115–129. [\[CrossRef\]](#)
43. Jones, J.S.; Chi, X.; Gu, X.; Lynch, P.M.; Amos, C.I.; Frazier, M.L. p53 polymorphism and age of onset of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a Caucasian population. *Clin. Cancer Res.* **2004**, *10*, 5845–5849. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Smith, T.R.; Liu-Mares, W.; Van Emburgh, B.O. Genetic polymorphisms of multiple DNA repair pathways impact age at diagnosis and TP53 mutations in breast cancer. *Carcinogenesis* **2011**, *32*, 1354–1360. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Young, L.C.; Keuling, A.M.; Lai, R.; Nation, P.N.; Tron, V.A.; Andrew, S.E. The associated contributions of p53 and the DNA mismatch repair protein Msh6 to spontaneous tumorigenesis. *Carcinogenesis* **2007**, *28*, 2131–2138. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Heath, J.A.; Reece, J.C.; Buchanan, D.D. Childhood cancers in families with and without Lynch syndrome. *Fam. Cancer* **2015**, *14*, 545–551. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Kratz, C.P.; Achatz, M.I.; Brugieres, L. Cancer screening recommendations for individuals with Li-Fraumeni Syndrome. *Clin. Cancer Res.* **2017**, *23*, e38–e45. [\[CrossRef\]](#)
48. Li, J.; Lupat, R.; Amarasinghe, K.C. CONTRA: Copy number analysis for targeted resequencing. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1307–1313. [\[CrossRef\]](#)
49. Kopanos, C.; Tsiolkas, V.; Kouris, A. VarSome: The human genomic variant search engine. *Bioinformatics* **2019**, *35*, 1978–1980. [\[CrossRef\]](#)

© 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/>).

Anexo 6. Artigo publicado: “Pediatric adrenocortical tumor – review and management update”

Pediatric adrenocortical tumor – review and management update

Vania B. Brondani^a and Maria Candida B.V. Fragoso^{a,b}

Purpose of review

Adrenocortical tumor (ACT) is a rare disease with an annual worldwide incidence of 0.3–0.38/million children below 15 years old, and Brazilian population presents the highest incidence because of germline mutation in the *TP53*. Pediatric ACT is associated with virilizing features and hypercortisolism in most cases. Malignancy is defined when local invasion or metastasis is found, and it is associated with a poor prognosis. However, the correct and early diagnosis and treatment may impact on overall and disease-free survival.

Recent findings

A complete understanding of the disease and its singularities facilitates the assistance to the pediatric patient with ACT. The new insights about adrenal tumorigenesis have provided a better understanding of this disease. In this scenario, the era of molecular studies is leading to the refinement of the taxonomy, and it is offering the opportunity to discover new biomarkers and pathways of tumorigenesis, beyond the knowing β -catenin, Insulin-like growth factor-II/IGF-IR, and the p53/Rb signaling.

Summary

The rarity of this disease makes it a real challenge. Here, we present a review focusing on clinical practice. A methodic approach aiming to clarify the diagnosis and a follow-up are suggested to guide physicians in the assistance of pediatrics patients, improving the prognosis.

Keywords

adrenocortical tumors, disease management, pediatric tumor

INTRODUCTION

Adrenocortical tumors (ACTs) can occur rarely in children and adolescents. This pediatric adrenal disorder was first described in 1865 [1]. The American National Cancer Institute [2] considers the pediatric adrenocortical tumors (PACTs) a very rare neoplasia affecting approximately 0.2% of all childhood malignancies, and the majority is identified in the context of Li–Fraumeni syndrome (LFS) [2–7]. PACT has an annual worldwide incidence of 0.3–0.38/million children below the age of 15 years old. However, in southern Brazil, the frequency of PACTs ranges from 10 to 15 times more (per million children) than the worldwide occurrence [8,9]. This high frequency is because of a specific germline mutation at codon 337 (c.1010G>A, p.Arg337His) in the *TP53* gene [10–12]. Pinto *et al.* [11] and Garritano *et al.* [13] demonstrated the founder effect for p.Arg337His in the population of southern Brazil [11,13]. Interesting, there is high percentual of pediatric patients in the Brazilian cohort with ACT from the Hospital das Clínicas/Universidade de São Paulo

(HC/USP) which age ranging from 0 to 10 years old compared with European cohort to German registry [14] that presents only few patients with ACT in this decade of life.

There is a great variability in the literature regarding which age is considered pediatric or non-pediatric, ranging from 14 to 22 years in different countries [4,8,15–30]. However, the majority of patients are seen under five years old [8,17,18], with

^aUnidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo and ^bServiço de Endocrinologia da Clínica de Bases do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP), São Paulo, Brazil

Correspondence to Maria Candida B.V. Fragoso, PhD, MD, Unidade de Suprarrenal, Laboratório de Hormônios e Genética Molecular LIM/42, Serviço de Endocrinologia e Metabologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 155, São Paulo, Brazil. Tel: +55 11 2661 3358; e-mail: maria.fragoso@uol.com.br

Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes 2020, 27:177–186

DOI:10.1097/MED.0000000000000540

KEY POINTS

- ACT is a rare disease, although Brazil presents the highest worldwide incidence because of germline mutation on *TP53*.
- Virilizing syndrome or hypercortisolism in children under five years of age must indicate a methodic evaluation to exclude an ACT.
- Currently, the best option to treat ACT is surgical resection, although all the advances in medicine.
- The new era of molecular studies is bringing new insights into adrenal tumorigenesis, and it may facilitate the development of targeted therapies according to molecular data, improving the assistance for the patients.

a high frequency up to the third year of life [18,25,31]. Although it rarely occurs in the fetus or newborn [32], PACTs probably derive from the fetal zone of the adrenal gland, which justifies the early age of onset and hormonal secretion, causing virilization because of tumor androgen production [9,24,33,34].

According to the International Registry for PACTs, the female-male ratio varies widely with age. Females predominated in the age groups 0 to 3 years (ratio 1.7:1) and at least 13 years (ratio 6.2:1) [4,17,20,22,24,35]. In contrast to adults, PACTs with apparent poor prognosis based on histopathological features often have a good clinical outcome. In this review, we summarize the clinical and molecular data of PACTs.

MOLECULAR PATHWAYS OF TUMORIGENESIS AND PREDISPOSITION SYNDROMES

The most involved pathways in the adrenal tumorigenesis are β -catenin, Insulin-like growth factor (IGF)-II/IGF-IR, and p53/Rb signaling and the chromatin remodeling process [20,36–38]. Germline mutations associated with cancer predisposition syndrome contribute to childhood ACT, corresponding to approximately 50% of cases, whereas in the adult group, this rate is approximately 10% [21,33,39,40]. LFS [41] and Beckwith Wiedemann syndrome [42] are more related to PACT.

TP53 mutation may contribute to the cause of the majority of cases of ACT in children [43–46]. This high incidence suggests that normal p53 function is essential for the physiological process of postnatal fetal adrenal regression [20]. The diagnosis of ACT in a child is an indication to use genetic testing to search for *TP53* mutations, and posteriorly

in the parents [20,45]. Genetic counseling should be offered to the affected families with *TP53* mutations. An inherited *TP53* p.Arg337His mutation apparently confers a low penetrance for the development of adrenocortical tumors, and its presence was not related to unfavorable prognosis in children [12].

The IGF pathway contributes to normal cell growth and development. IGF-I functions almost exclusively postnatally, whereas IGF-II has a more prominent role during fetal development and a minimal role after birth [9]. The system IGF-II/IGF-IR participates in adrenal tumorigenesis. Almeida *et al.* [47] showed overexpression of the *IGF-IR* gene in pediatric ACT, and its expression was significantly correlated with malignant behavior in children.

De Sousa *et al.* [27] showed that *DAX1* genetic expression, a stem-cell fate regulator, was more frequent in pediatric ACTs than in adults and revealed a significant and positive correlation between *DAX1* and *SF1* expression, which suggests a role in adrenocortical tumorigenesis. Nevertheless, a prognostic value could not be associated in either children or adults [27].

The overexpression of the *FGFR4* gene was observed in pediatric and adult ACTs [48,49]. Brito *et al.* [29] reported an overexpression of *FGFR4*, with a positive correlation to *IGFII*, in PACTs and adrenocortical carcinoma (ACC). In the adult group, the overexpression was a predictor of poor outcome [29].

DeReynies *et al.* [50] identified three genes, *DLGAP5*, *BUB1B*, and *PINK1*, that, when their expression was combined, resulted in a strong association with outcomes in adult patients with ACTs [50]. *DLGAP5* and *BUB1B* are overexpressed in ACCs [28], whereas the *PINK1* gene, which is regulated by the *PTEN* gene, was found to be downregulated in ACTs [51]. Frago *et al.* [28] validated the prognostic value of the combined expression of *DLGAP5*, *BUB1B*, and *PINK1* in a Brazilian adult cohort of ACTs, and for pediatric patients, these molecular markers still lack sufficient discriminatory efficiency [28].

The new era of molecular studies has led to the refinement of the cancer taxonomy, and it has offered the opportunity for the discovery of new biomarkers and new pathways of tumorigenesis. In this scenario, three extensive studies [36–38] have provided a comprehensive view of the molecular changes in adrenal tumors using a pan-genomic approach. As a result of these studies, *ATRX* and *ZNF3* genes were associated with adrenal tumorigenesis for the first time. The *ATRX* gene is responsible for chromatin remodeling and the telomeric structure maintenance [52–54], and Pinto *et al.* [38] reported that PACTs with germline *TP53* and

somatic *ATRX* mutations were associated with high tumor weight, advanced disease and poor event-free survival [38]. The *ZNRF3* gene acts as a suppressor gene of the β -catenin pathway [55–57], and no prognostic value was determined in PACTs or ACC cohorts.

Parise *et al.* [58**] studied the prognostic role of CD8⁺ T lymphocytes in PACTs and reported an association between infiltrated CD8⁺ cells and a better prognosis [58**]. This study contributes to our scant knowledge of the immune response in ACTs, although functional analyses are necessary to clarify some mechanisms aiming to provide future targeted therapies.

CLINICAL PRESENTATION

Patients with PACTs usually present isolated androgen secretion by the tumor, in 40% of cases, and present with virilizing features characterized by linear growth acceleration, advanced bone age, pubic hair, hirsutism, acne, deepening voice, muscle hypertrophy, clitoromegaly or increase in penis size [8,9,15,17,21,23,24,45,59]. This peripheral precocious puberty could also lead to central precocious puberty (CPP), depending on hypothalamic time androgens exposition. In addition, gonadotropin-dependent pubertal disorders, such as CPP and early fast puberty have been reported in pediatric patients with ACTs [30]. The mixed secretion of androgen and glucocorticoids in PACTs ranges between 25 and 50% of cases, and rarely, they present isolated hypercortisolism and much more infrequent, isolated hyperaldosteronism or estrogen secretion [8,9,15,17,24,45,59]. Approximately, one-third of patients present with arterial hypertension, which is usually caused by glucocorticoid excess production [45] (Fig. 1).

This hormonal secretion pattern contrasts with the adolescents and adult group, which shows a higher frequency of isolated hypercortisolism, followed by combined secretion of glucocorticoid and androgens, and the minority of cases releasing isolated androgen [8,9,15,17,60**].

In addition, cases with feminization or no clinical evidence of hormonal production at presentation correspond to less than 10% of patients [17,24]. Data from the International Pediatric ACT Registry show that most patients [75.5% (192 of out 254 patients)] present with localized disease, and metastatic disease was found at diagnosis in less than 5% of cases [45].

DIAGNOSIS

All patients below five years of age presenting virilization must be evaluated for ACT, because of its

known peak of incidence. Based on the evaluation proposed by European network for the study of Adrenal Tumours [60**] for adult patients who are suspected of having ACC, we encourage an adapted systematic approach to the pediatric population suspected of presenting ACT (Table 1).

The hormonal secretion of the adrenal cortex should be tested, and when positive, it is useful as a surveillance parameter during the follow-up. The plasma hormones return to normal on the day after surgery, as a microscopically complete resection (R0) has been performed. A new increase in hormone tests is indicative of recurrence. ACTs usually present defective steroidogenesis with an increase in releasing hormonal precursors, with abnormal function, because of a dedifferentiated and thus incomplete pattern of steroidogenic enzyme expression [66,67]. Arlt *et al.* [67] reported the urinary steroid profiling (USP) as a diagnostic tool to distinct adrenocortical adenomas from ACC, and 11-deoxycortisol metabolite tetrahydro-11-deoxycortisol (THS) was the most discriminative steroid in the differentiation [67]. Chortis *et al.* [68*] also demonstrated the importance of USP and THS as diagnostic tool for recurrence detection in patients with microscopically complete (R0) resection of ACC [68*]. For this reason, hormone precursors should also be evaluated. In addition to adrenal hormones, the gonadal axis should be tested because of the possibility of the development of precocious central puberty triggered by adrenal hormones. Bone age should also be documented with an X-ray. Sandrini *et al.* [8] showed an advanced bone age of more than one year in 68% of their cohort.

All patients should undergo an abdominal imaging study focusing on the adrenal gland [computed tomography (CT) or MRI]. CT and MRI are equally efficient in establishing diagnoses of adrenal tumors [69,70], although MRI has been considered advantageous because of the absence of ionizing radiation [71] (Fig. 2). Frequently, imaging studies cannot define the benignity of the lesion, and only the presence of metastases determines the malignancy [72]. However, the image is particularly useful to the surgeon before surgery [45].

The liver and lungs are the most frequent sites of metastasis, whereas the skeleton and central nervous system have been involved in a few cases [45]. The abdominal image shows the tumor structure and evaluates the local extension and invasion, and it can assess the possibility of metastatic disease in the liver. CT scans of the thorax are indicated for all patients aiming to diagnose lung metastasis earlier and are recommended for all newly diagnosed patients [45]. Other imaging studies, such as MRI of brain and bone scintigraphy, are required only under suspected metastasis. The patient must

FIGURE 1. Clinical presentations of PACT. (a) Virilizing syndrome – female patient (9 months of age) with pubic hair and clitoromegaly (2.7 cm) due to androgen-producing PACT; (b) female patient (2.6 years of age) with virilizing syndrome and central precocious puberty (acne and thelarche) due to long time tumor androgens exposition; (c) feminization syndrome (gynecomastia) in male patient (5 years of age) with heterosexual peripheral precocious puberty due to estrogen and androgen-producing PACT; (d) severe Cushing's syndrome – obesity and moon face due to cortisol-producing PACT; (e) Cushing's syndrome – moon face and acne in male patient with eight years of age; (f) isosexual peripheral precocious puberty – pubic hair and penis enlargement due to PACT in male patient with six years of age. The parents gave written authorization for the publication of these images.

undergo brain MRI if *TP53* mutation is confirmed, because of the possibility of LFS related brain tumor.

Follow-up with cautious surveillance must be performed by a responsible assistant (Table 2), focusing on tumoral markers and imaging studies (CT or MRI). Patients with *TP53* mutation should be followed with the modified Toronto protocol [73,74], which is associated with early tumor detection and with improved long-term survival in LFS patients.

The diagnosis is often delayed for approximately five months [17]. Nevertheless, it is crucial to ensure the earlier and methodic diagnosis workup and planning of the surgical procedure, as complete tumor resection remains the cornerstone of treatment and offers the best chance of cure [75].

STAGING

When histopathological analyses confirm ACTs, it is necessary to stage the patient and determine the prognosis and plan surveillance. The classic Weiss criteria, proposed in 1984, are the most commonly used histologic criteria for the diagnosis of ACC in adult patients. The Weiss score is based on nine histologic parameters (nuclear grade, mitotic rate, atypical mitosis, clear cells, diffuse pattern, necrosis, venous, sinusoidal and capsular invasion), and ACC is diagnosed when three items are present [76]. The mitotic rate and atypical mitosis are related to worse tumor behavior [77]. Interestingly, based only on histologic parameters, the correlation of PACT and prognosis is not reached. In contrast to the adult

Table 1. Diagnostic work-up of PACT		
Hormonal and laboratory evaluation	Clinical presentation	Observations
Virilizing syndrome		
DHEA-S		
Androstenedione		
Testosterone		
17-β-Estradiol		
17-OH-progesterone		
11-deoxycortisol		
Cushing's syndrome		
Basal plasmatic ACTH		
Dexamethasone suppression test overnight	20 µg/kg weight below 40 kg; 1 mg dexamethasone if >40 kg	
Urinary free cortisol in 24 h (if feasible)	3 consecutive collections (correct for body surface area)	
Late-night salivary cortisol		
Serum cortisol levels (if feasible)		
Hyperaldosteronism		
Aldosterone, renin, and potassium	If severe arterial hypertension and/or hypokalemia is present	
To exclude pheochromocytoma		
Free plasma-metanephrines	In cases with heterogeneous adrenal lesion and without evidence of virilizing and Cushing's syndrome	
Central precocious puberty		
LH	Complement to gonadal axis evaluation	
Imaging studies		
Abdominal MRI		
Thorax CT		
Brain MRI (if TP53 mutation present)		

CT, computed tomography. Ref. [60^{III},61–65].

FIGURE 2. Abdominal MRI of PACT. PACT in male patient (5 years of age) with heterosexual peripheral precocious puberty. Abdomen MRI shows a solid nodular lesion in the right adrenal gland, measuring 4.2 × 3.8 cm, with low signal intensity in T1-weighted image (a), and high signal intensity in T2-weighted image (b).

Adrenal cortex and medulla

Table 2. PACT surveillance scheme

After surgical resection	Frequency	Description
First year	Every three months	Hormonal laboratory tests Imaging studies (thorax CT and abdomen MRI)
Second year	Every four months	
Third year	Every six months	
Fourth and fifth years	Once a year	
Sixth year and after	Once a year	Hormonal laboratory tests
Bone age should be seen once a year before puberty, during puberty every semester until epiphyseal closure.		
If metastasis is suspected a cautious evaluation must be done.		

group, the pediatric patients with unfavorable histologic presentation show a favorable evolution, without disease recurrence in 69% of cases [78,79]. Faria *et al.* [33] showed that a Weiss score at least 3 was not a good predictor of survival in children, whereas it was much more discriminative in adults. The definitive malignancy criteria for the pediatric group are the invasion of tissues or adjacent organs or the presence of metastasis, whereas the Weiss criteria are not recommended to define pediatric adrenocortical adenomas and carcinomas [33].

The staging system widely used is that proposed by MacFarlane [80] and modified by Sullivan *et al.* [81] (Table 3). This classification presents four stages and is based on tumor size, local invasion, the involvement of adjacent organs or regional lymph nodes, and the presence of metastasis. Stages 1 and 2 present with a tumor confined to the adrenal gland, without local invasion or metastasis. Both stages are related to the best cure rates when surgical resection is performed [81].

Sandrini *et al.* [8] proposed a disease staging system that was modified by Michalkiewicz *et al.* [17]. This staging system considers surgical resection, tumor volume, laboratory tests after the surgical procedure, and the presence of metastasis. This scheme distinguishes two groups – those with completely excised tumors less than 200 cm³ (stage I) and those with distant metastasis (stage IV) – with different outcomes. However, the intermediate groups, stages II and III, are heterogeneous and are likely to include different prognostic categories.

Michalkiewicz *et al.* [17] showed that patients with complete resection of tumors weighing 200 g or less presented an excellent prognosis; in addition, patients with either microscopic or gross residual disease presented a poor prognosis [17,82]. In 2012, this staging system was improved by Ribeiro *et al.* [35], and the postoperative status of hormone levels was included in the classification (Table 4).

Wieneke *et al.* [79] proposed a new score for the diagnosis of malignancy in PACT through evaluation a set of nine items (tumor weight and size, invasion to perirenal tissues or adjacent organs, vena cava, venous invasion, capsular invasion, necrosis, mitotic index, and the presence of atypical mitoses) (Table 5). According to the score acquired, it is possible to classify ACT as having benign, intermediate, and malignant behavior.

Beyond these classifications, different published cohorts reported that the presence of metastasis at diagnosis [24,25,83] mitotic index, necrosis, atypical mitoses, nuclear grade [17,84], tumor size [25,85], Ki67-labeling index at least 15% [23] and glucocorticoid-producing tumors [17,22,45,79] were associated with poor prognosis. In contrast, age younger than four years [17,25,86], pure virilizing clinical presentation [17,22,45,79], localized disease, absence of spillage during surgery, and tumor weight less than 200 g [17,45] were associated with a better probability of disease-free survival.

Children with ACT are living longer, probably because of better resection techniques that do not rupture the capsule. This scenario is different from the beginning when fatal outcomes were because of

Table 3. Staging of PACT – MacFarlane and Sullivan [80,81]

Stage	Size	Nodes and invasion	Metastases
I	Small tumors (≤ 5 cm)	No nodes or local invasion	No distant metastases
II	Large tumors (> 5 cm)	No nodes or local invasion	No distant metastases
III	Any size	Nodes or local invasion	No distant metastases
IV	Any size	Nodes and local invasion	Distant metastases

Table 4. Staging of ACT in children – Sandrini, Michalkiewicz, and Ribeiro [8,17,35]

Stage	Description
I	Tumor completely resected Small tumors* Normal postoperative hormone levels
II	Tumor completely resected Large tumors* Normal postoperative hormone levels
III	Presence of microscopic or gross tumor after surgical resection Inoperable tumor Tumor spillage Patients with Stage I and II tumors and abnormal postoperative hormone levels Patients with retroperitoneal lymph node involvement
IV	Presence of distant metastases

*Small tumors: less than 100 g and less than 200 cm³; large tumors: at least 100 g or at least 200 cm³.

carcinomatosis or local recurrence [87]. Most patients have a localized or regional disease at the time of diagnosis [45]. The overall survival rate at five years varies 46–54.7% from different cohorts [15,17,20,24]. Metastasis may be observed in 5–81% [15,17,24–26,45] and usually affects the lungs, liver, regional lymph nodes, kidneys, and bone [9,17,22,24,26,45,83,87].

TREATMENT

Surgical treatment is still considered the best option for PACT patients, impacting on overall and disease-free survival. Complete resection is mandatory even if it requires the removal of adjacent structures [88]. This approach aims to avoid local recurrence and improve the outcome. If PACT is localized, with no sign of invasion, the laparoscopic approach is reasonable by an experienced

surgeon. The paraaortic and paracaval regions should be examined, and if lymph nodes are favorable for metastatic disease, they should also be excised [88]. The vena cava should also be palpated before resection. If extensive tumor thrombus is present, a combined thoracic and abdominal approach may be required [9]. In the case of large and locally invasive tumors, an *en bloc* resection may be necessary, which includes the removal of adjacent structures [45,60**].

ACT is a friable tumor, and manipulation during the procedure could result in tumor rupture and spillage, which impact the outcome [8,17,45,79]. Teinturier *et al.* showed a survival rate of 70% when surgical resection was microscopically complete and 7% when it was not [15]. Therefore, an experienced surgeon is required, and at surgery, all ACTs should be considered malignant tumors [89]. If local recurrence or metastatic disease occurs, a new surgery should be offered, if possible, and then pharmacological treatment should be prescribed, aiming for a better prognosis. This approach differs from the adult group. The recurrence rate in adults varies from 60 to 70%, even with complete tumor resection, and pharmacological treatment is prescribed earlier, aiming to reduce tumor recurrence and increase recurrence-free and overall survival [90,91*].

As a rare disease, there is a lack of data, and there are few studies [17,23,25,26,35,86,92] in pediatric cohorts focusing on pharmacological treatment and metastatic disease. It is clear that compared with adult patients, pediatric patients show a better prognosis, but systemic chemotherapy and mitotane may have a role in patients with malign behavior PACT [92]. Redlich *et al.* [26] suggest that neoadjuvant therapy should be considered for patients with primarily incomplete resectable or inoperable tumors, and when tumor spillage occurs during the surgical procedure, it is an indication for adjuvant chemotherapy and mitotane [26].

Mitotane (o,p'DDD) is the only drug approved for the treatment of ACC [90]. It inhibits steroidogenesis and presents antiproliferative and direct adrenolytic functions, leading to apoptosis of the fasciculated and reticular zones of the adrenal cortex [92–94]. The adjuvant use of mitotane was associated with an important decrease in tumor recurrence and with better overall and disease-free survival in adults [14,90]. Institutional reports and results of adult studies [60**,90,94,95] justify the use of mitotane in treating pediatric patients with malign behavior PACT [26] however, mitotane is not fully recommended to pediatric patients with ACT with R0 tumor resection. Redlich *et al.* [26]

Table 5. Wienieke criteria for malignancy of PACT [79]

Criteria for malignancy of PACT
Tumor weight of >400 g
Tumor size >10.5 cm
Extension into perirenal soft tissues and/or adjacent organs
Invasion into vena cava
Venous invasion
Capsular invasion
Presence of tumor necrosis
>15 mitoses per 20 high-power field (400×)
Presence of atypical mitotic figures

reported an association between pediatric outcomes and mitotane plasma level (>14 mg/l) as well as the duration of mitotane treatment (>6 months), resulting in a better overall survival. Patients receiving mitotane should be considered to have adrenal insufficiency, and hormonal replacement with hydrocortisone and fludrocortisone must be prescribed [9,92]. It is necessary to maintain surveillance related to hydrocortisone dosage because mitotane alters its bioavailability, and greater doses may be required [96]. Dexamethasone is not recommended as the first option because of its negative impact on growth and metabolism. Thyroid function should also be evaluated because of the possibility of hypothyroidism associated with mitotane, as seen in the adult group and in some reported cases in pediatric patients [97].

Combined chemotherapy and surgical resections of recurrent disease are associated with prolonged survival [45]. All pediatric patients who need chemotherapy should be treated in pediatric tertiary centers according to a consistent protocol in a highly interdisciplinary setting [26].

Radiotherapy is not an option because many children with ACT carry germline *TP53* pathogenic allelic variants, which predispose them to cancer, and radiation may increase the incidence of secondary tumors [9].

CONCLUSION

The rarity of PACT turns it a real challenge. Over recent years, the large-scale pangenomic analyses have increased our understanding of the genetic and epigenetic changes underlying PACT pathogenesis. New signaling pathways and biomarkers have been discovered and have changed neoplasm taxonomy. An international effort to combine molecular and data resources may facilitate the studies with larger PACT cohorts. It is expected that with these results, hopefully, new targeted therapies could be prescribed according to molecular data, improving the assistance for the patient and providing personalized treatment.

Acknowledgements

None.

Financial support and sponsorship

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2017/26345-5).

Conflicts of interest

There are no conflicts of interest.

REFERENCES AND RECOMMENDED READING

Papers of particular interest, published within the annual period of review, have been highlighted as:

- of special interest
- of outstanding interest

1. Ogle JW. Unusually large mass of carcinomatous deposit in one of the suprarenal capsules of a child. *Trans Pathol Soc Lond* 1885; 16:250.
2. Ries LA, Melbert D, Krapcho M, *et al*, editors. SEER cancer statistics review, 1975-2005. Bethesda, MD: National Cancer Institute; 2008. ; https://seer.cancer.gov/csr/1975_2005/, based on November 2007 SEER data submission, posted to the SEER web site.
3. Young JL Jr, Ries LG, Silverberg E, *et al*. Cancer incidence, survival, and mortality for children younger than age 15 years. *Cancer* 1986; 58(2 Suppl):598–602.
4. Stiller CA. International variations in the incidence of childhood carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1994; 3:305–310.
5. Miller RW, Young JL Jr, Novakovic B. Childhood cancer. *Cancer* 1995; 75(1 Suppl):395–405.
6. Custódio G, Komechen H, Figueiredo FR, *et al*. Molecular epidemiology of adrenocortical tumors in southern Brazil. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351:44–51.
7. Bernstein L, Gurney JG. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG, *et al*, editors. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program. Bethesda, MD: National Cancer Institute, SEER Program; 1999pp. 139–147.
8. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82:2027–2031.
9. Rodríguez-Galindo C, Figueiredo BC, Zambetti GP, Ribeiro RC. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. *Pediatr Blood Cancer* 2005; 45:265–273.
10. Ribeiro RC, Sandrini R, Figueiredo B, *et al*. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:9330–9335.
11. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, *et al*. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48:647–650.
12. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, *et al*. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86:4970–4973.
13. Gamitano S, Gemignani F, Palmero EI, *et al*. Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. *Hum Mutat* 2010; 31:143–150.
14. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2009; 23:273–289.
15. Teinturier C, Pauchard MS, Brugières L, *et al*. Clinical and prognostic aspects of adrenocortical neoplasms in childhood. *Med Pediatr Oncol* 1999; 32:106–111.
16. Parlowsky T, Bucsky P, Hof M, Kaatsch P. Malignant endocrine tumours in childhood and adolescence—results of a retrospective analysis. *Klin Padiatr* 1996; 208:205–209.
17. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, *et al*. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol* 2004; 22:838–845.
18. Teinturier C, Brugières L, Lemerle J, *et al*. Corticosurrénalomes de l'enfant: analyse rétrospective de 54 cas [Adrenocortical carcinoma in children: retrospective study of 54 cases]. *Arch Pediatr* 1996; 3:235–240.
19. Daneman A, Chan HS, Martin J. Adrenal carcinoma and adenoma in children: a review of 17 patients. *Pediatr Radiol* 1983; 13:11–18.
20. Lalli E, Figueiredo BC. Pediatric adrenocortical tumors: what they can tell us on adrenal development and comparison with adult adrenal tumors. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2015; 6:23.
21. Ribeiro RC, Michalkiewicz EL, Figueiredo BC, *et al*. Adrenocortical tumors in children. *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:1225–1234.
22. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, *et al*. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000; 88:711–736.
23. Pinto EM, Rodríguez-Galindo C, Pounds SB, *et al*. Identification of clinical and biologic correlates associated with outcome in children with adrenocortical tumors without germline TP53 mutations: a St Jude Adrenocortical Tumor Registry and Children's Oncology Group Study. *J Clin Oncol* 2017; 35:3956–3963.
24. Gupta N, Rivera M, Novotny P, *et al*. Adrenocortical carcinoma in children: a clinicopathological analysis of 41 patients at the mayo clinic from 1950 to 2017. *Horm Res Paediatr* 2018; 90:8–18.
25. Gulack BC, Rialon KL, Englum BR, *et al*. Factors associated with survival in pediatric adrenocortical carcinoma: an analysis of the National Cancer Data Base (NCDB). *J Pediatr Surg* 2016; 51:172–177.

26. Redlich A, Boxberger N, Strugala D, *et al*. Systemic treatment of adrenocortical carcinoma in children: data from the German GPOH-MET 97 trial. *Klin Padiatr* 2012; 224:366–371.
27. de Sousa GR, Soares IC, Faria AM, *et al*. DAX1 overexpression in pediatric adrenocortical tumors: a synergic role with SF1 in tumorigenesis. *Horm Metab Res* 2015; 47:656–661.
28. Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzucco 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* 2012; 166:61–67.
29. Brito LP, Ribeiro TC, Almeida MQ, *et al*. The role of fibroblast growth factor receptor 4 overexpression and gene amplification as prognostic markers in pediatric and adult adrenocortical tumors. *Endocr Relat Cancer* 2012; 19:L11–L13.
30. Stecchini MF, Braid Z, More CB, *et al*. Gonadotropin-dependent pubertal disorders are common in patients with virilizing adrenocortical tumors in childhood. *Endocr Connect* 2019; 8:579–589.
31. Ribeiro RC, Sandrini Neto RS, Schell MJ, *et al*. Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. *J Clin Oncol* 1990; 8:67–74.
32. Isaacs H Jr. Fetal and newborn adrenocortical tumors. *Fetal Padiatr Pathol* 2010; 29:99–107.
33. Faria AM, Almeida MQ. Differences in the molecular mechanisms of adrenocortical tumorigenesis between children and adults. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351:52–57.
34. Ishimoto H, Jaffe RB. Development and function of the human fetal adrenal cortex: a key component in the feto-placental unit. *Endocr Rev* 2011; 32:317–355.
35. Ribeiro RC, Pinto EM, Zambetti GP, Rodriguez-Galindo C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351:37–43.
36. Assié G, Letouzé E, Fassnacht M, *et al*. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* 2014; 46:607–612.
37. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, *et al*. Comprehensive pan-genomic characterization of adrenocortical carcinoma [published correction appears in *Cancer Cell* 2016 Aug 8;30(2):363]. *Cancer Cell* 2016; 29:723–736.
38. Pinto EM, Chen X, Easton J, *et al*. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat Commun* 2015; 6:6302.
39. Else T. Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 351:66–70.
40. Else T, Kim AC, Sabolch A, *et al*. Adrenocortical carcinoma. *Endocr Rev* 2014; 35:282–326.
41. Li FP, Fraumeni JF Jr. Soft-tissue sarcomas, breast cancer, and other neoplasms: a familial syndrome? *Ann Intern Med* 1969; 71:747–752.
42. Kossel AL, Hermann J, Opitz JM. The Wiedemann-Beckwith syndrome: genetic considerations and a diagnostic sign. *Lancet* 1972; 1:844.
43. Wagner J, Leclerc JM, Malkin D, Narod S. Incidence of cancer in relatives of children with adrenocortical carcinoma. *Am J Hum Genet* 1993; 53:1534.
44. Varley JM, McGown G, Thomcroft M, *et al*. Are there low-penetrance TP53 alleles? Evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 1999; 65:995–1006.
45. Ribeiro RC, Figueiredo B. Childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer* 2004; 40:1117–1126.
46. Wagner J, Portwine C, Rabin K, *et al*. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1994; 86:1707–1710.
47. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, *et al*. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2008; 93:3524–3531.
48. Laurell C, Velázquez-Fernández D, Lindsten K, *et al*. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol* 2009; 161:141–152.
49. de Fraipont F, El Atifi M, Chemadi N, *et al*. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90:1819–1829.
50. de Reyniès A, Assié 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; 27:1108–1115.
51. Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene* 2001; 20:4457–4465.
52. Clynes D, Higgs DR, Gibbons RJ. The chromatin remodeller ATRX: a repeat offender in human disease. *Trends Biochem Sci* 2013; 38:461–466.
53. Watson LA, Goldberg H, Bérubé NG. Emerging roles of ATRX in cancer. *Epigenomics* 2015; 7:1365–1378.
54. Clynes D, Gibbons RJ. ATRX and the replication of structured DNA. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23:289–294.
55. Failot S, Assié G. Endocrine tumours: the genomics of adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2016; 174:R249–R265.
56. Espiard S, Bertherat J. The genetics of adrenocortical tumors. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2015; 44:311–334.
57. Fearon ER, Spence JR. Cancer biology: a new RING to Wnt signaling. *Curr Biol* 2012; 22:R849–R851.
58. Parise IZ, Parise GA, Noronha L, *et al*. The prognostic role of CD8⁺ T lymphocytes in childhood adrenocortical carcinomas compared to Ki-67, PD-1, PD-L1, and the Weiss Score. *Cancers (Basel)* 2019; 11:1730.
- Prognostic factors and biomarkers were studied in a Brazilian cohort of 48 primary adrenocortical carcinomas from children.
59. Mayer SK, Oligny LL, Deal C, *et al*. Childhood adrenocortical tumors: case series and reevaluation of prognosis: a 24-year experience. *J Padiatr Surg* 1997; 32:911–915.
60. Fassnacht M, Dekkers OM, 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:G1–G46.
- An update guideline on the management of adrenocortical carcinoma in adult patients.
61. Batista DL, Riar J, Keil M, Stratakis CA. Diagnostic tests for children who are referred for the investigation of Cushing syndrome. *Pediatrics* 2007; 120:e575–e586.
62. Lodish MB, Keil MF, Stratakis CA. Cushing's syndrome in pediatrics: an update. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2018; 47:451–462.
63. Funder JW, Carey RM, Mantero F, *et al*. The management of primary aldosteronism: case detection, diagnosis, and treatment: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2016; 101:1889–1916.
64. Lenders JW, Duh QY, Eisenhofer G, *et al*. Pheochromocytoma and paraganglioma: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2014; 99:1915–1942.
65. Latronico AC, Brito VN, Carel JC. Causes, diagnosis, and treatment of central precocious puberty. *Lancet Diabetes Endocrinol* 2016; 4:265–274.
66. Lutton JP, Cerdas S, Billaud L, *et al*. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med* 1990; 322:1195–1201.
67. Art W, Biehl M, Taylor AE, *et al*. Urine steroid metabolomics as a biomarker tool for detecting malignancy in adrenal tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2011; 96:3775–3784.
68. Chortis V. The role of steroid metabolome analysis for the diagnosis and follow-up of adrenocortical tumors. *Minerva Endocrinol* 2019; 44:19–24.
- This study shows the steroid metabolome analysis as a new tool for follow-up of adrenocortical tumors.
69. Ilias I, Sahdev A, Reznick RH, *et al*. The optimal imaging of adrenal tumours: a comparison of different methods. *Endocr Relat Cancer* 2007; 14:587–599.
70. Fassnacht M, Kenn W, Allolio B. Adrenal tumors: how to establish malignancy? *J Endocrinol Invest* 2004; 27:387–399.
71. Hanson JA, Weber A, Reznick RH, *et al*. Magnetic resonance imaging of adrenocortical adenomas in childhood: correlation with computed tomography and ultrasound. *Pediatr Radiol* 1996; 26:794–799.
72. Godine LB, Berdon WE, Brasch RC, Leonidas JC. Adrenocortical carcinoma with extension into inferior vena cava and right atrium: report of 3 cases in children. *Pediatr Radiol* 1990; 20:166–169.
73. Kratz CP, Achatz M, Brugières L, *et al*. Cancer screening recommendations for individuals with Li-Fraumeni syndrome. *Clin Cancer Res* 2017; 23:e38–e45.
74. Villani A, Shore A, Wasserman JD, *et al*. Biochemical and imaging surveillance in germline TP53 mutation carriers with Li-Fraumeni syndrome: 11-year follow-up of a prospective observational study. *Lancet Oncol* 2016; 17:1295–1305.
75. Krzníček C, Petric G, Jereb B. Complete response of metastatic adrenal cortical carcinoma to o,p'-DDD in a child. *Pediatr Hematol Oncol* 1988; 5:65–69.
76. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984; 8:163–169.
77. Assié G, Jouinot A, Bertherat J. The 'omics' of adrenocortical tumors for personalized medicine. *Nat Rev Endocrinol* 2014; 10:215–228.
78. Mendonça BB, Lucon AM, Menezes CA, *et al*. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995; 154:2004–2009.
79. Wieneke JA, Thompson LD, Hefless CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:867–881.
80. MacFarlane DA. Cancer of the adrenal cortex: the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl* 1958; 23:155–186.
81. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 1978; 120:660–665.
82. Ribeiro RC, Sandrini R. Adrenocortical carcinoma in children: clinical aspects and prognosis. *J Padiatr Surg* 1994; 29:122.
83. Knöpfle G, Födisch HJ, Holschneider A, *et al*. Das Nebennierenrinden-Karzinom im Kindes- und Jugendalter [Adrenal cortex carcinoma in childhood and adolescence]. *Klin Padiatr* 1986; 198:250–256.
84. Bugg MF, Ribeiro RC, Roberson PK, *et al*. Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. *Am J Clin Pathol* 1994; 101:625–629.
85. Michalkiewicz EL, Sandrini R, Bugg MF, *et al*. Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. *Med Padiatr Oncol* 1997; 28:175–178.
86. Dall'Igna P, Virgione C, De Salvo GL, *et al*. Adrenocortical tumors in Italian children: analysis of clinical characteristics and P53 status: data from the national registries. *J Padiatr Surg* 2014; 49:1367–1371.

Adrenal cortex and medulla

87. Driver CP, Birch J, Gough DC, Bruce J. Adrenal cortical tumors in childhood. *Pediatr Hematol Oncol* 1998; 15:527–532.
88. Rescorla FJ. Malignant adrenal tumors. *Semin Pediatr Surg* 2006; 15:48–56.
89. Zaitoon MM, Mackie GG. Adrenal cortical tumors in children. *Urology* 1978; 12:645–649.
90. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, *et al.* Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* 2007; 356:2372–2380.
91. Jasim S, Habra MA. Management of adrenocortical carcinoma. *Curr Oncol Rep* 2019; 21:20.
This review summarized the current knowledge regarding the clinical management of adrenocortical carcinoma.
92. Zancanella P, Pianovski MA, Oliveira BH, *et al.* Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. *J Pediatr Hematol Oncol* 2006; 28:513–524.
93. Maiter D, Bex M, Vroonen L, *et al.* Efficacy and safety of mitotane in the treatment of adrenocortical carcinoma: a retrospective study in 34 Belgian patients. *Ann Endocrinol (Paris)* 2016; 77:578–585.
94. Terzolo M, Baudin AE, Ardito A, *et al.* Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. *Eur J Endocrinol* 2013; 169:263–270.
95. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, *et al.* Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med* 2012; 366:2189–2197.
96. Chortis V, Taylor AE, Schneider P, *et al.* Mitotane therapy in adrenocortical cancer induces CYP3A4 and inhibits 5 α -reductase, explaining the need for personalized glucocorticoid and androgen replacement. *J Clin Endocrinol Metab* 2013; 98:161–171.
97. Oddie PD, Albert BB, Hofman PL, *et al.* Mitotane in the treatment of childhood adrenocortical carcinoma: a potent endocrine disruptor. *Endocrinol Diabetes Metab Case Rep* 2018; 2018:18-0059. doi:10.1530/EDM-18-0059.