JOÃO EVANGELISTA BEZERRA NETO

**Análise do perfil de expressão de microRNAs em
tumores adrenocorticais benignos e malignos humanos**

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

Programa de Ciências Médicas

Área de concentração: Distúrbios Genéticos de
Desenvolvimento e Metabolismo

Orientadora: Profa. Dra. Ana Claudia Latrônico Xavier

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bezerra Neto, João Evangelista

Análise do perfil de expressão de microRNAs em tumores adrenocorticais benignos e malignos humanos / João Evangelista Bezerra Neto. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências Médicas. Área de concentração: Distúrbios Genéticos de Desenvolvimento e Metabolismo.

Orientadora: Ana Claudia Latrônico Xavier.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex suprarrenal 2.Criança 3.Expressão gênica
4.MicroRNAs 5.Proteína supressora de tumor p53 6.Fator de crescimento *insulin-like*
II 7.Proteínas Wnt

USP/FM/DBD-126/14

Este trabalho foi realizado na Unidade de Endocrinologia do Desenvolvimento - Laboratório de Hormônios e Genética Molecular (LIM 42) e no Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa (ISLEP), com apoio financeiro do CNPq 477250/2010-6 e bolsa de doutorado direto CAPES demanda social.

Dedicatória

Aos meus pais.

Agradecimentos

À Profa. Dra Ana Claudia Latronico, minha orientadora, um exemplo como médica, pesquisadora e professora. Agradeço sua dedicação, paciência, otimismo e alegria contagiante que foi essencial para me possibilitar realizar esse trabalho.

À Profa. Dra. Berenice Bilharino de Mendonça, pela oportunidade, e pelo valioso exemplo profissional.

À Dra. Maria Cândida Barrisson Villares, exemplo de dedicação aos pacientes, e pelos ensinamentos transmitidos durante diversas discussões.

Ao Prof. Dr. Paulo Hoff, por propiciar tempo para a que pudesse desenvolver esse trabalho, e por incentivar a busca do melhor cuidado para os pacientes portadores de tumor adrenocortical.

Ao Prof. Dr Luis Fernando Lima Reis, pela oportunidade de realizar grande parte da minha pesquisa no seu laboratório no Instituto Sírio-Libanês de ensino e pesquisa (ISLEP) do Hospital Sírio-Libanês.

À Juliana Monte Real, tutora desde os meus primeiros passos nas aventuras da biologia molecular, por dividir conhecimentos e angustias durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Eloisa Moreira, pela empolgação no início deste trabalho, importante para o desenvolvimento da colaboração com o ISLEP.

À Tamaya Castro Ribeiro, que me ajudou desde os primeiros passos da bancada.

À Glauber da Costa de Brito, por realização das análises dos dados de bioinformática, passo crucial para o desenvolvimento desse trabalho.

Aos amigos do Grupo de Suprarrenal, Madson Almeida e Antonio Lerário, pela troca de experiências.

À Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira, pela experiência transmitida no final, mas que muito enriqueceu esse trabalho.

A todos os demais amigos e funcionários do LIM4, pela paciência, ensinamentos, generosidade e dedicação.

À minha esposa, Milena Teles, pelo amor e incentivo para realização desse trabalho.

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

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

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

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

Sumário

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores adrenocorticais	2
1.2	Desenvolvimento da glândula suprarrenal.....	6
1.3	Tumorigênese Adrenal	7
1.4	MicroRNAs.....	11
1.5	MicroRNA e câncer.....	15
1.6	MicroRNA e carcinoma do córtex da suprarrenal	18
2	OBJETIVOS	21
3	MÉTODOS	23
3.1	Considerações éticas	24
3.2	Pacientes.....	24
3.3	Estudo Molecular	28
3.3.1	Extração do RNA.....	28
3.3.2	Construção do cDNA.....	30
3.3.3	Amostra de suprarrenal normal.....	31
3.3.4	Determinação do Perfil de Expressão de MicroRNA:.....	32
3.4	Estudo de vias celulares importantes na tumorigenese adrenocortical	34
3.5	Análise dos dados por bioinformática	35
3.5.1	Processamento dos dados de expressão	35
3.5.2	Análise estatística	35
3.5.3	Predição dos alvos e vias dos miRNAs.....	36
4	RESULTADOS	37
4.1	Comparação do perfil de expressão de miRNAs entre tumores adrenocorticais malignos e benignos <i>versus</i> tecido normal do córtex da suprarrenal.....	38
4.1.1	Tumores da população adulta <i>versus</i> tecido normal.....	38
4.1.2	Tumores da população pediátrica <i>versus</i> tecido normal	39
4.1.3	Análise dos genes diferentemente expressos entre os grupos de interesse.....	40

4.2	Comparação do perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais benignos e malignos.....	46
4.2.1	Avaliação de microRNAs específicos para o diagnóstico de carcinoma adrenocortical	48
4.3	Comparação do perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais da população adulta e pediátrica.....	50
4.3.1	Adenomas na população adulta <i>versus</i> população pediátrica.....	50
4.3.2	Carcinomas na população adulta <i>versus</i> população pediátrica.....	51
4.4	Análise do perfil de expressão de miRNAs de acordo com alterações das vias IGF-2, Wnt e p53.....	51
4.5	Análise de redes gênicas afetadas por microRNAs desregulados nos tumores adrenocorticais	53
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	79
7	ANEXOS.....	81
8	REFERÊNCIAS	93

Listas

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

3'UTR	Região 3' não traduzida do RNA
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AKT	Gene <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
APC	Adenomatous poliposis coli
BCL2	Gene <i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
cDNA	Fita complementar de DNA
CLCX12	Gene <i>chemokine (C-X-C motif) ligand 12</i>
Cox-2	Gene ciclooxygenase 2
CT	ciclo em que cada curva de amplificação ultrapassa o limiar de detecção da fluorescência gene
CTNNB1	Gene da β -catenina
CXCR4	Gene <i>chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
DHEA	Deidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de deidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
GSK-3	Quinase glicogênio sintase 3
HMGA2	Gene <i>high mobility group AT-hook 2</i>
H19	Gene supressor tumoral não traduzido
IC	Intervalo de confiança
IGF2	Fator de crescimento semelhante a insulina 2
IGF1R	Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina 1
IPA	<i>Ingenuity pathway analysis</i>
MATR3	Gene <i>matrin 3</i>
miRNA	microRNA
mRNA	RNA mensageiro
MYC	Gene <i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
o,p'-DDD	Mitotano
OMS	Organização mundial da saúde
p53	Proteína supressora tumoral p53
p57/kip2	gene do inibidor da quinase dependente de ciclina

Pb	Pares de base
<i>PTGS2</i>	Gene codificador da ciclooxigenase 2
PUMA	Gene <i>BCL2 binding component 3</i>
<i>RAS</i>	Genes da família <i>rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
RIN	RNA integrity number
RISC	Complex silenciador induzido por microRNA
RNA	Ácido ribonucleico
<i>RNU44</i>	RNA nucleolar não traduzido
<i>RNU48</i>	RNA nucleolar não traduzido
ROC	<i>receiver operating characteristic</i>
Rpm	Rotações por minuto
RT	Transcrição reversa
TEAD2	Gene <i>TEA domain family member 2</i>
TLDA	<i>Taqman low density array</i>
<i>TP53</i>	Gene suppressor tumoral p53
U6	RNA nucleolar não traduzido
WISP2	Gene <i>WNT1 inducible signaling pathway protein 2</i>
<i>WNT</i>	Gene <i>wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member</i>
YAP1	Gene <i>Yes-associated protein 1</i>

g	Força gravitacional
Kb	Kilobase
mg/L	Miligrama por mililitro
mL	microlitro
mL	mililitro
ng	Nanograma
nm	Nanometro
°C	Graus Centígrados
Δ	delta

TABELAS

Tabela 1 -	Características clínicas dos 19 pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais estudados.	26
Tabela 2 -	Características clínicas e histopatológicas dos 17 tumores de adultos estudados.	27
Tabela 3 -	MicroRNAs diferentemente expressos em adenomas e carcinomas adrenocorticais utilizando o diagrama de Veen.	41
Tabela 4 -	MicroRNAs com alteração de expressão em carcinomas de adultos tendo como referência adenomas de adultos.	46
Tabela 5 -	MicroRNAs diferentemente expressos entre adenomas e carcinomas e comuns à população adulta e pediátrica.	47
Tabela 6 -	MicroRNAs com alteração de expressão em adenomas pediátricos tendo como referência adenomas de adultos.	50
Tabela 7 -	MicroRNAs com alteração de expressão em tumores com níveis elevados de expressão tendo como referência tumores com níveis baixos de expressão do gene <i>IGF2</i>	51
Tabela 8 -	Redes gênicas obtidas com o uso do IPA para análise dos microRNAs alterados em tumores adrenocorticais	54
Tabela 9 -	Alteração do perfil de expressão de microRNA entre adenomas e carcinomas adrenocorticais em estudos prévios.	70

FIGURAS

Figura 1 -	Processo de formação dos microRNAs..	13
Figura 2 -	Etapa de transcrição reversa (RT) na utilização do TaqMan Human MicroRNA Array da AppliedBiosystems.	31
Figura 3 -	Gráfico de conjuntos de Veen.....	41
Figura 4 -	Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas da população adulta.....	43
Figura 5 -	Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas da população pediátrica.....	44
Figura 6 -	Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas combinando a população adulta e pediátrica.....	45
Figura 7 -	Curva ROC com os microRNAs selecionados para distinção de adenomas e carcinomas.....	49
Figura 8 -	Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre adenomas e carcinomas pediátricos..	55
Figura 9 -	Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre adenomas e carcinomas de adultos.	56
Figura 10 -	Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a expressão do gene <i>IGF2</i>	58
Figura 11 -	Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a expressão anômala de β -catenina.	60
Figura 12 -	Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a presença da mutação p.R337H do supressor tumoral p53.	61

Resumo

Bezerra JE. *Análise do perfil de expressão de microRNAs em tumores adrenocorticais benignos e malignos humanos* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2014. 117p.

Introdução: Os mecanismos moleculares que levam ao desenvolvimento de tumores do córtex suprarrenal ainda são pouco compreendidos. Uma alta frequência de carcinomas adrenocorticais na infância tem sido relatada nas regiões sul e sudeste do Brasil, com a presença de uma única mutação germinativa do supressor tumoral p53 (p.R337H) sendo evidenciada em 80-97% dos casos. Outros fatores implicados na tumorigênese adrenocortical incluem a hiperexpressão das vias IGF2 e Wnt. Os microRNAs, fragmentos de RNA que não codificam proteínas, são capazes de controlar a transcrição gênica exercendo um papel importante no crescimento e proliferação celular. O papel dos microRNA na tumorigênese adrenal ainda não está totalmente elucidado. **Objetivos:** Avaliar diferenças no perfil de expressão de microRNAs entre tumores benignos e malignos do córtex da suprarrenal da população adulta e pediátrica. Comparar esta expressão entre as amostras caracterizadas pela presença da mutação germinativa p.R337H do supressor tumoral p53, hiperexpressão da via Wnt e da via do IGF2. **Métodos:** Trinta e seis pacientes não relacionados, adultos e crianças, foram estudados. Os pacientes tiveram avaliação do perfil de produção hormonal e das vias moleculares p53, IGF2 e Wnt. O perfil de expressão de microRNAs foi determinado utilizando-se produto comercial específico *TaqMan MicroRNA Human Array* (AppliedBiosystems, Forster City, CA, USA). Os dados de expressão foram analisados com o programa *Expression Suite* (AppliedBiosystems, Forster City, CA, USA) e *Realtime Statmainer* (Integromics, Granada, Espanha). O estudo de alvos e das redes gênicas afetadas foram estudados com o programa *Ingenuity – IPA* (Ingenuity, EUA). **Resultados:** A comparação do perfil de expressão entre adenomas e carcinomas revelou alteração de expressão em 89 e 21 miRNAs em adultos e crianças, respectivamente. Após a correção estatística para múltiplos testes, nove miRNAs mantiveram diferenças significantes em adultos e nenhum em crianças. Dentre os microRNAs com expressão alterada em adultos estavam o miR-483-3p (p=0,011), miR-1290 (p=0,011) e miR-106b (p=0,048). Esses microRNAs foram selecionados para avaliação como biomarcadores por meio de curva ROC. O miR-1290 apresentou o melhor resultado (AUC=1,0; IC 95% 1,0; p=0,003), com valores de expressão de miR-1290 de 10,3 sendo capazes de diferenciar adenomas de carcinomas em adultos com 100% de sensibilidade e especificidade. Na população pediátrica, não foi possível diferenciar adenomas de carcinomas com o uso de microRNAs individuais. A comparação direta entre o perfil de expressão

de adenomas da população adulta e pediátrica revelou 38 miRNAs com alteração de expressão. O miR-483-3p e miR-483-5p estavam dentre os mais desregulados e foram os únicos a manter diferença estatística significativa ($p=0,009$ para ambos), estando hiperexpressos em crianças. A comparação direta do perfil de expressão entre carcinomas da população adulta e pediátrica revelou 26 microRNAs com alteração de expressão, porém sem significância estatística após correção para múltiplos testes. A comparação entre as amostras caracterizadas pela mutação p.R337H do supressor tumoral p53 revelou 53 genes alterados. A comparação entre as amostras caracterizadas por alteração do Wnt revelou 46 genes desregulados. Entretanto, essas alterações não mantiveram significância estatística após correção estatística para múltiplos testes. A comparação entre as amostras caracterizadas por alteração do IGF2 revelou 83 genes alterados, com miR-483-3p ($p<0,001$), miR-483-5p ($p<0,001$), miR-296-5p ($p=0,047$) e miR-1290 ($p=0,011$) mantendo significância estatística após correção para múltiplos testes. O estudo dos potenciais alvos e das redes genicas afetadas pelos miRNAs desregulados observados nesse estudo revelou novas e promissoras vias moleculares que podem ajudar a melhor entender a tumorigenese adrenocortical. **Conclusões:** Diferenças no perfil de expressão de microRNAs foram observadas entre tumores benignos e malignos do córtex da suprarrenal da população adulta e pediátrica. O ganho de expressão foi o evento mais comum. Os genes miR-483-3p, miR-1290 e miR-106b foram reconhecidos em diversas comparações entre os grupos de interesse e parecem apresentar papel importante na tumorigenese adrenocortical. Além disso, o miR-1290 demonstrou atuar como biomarcador capaz de diferenciar adenomas de carcinomas na população adulta. O estudo de redes gênicas potencialmente afetadas pelos microRNAs que apresentaram alteração de expressão nesse estudo poderá ajudar no melhor entendimento da tumorigênese adrenocortical.

Descritores: 1.Neoplasias do córtex suprarrenal 2.Criança 3.Expressão gênica 4.MicroRNAs 5.Proteína supressora de tumor p53 6.Fator de crescimento *insulin-like* II 7.Proteínas Wnt

Summary

Bezerra JE. *Analysis of MicroRNA expression profile in human benign and malignant adrenocortical tumors* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2014. 117p.

Introduction: The molecular mechanisms that lead to the development of tumors of the adrenal cortex are still poorly understood. A high frequency of pediatric adrenocortical carcinomas has been reported in South and Southeast of Brazil, and a single germline mutation of the tumor suppressor p53 (p.R337H) has been identified in 80-97% of cases. In addition, the overexpression of IGF2 and Wnt pathways are also involved in adrenal tumorigenesis. MicroRNAs, a class of small noncoding RNA, are able to control gene transcription regulating cellular growth and proliferation. However, the role of microRNA has not been fully elucidated in adrenal tumorigenesis. **Objectives:** To evaluate differences in the expression profile of microRNA between adult and pediatric adrenocortical tumors. To compare microRNA expression profile among samples with and without TP53, Wnt and IGF2 abnormalities. **Methods:** Thirty-six unrelated patients, adults and children, were studied. Patients had comprehensive hormonal evaluation and tumor samples were studied for TP53, Wnt and IGF2. The expression profile of microRNAs were determined using specific commercial product TaqMan MicroRNA Human Array (AppliedBiosystems, Forster City, CA, USA). The expression data were analyzed with the program Expression Suite (AppliedBiosystems, Forster City, CA, USA) and Realtime Statmainer (Integromics, Granada, Spain). The study of gene networks and affected targets genes have been studied with the Ingenuity program – IPA (Ingenuity, USA). **Results:** Comparing expression profile between adenomas and carcinomas revealed 89 and 21 deregulated miRNAs in adults and children, respectively. After false discovery rate correction, nine microRNA have maintained significant differences in miRNAs between adults and none in children. Among microRNAs deregulated in adults were miR-483-3p ($p = 0.011$), miR-1290 ($p = 0.011$) and miR-106b ($p = 0.048$). These microRNAs were selected for evaluation as biomarkers through ROC curve. The miR-1290 presented the best result (AUC = 1.0; IC 95% 1.0; $p = 0.003$), with values of expression of miR-1290 of 10.3 being able to differentiate adenomas from carcinomas with 100% sensitivity and specificity. It was not possible to differentiate adenomas from carcinomas by using microRNAs. The direct comparison between the expression profile of adult and pediatric adenomas revealed 38 deregulated miRNAs. The miR-483-3p and miR-483-5p were hiperexpressed in children and were the only ones that kept a statistically significant difference ($p = 0.009$ for both). The direct comparison of the expression profile between adult and pediatric carcinomas revealed 26 deregulated microRNAs, but without statistical significance after correction for multiple testing. The comparison between samples characterized by the p.R337H mutation of tumor suppressor p53 revealed 53 genes deregulated.

The comparison between samples characterized by alteration of Wnt revealed 46 microRNAs deregulated. However, after statistical correction for false discovery rate none of them maintained significance. The comparison between samples characterized by change in the *IGF2* gene revealed 83 deregulated microRNAs, miR-483-3 p ($p < 0.001$), miR-483-5 p ($p < 0.001$), miR-296-5 p ($p = 0.047$) and miR-1290 ($p = 0.011$) maintaining statistical significance after correction for false discovery rate. The study of potential targets and molecular networks affected by the deregulated microRNAs showed promising new molecular pathways that may help better understand the adrenocortical tumorigenesis. **Conclusions:** There were changes in the microRNAs expression profile between malignant and benign tumors of the adrenal cortex of adult and pediatric population. Hyperexpression were the most common presentation. MiR-483-3p, miR-1290 and miR-106b were recognized in various comparisons among groups of interest and appear to have an important role in adrenocortical tumorigenesis. In addition, the miR-1290 can act as a biomarker differentiating adenomas from carcinomas in the adult population. The study of molecular networks potentially affected by the microRNAs deregulated could contribute to better understanding of adrenocortical tumorigenesis.

Descriptors: 1.Adrenocortical tumors 2.Children 3.Gene expression profile
4.MicroRNAs 5.Suppressor protein p53 6.Insulin-like II growth factor 7. Wnt protein

1 INTRODUÇÃO

1.1 Tumores adrenocorticais

Tumores da glândula suprarrenal são entidades relativamente comuns ⁽¹⁾. Estimativas de estudos de necrópsias revelam uma prevalência que varia de 1,4 a 2,9%, podendo alcançar até 9% em pacientes idosos ⁽¹⁾. Cerca de 6% dos pacientes submetidos a exames radiológicos por outros motivos apresentam nódulos adrenais como achado incidental ^(1, 2). O carcinoma primário do córtex adrenal, entretanto, é uma entidade rara. Sua incidência estimada é de 0,5 a 2 casos por milhão de habitantes, correspondendo a 0,02% de todas as neoplasias malignas diagnosticadas ^(3, 4). Com predominância maior em mulheres, o carcinoma do córtex adrenal apresenta uma distribuição bimodal de incidência, com um pico na infância, antes dos cinco anos de idade, e outro na vida adulta, por volta da quarta ou quinta década de vida ⁽⁵⁾. Algumas síndromes genéticas são associadas a uma maior incidência de tumores adrenocorticais ^(6, 7). A síndrome de Beckwith-Wiedemann é caracterizada por anormalidades do crescimento e está associada a maior incidência de algumas neoplasias malignas, dentre as quais o carcinoma do córtex da suprarrenal. Ocasionalmente por alterações cromossômicas no *locus* 11p15, essa síndrome leva ao aumento da expressão do gene *IGF-2* (*Insulin-like Growth Factor 2*) e redução da expressão dos genes *H19* e *p57/kip2* (inibidor-C da quinase dependente de ciclina) ⁽⁸⁾. A síndrome de Li-Fraumeni é caracterizada pela predisposição a diversas neoplasias malignas, classicamente leucemia, sarcomas de partes

moles, carcinoma mamário, tumores de sistema nervoso central, e também carcinoma adrenocortical. Mutações no supressor tumoral *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), podem ser encontradas na maior parte dos afetados ⁽⁹⁾. Nas regiões sul e sudeste do Brasil, a incidência do carcinoma do córtex adrenal na infância é excepcionalmente elevada, variando de 3,4 a 4,2 casos por milhão de crianças abaixo dos 15 anos de idade ⁽¹⁰⁾. Nesses casos, a presença de uma única mutação germinativa no gene supressor tumoral *TP53* (p.R337H) é encontrada em alta frequência ^(11, 12).

Os tumores da suprarrenal frequentemente causam distúrbios endócrinos. Mesmo incidentalomas podem apresentar produção hormonal com repercussão clínica em cerca de 10% dos casos ⁽¹³⁾. Aproximadamente 60% dos carcinomas adrenocorticais em adultos apresentam produção hormonal suficiente para gerar repercussão clínica ⁽¹⁴⁻¹⁷⁾. A apresentação mais comum é a síndrome de Cushing isolada (45%), seguido de síndrome mista, caracterizada pela associação de síndrome de Cushing com virilização (25%), e menos frequentemente virilização isolada (10%). Em crianças, carcinomas da suprarrenal geralmente se apresentam como síndrome de virilização (84%) enquanto produção isolada de glicocorticoides é menos frequente (6%) ^(18, 19).

A diferenciação entre um processo benigno e maligno do córtex da suprarrenal representa ainda um grande desafio. Critérios radiológicos capazes de distinguir processos benignos dos malignos associado ao córtex da suprarrenal foram propostos ⁽²⁰⁾. Entretanto, em crianças não há estudos

comparando a confiabilidade dessas técnicas radiológicas. Mesmo histologicamente, a diferenciação entre adenomas e carcinomas não se mostra uma tarefa menos complexa. Alguns sistemas de classificação morfológica foram desenvolvidos, apresentando, em geral, acurácia semelhante ⁽²¹⁻²³⁾. O sistema de classificação de Weiss, o mais utilizado, analisa nove parâmetros: três relacionados a estrutura do tumor (necrose confluyente, arquitetura difusa, quantidade do componente de células claras), três relacionados a características citológicas (atipia nuclear, mitoses atípicas, número de mitoses), e três relacionados a capacidade de invasão do tumor (invasão vascular, invasão sinusoidal, invasão da cápsula adrenal). Nesse sistema são classificados como maligno os tumores que apresentem pelo menos três dos nove achados histológicos ⁽²⁴⁾. Entretanto, alguns critérios definidos por Weiss apresentam baixa reprodutibilidade na análise por diferentes patologistas e casos de comportamento incerto ainda são identificados ⁽²⁵⁾. Além disso, a aplicabilidade dos critérios de Weiss na população pediátrica permanece limitada, com uma menor correlação entre os achados histológicos e a evolução clínica ^(24, 26-28). Assim, o diagnóstico inequívoco de carcinoma somente é estabelecido quando existem sinais de disseminação tumoral, como presença de invasão de estruturas adjacentes ou metástases.

O carcinoma adrenocortical é uma doença potencialmente fatal. A sobrevida global em cinco anos varia de 35% a 58% em séries modernas ^(15, 17, 29, 30). O fator prognóstico mais importante é o estadiamento. O sistema clássico de estadiamento é o proposto por MacFarlane ⁽³¹⁾, modificado por

Sullivan ⁽³²⁾, e incorporado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) ⁽³³⁾. Recentemente, a ENSAT (*European Network for the Study of Adrenal Tumors*) propôs mudanças a fim de melhorar a estratificação de risco ⁽³⁴⁾. Infelizmente, a maior parte dos pacientes é diagnosticada em estadios avançados (65% no estágio III ou IV) ^(35, 36). A ressecção cirúrgica constitui a única modalidade terapêutica comprovadamente curativa. Pacientes diagnosticados com estadiamento precoce apresentam elevada chance de cura após ressecção completa do tumor, com mais de 80% de sobrevida câncer-específica no estágio I. Entretanto, em torno de 40% dos pacientes no estágio II e virtualmente todos os casos no estágio III apresentam recidiva da doença ⁽³⁷⁾. Nesses casos o prognóstico é bastante desfavorável, com 5% a 15% dos pacientes estando vivos em 5 anos ^(18, 29).

As opções terapêuticas em pacientes com doença disseminada permanecem restritas. A ressecção cirúrgica de lesões metastáticas conseguiu aumentar a sobrevida em alguns estudos retrospectivos ⁽³⁸⁻⁴⁰⁾. O mitotano (o,p'-DDD), uma isoforma do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), é um agente adrenolítico muito utilizado no tratamento de pacientes com carcinoma adrenocortical. Além de controlar sintomas relacionados à hipersecreção hormonal, o mitotano apresenta ação antineoplásica isoladamente, gerando resposta objetiva em aproximadamente 25% dos pacientes tratados ⁽⁴¹⁻⁴⁵⁾. No entanto, o mitotano possui absorção errática e está associado a efeitos colaterais desgastantes. O controle das concentrações séricas de mitotano aumenta sua eficiência terapêutica assim como pode reduzir a intensidade dos efeitos colaterais pela adequação da

dose de tratamento. Valores entre 14 e 20 mg/L são desejáveis, embora respostas favoráveis possam ocorrer com concentrações séricas mais baixas ⁽⁴⁵⁾. Associações de quimioterapia citotóxica alcançam resposta limitada. Diversas combinações têm sido utilizadas, a maior parte baseada no quimioterápico cisplatina, sendo frequente a associação de mitotano aos esquemas ⁽⁴⁶⁾. Resultados do primeiro estudo prospectivo e aleatorizado fase III em carcinoma de suprarrenal demonstrou taxa de resposta de 23% e sobrevida livre de progressão de 5,8 meses para o grupo tratado com o esquema constituído por etoposide, doxorrubicina, cisplatina e mitotano ⁽⁴⁷⁾. O uso de novas classes de quimioterapia e drogas-alvo, com ação no bloqueio de vias moleculares específicas, não tem gerado avanços no controle da doença até o momento ⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾. Assim, as opções atuais de tratamento para o carcinoma adrenocortical metastático são ineficazes e novas alternativas terapêuticas são necessárias.

1.2 Desenvolvimento da glândula suprarrenal

O córtex da glândula suprarrenal se desenvolve a partir do mesoderma intermediário enquanto a medula tem origem ectodérmica da crista neural. O primórdio da adrenal pode ser identificado isoladamente a partir da oitava semana de desenvolvimento, sendo composta por duas camadas distintas, a zona fetal mais interna e a zona definitiva mais externa. Nessa fase, a zona definitiva é composta pela zona fasciculada e glomerulosa. Durante o segundo trimestre do desenvolvimento, a zona fetal aumenta desproporcionalmente, representando 85% do córtex adrenal, e

secreta dehidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEA-S), que contribui para manutenção da gestação normal ⁽⁵²⁻⁵⁴⁾. Após o nascimento o córtex fetal se degenera ⁽⁵⁴⁾. A zona definitiva então prolifera, sendo a zona reticular, a mais externa do córtex, identificada a partir do segundo ano de vida. A estrutura adulta do córtex só é alcançada na puberdade.

1.3 Tumorigênese Adrenal

Estudos de hibridização genômica comparativa demonstraram um elevado grau de instabilidade cromossômica nos tumores do córtex da suprarrenal, sobretudo nos carcinomas, com padrões diferentes em pacientes adultos e pediátricos ⁽⁵⁵⁻⁶⁰⁾. Regiões de perda e ganhos cromossômicos são sítios prováveis de genes supressores e oncogenes, respectivamente, não sendo consideradas eventos aleatórios, mas alvos ativos do processo de tumorigênese.

O gene *TP53*, localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13), é um supressor tumoral que participa de vários processos intracelulares responsáveis pelo controle do ciclo celular e resposta a estímulos tóxicos, sendo capaz de desencadear apoptose em situações de lesão irreparável do material genético celular. Este gene está frequentemente alterado em neoplasias malignas humanas, com mutações somáticas descritas em aproximadamente 50% de todos os cânceres ⁽⁶¹⁾. No carcinoma adrenocortical, algumas séries constataram a presença de mutações somáticas em 25-82% dos casos ⁽⁶²⁻⁶⁵⁾. Uma elevada frequência de uma

única mutação germinativa no gene *TP53* foi identificada em tumores adrenocorticais esporádicos em pacientes pediátricos provenientes do sul e sudeste do Brasil ^(11, 12). Esta mutação, localizada no exon 10 do gene, é do tipo *missense* e resulta na substituição do aminoácido arginina por histidina na posição 337 (p.R337H) do domínio de tetramerização da proteína. Estudos funcionais demonstraram que a presença da mutação p.R337H torna o domínio de tetramerização da molécula p53 altamente sensível a variações do pH ⁽⁶⁶⁾. O intenso remodelamento da glândula suprarrenal após o nascimento está associado ao aumento do pH intracelular, o que poderia levar a disfunção da molécula p53 em um momento crítico e assim favorecer o surgimento de neoplasias. Os tumores pediátricos associados à mutação germinativa p.R337H apresentaram uma alta frequência de inativação do alelo normal do gene *TP53*, resultante da perda total do cromossomo 17 ⁽⁶⁷⁾. Entretanto, um estudo posterior em adultos revelou discrepância entre a presença de mutações somáticas do *TP53* e a perda de heterozigotidade na região 17p13, sugerindo a presença de outro gene supressor tumoral nesta região cromossômica ⁽⁶⁸⁾.

O aumento da expressão do gene *IGF2* foi observado em vários tumores, incluindo carcinomas adrenocorticais ⁽⁶⁹⁾. A perda de heterozigose do *locus* 11p15 ou a hiperexpressão do gene *IGF2* foram encontrados em mais de 90% dos tumores adrenocorticais malignos em adultos ^(70, 71). Nosso grupo confirmou uma maior expressão do gene *IGF2* em tumores adrenocorticais malignos diagnosticados em adultos ⁽⁷²⁾. No grupo pediátrico,

entretanto, níveis elevados de expressão do gene *IGF2* foram semelhantemente elevados entre adenomas e carcinomas ⁽⁷²⁾.

O papel do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R) também foi avaliado pelo nosso grupo, sendo demonstrado sua expressão significativamente maior em carcinomas que adenomas no grupo pediátrico ⁽⁷²⁾. Embora a presença de mutações no gene *TP53* possa favorecer a hiperexpressão do gene *IGF1R* ⁽⁷³⁾, isso não foi observado, devendo haver outros eventos moleculares no grupo pediátrico que levem a esse achado ⁽⁷²⁾. O nível de expressão do gene *IGF1R* também demonstrou ser um preditor de metástase no grupo pediátrico ⁽⁷²⁾. Além disso, a via ativada pelo IGF1R se mostrou uma via principal para a proliferação de células de tumores adrenocorticais in vitro, com o bloqueio desse receptor levando a redução significativa das taxas de proliferação e a indução de apoptose ⁽⁷²⁾.

Estudos moleculares têm demonstrado o envolvimento da via de sinalização Wnt (*wingless-type mouse mammary tumor virus integration site member*) na patogênese de diversos tumores malignos. A ativação da via Wnt resulta na inibição do complexo quinase GSK-3, impedindo a degradação da β -catenina no citoplasma. O acúmulo excessivo de β -catenina leva a sua migração para o núcleo celular gerando a ativação de fatores de transcrição dos genes alvo dessa via ⁽⁷⁴⁾. A via Wnt/ β -catenina foi estudada em tumores adrenocorticais, sendo descrito acúmulo anômalo de β -catenina em adenomas, mas principalmente em carcinomas, com padrões histológicos distintos ⁽⁷⁵⁾. Mutações ativadoras no gene *CTNNB1*, que

codifica a β -catenina, foram descritas com frequência semelhante em neoplasias malignas e benignas do córtex da suprarrenal em adultos ⁽⁷⁵⁾. Em nosso grupo, foram estudados uma coorte de 111 casos de tumores adrenais adultos e pediátricos. O acúmulo anômalo de β -catenina foi observado em 15% dos carcinomas adultos e 23.4% dos carcinomas pediátricos. O acúmulo nuclear da β -catenina foi identificado como fator de pior prognóstico nos carcinomas adrenais avaliados nesse coorte. Mutações no gene *CTNNB1* foram encontradas na mesma proporção da população adulta e pediátrica, sendo associada à maior expressão nuclear dessa proteína, como previamente descrito ⁽⁷⁶⁾.

A análise do perfil de expressão de RNA mensageiro (mRNA) contribuiu na caracterização de vias importantes para a tumorigênese adrenocortical. Um resultado comum aos estudos envolvendo a população adulta foi a diferença de expressão de um grande número de genes entre tumores malignos e benignos da suprarrenal. Genes relacionados a vias de proliferação celular, como os reguladores do ciclo celular, estavam comumente hiperexpressos nos carcinomas ⁽⁷⁷⁻⁸²⁾. Entretanto, uma parte dos genes desregulados permitiu a identificação de uma assinatura dos tumores adrenais. Nesse grupo estavam, além de genes relacionados a esteroidogênese, os genes das vias *TP53*, *IGF2*, e *WNT* ^(77, 81-84). Dois grupos de carcinoma com agressividade distinta foram identificados. Foi sugerido que o grupo de pior prognóstico poderia ser dividido em três subgrupos de acordo com a via principal de tumorigênese: (1) grupo com mutação do *TP53*, (2) grupo com hiperexpressão da via *Wnt/ β -catenina*, e

(3) grupo indeterminado ⁽⁸⁵⁾. Curiosamente, alterações nas vias do *TP53* e *Wnt/β-catenina* parecem ser mutuamente excludentes ⁽⁸⁴⁾. Em tumores pediátricos, o perfil de expressão dos carcinomas mostrou similaridades com a população adulta, porém com menor capacidade de distinção entre tumores malignos e benignos ⁽⁸⁶⁾.

1.4 MicroRNAs

Em 1993, Ambros *et al.* ⁽⁸⁷⁾ relataram a presença de um RNA pequeno, de fita simples contendo apenas 22 pares de bases (pb), que não codificava uma proteína, responsável por regular o desenvolvimento do nematóide *Caenorhabditis elegans*. Com uma sequência conservada em diferentes espécies de nematóides, esse RNA exercia um papel de controlador pós-transcricional de um gene determinante no desenvolvimento desses animais através da ligação na região 3' não traduzida de RNAs mensageiros (3'UTR). Em 1998, Fire, Mello *et al.* ⁽⁸⁸⁾ relataram que RNAs de dupla fita eram capazes de silenciar de maneira direcionada alguns genes por meio da interferência em seus RNAs mensageiros. Em 1999, estudos de silenciamento gênico em plantas utilizando RNAs de dupla fita revelaram que esses geravam fragmentos menores, com cerca de 20 pb, que eram os reais efetores da ação inibitória ⁽⁸⁹⁾. Denominados de microRNA (miRNA), esses fragmentos compreendem uma vasta classe de reguladores gênicos endógenos identificados desde plantas à várias espécies animais, e altamente conservados no processo evolutivo ⁽⁹⁰⁾.

Uma vez transcritos, os genes codificadores de um miRNA levam a formação de um fragmento de RNA longo que adquire a forma de dupla fita imperfeita, com a presença de uma alça em uma das extremidades, denominado miRNA primário. Ainda no núcleo celular, após sofrer ação de uma endonuclease (Drosha), parte da dupla fita é retirada levando a formação de uma molécula mais curta, com cerca de 70 nucleotídeos, em forma de “grampo de cabelo”, denominada pré-miRNA. Essa forma precursora migra, então, para o citoplasma da célula através de uma proteína transportadora da membrana nuclear, a exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA sofre clivagem por um complexo formado por uma RNase-III-endonuclease, a enzima “*Dicer*”. Com isso, é retirada a alça presente em uma das extremidades levando a formação de duas fitas simples de RNA, com aproximadamente 22 nucleotídeos cada, tendo uma delas a principal ação efetora inibitória, sendo denominada miRNA maduro ⁽⁹⁰⁾ (Figura 1).

Figura 1 - Processo de formação dos microRNAs. Após a transcrição do gene específico, a forma primária sofre uma primeira clivagem por ação do complexo Drosha, levando a formação do pré-microRNA. Esse é levado do núcleo ao citoplasma através da proteína Exportina-5. No citoplasma, o pré-microRNA sofre uma nova clivagem por ação do complexo Dicer, gerando duas fitas de RNA pequenos que constituem o microRNA maduro. Essa sequência, associada ao complexo Argonauta, atuará inibindo a tradução de RNAm de genes específicos. Adaptado de Ding XC et al., Trend Biotech, 2008.

Uma vez liberado no citoplasma, o miRNA maduro liga-se a um conjunto de proteínas denominado “complexo silenciador induzido por RNA” (RISC). Guiado pelo reconhecimento de sequências complementares localizadas na região 3’UTR, o miRNA permite a ligação do complexo RISC a um RNA mensageiro. Assim, a presença do miRNA garante ao complexo

RISC uma ação específica sobre o gene a ser inibido. Entretanto, apesar dessa ligação ser dependente do pareamento de bases segundo proposto por Watson-Crick, a presença de seqüências incompatíveis não impede completamente a sua atividade, sendo necessário apenas o pareamento dos nucleotídeos 2-8 do miRNA, denominada região de semente. Um mesmo mRNA pode apresentar vários sítios de pareamento na sua região 3'UTR, permitindo a ligação de várias cópias de um mesmo miRNA. Do mesmo modo, miRNAs diferentes são capazes de inibir, com graus de eficiência diferentes, um mesmo RNA mensageiro ⁽⁹¹⁾. A presença de famílias de miRNA extremamente semelhantes entre si sugere que em muitas situações a ausência de um miRNA específico poderia ser suprida por outro miRNA semelhante, mantendo estável o controle da expressão protéica ⁽⁹⁰⁾.

O complexo miRNA:RISC regula a tradução do RNA mensageiro por mecanismos ainda não totalmente elucidados ⁽⁹²⁾. Enquanto em plantas a ligação do complexo miRISC leva quase que invariavelmente a destruição do RNA mensageiro, em metazoários a interrupção do maquinário de tradução parece ser o mecanismo mais frequente. A eficiência de inibição parece regulado por fatores como o número de sítios de ligação para o miRNAs na região 3'UTR, a distância entre esses sítios, e o grau de complementaridade entre o miRNA e a sequência da região 3'UTR ⁽⁹¹⁾.

1.5 MicroRNA e câncer

As primeiras evidências do envolvimento de miRNAs nas neoplasias surgiram com a observação da localização desses genes frequentemente em regiões frágeis dos cromossomos. Regiões cromossômicas frágeis são definidas como sítios propensos a translocações, deleções e amplificações cromossômicas. Estes são frequentemente os locais de alteração cromossômica nas neoplasias malignas ⁽⁹³⁾. Em 2002, Calin *et al.* ⁽⁹⁴⁾ relataram a primeira constatação da expressão anômala de miRNA em uma neoplasia maligna humana. Pacientes com leucemia linfóide crônica de células B e deleção do *locus* 13q14 apresentaram diminuição ou ausência do miR-15 e miR-16, que têm seus genes localizados nessa mesma região. Os mesmos resultados foram relatados em homens com neoplasia de próstata, onde a deleção do cromossomo 13q14 também foi encontrada ⁽⁹⁵⁾. Estudos posteriores em modelos murinos demonstraram que a deleção do gene codificador do complexo miR-15a-16-1, miRNA primário que dá origem tanto ao miR-15 como miR-16, aumenta o desenvolvimento de doenças linfoproliferativas e acarreta hiperplasia prostática nos machos ^(95, 96). Os possíveis alvos desses miRNAs incluem os oncogenes *BCL2*, ciclina D1 e *WNT3a* ⁽⁹⁷⁾.

A partir de então vários estudos relacionaram alterações da expressão de miRNAs com neoplasias malignas ^(97, 98). Tanto a redução como o aumento da expressão de diversos miRNAs foram evidenciados nas mais variadas neoplasias ⁽⁹⁹⁾. Lu *et al.* ⁽⁹⁸⁾ demonstraram que o perfil de expressão de miRNA é capaz de agrupar tumores de origem embrionária

semelhante, sendo possível diferenciar tecidos cancerígenos dos seus correspondentes normais, determinando também a linhagem celular e seu grau de diferenciação. Esses achados foram mais precisos quando comparados com a análise do perfil de expressão de RNA mensageiro ⁽¹⁰⁰⁾.

Outros estudos observaram a correlação de expressão de alguns miRNAs com o prognóstico e resposta ao tratamento das neoplasias. Calin *et al.* ⁽¹⁰¹⁾ identificaram um painel com treze miRNAs que se correlaciona com o prognóstico de pacientes com leucemia linfóide crônica. Schetter *et al.* ⁽¹⁰²⁾ demonstraram trinta e sete miRNAs com expressão alterada em neoplasia maligna do cólon. Nesse grupo, a maior expressão do miR-21 foi relacionada a pior resposta ao tratamento. Da mesma forma, Ranade *et al.* ⁽¹⁰³⁾ relacionaram valores de expressão do miR-92a-2* com quimiorresistência e sobrevida de pacientes com carcinoma de pulmão de pequenas células. Outros grupos relataram resultados semelhantes em câncer de pulmão de não-pequenas-células, pâncreas, estômago e ovário ^(102, 104-107).

A análise dos alvos potenciais de ação dos miRNAs com expressão alterada em neoplasias incluem, na maior parte dos casos, genes envolvidos no crescimento celular, migração e metástase. Desse modo, miRNAs poderiam atuar como supressores tumorais ou como oncogenes, dependendo do gene alvo o qual esteja sendo inibido ⁽¹⁰⁸⁾. Assim, tanto a menor como a maior expressão de miRNAs estariam relacionadas ao desenvolvimento de tumores. O complexo miR-17~92 é um exemplo de ação de miRNAs como oncogenes. Essa família que produz seis miRNAs,

foi inicialmente relacionado com o câncer devido a sua localização em uma região frequentemente amplificada em linfoproliferações ⁽¹⁰⁹⁾. Análises *in vitro* demonstraram que esse complexo pode, juntamente com o gene *MYC*, acelerar intensamente a tumorigênese em modelos murinos de linfoma ⁽¹¹⁰⁾. A família let-7 é um dos grupos de miRNAs com ação supressora tumoral mais estudados. Com expressão diminuída em neoplasias de pulmão, a família let-7 atua inibindo genes da família *RAS* e *HMGA2* ^(111, 112). Mutação no local de ligação do let-7 levou a inibição da sua ação reguladora e a maior expressão do *HMGA2* ⁽¹¹²⁾. De modo contrário, a hiperexpressão desse miRNA leva à redução da proliferação tumoral em modelos murinos de neoplasia de pulmão e de mama ^(113, 114).

Os miRNAs podem participar, também, como via efetora de genes supressores tumorais conhecidos. Comparando o perfil de expressão de miRNA entre células normais e deficientes do supressor tumoral *TP53*, He *et al.* ⁽¹¹⁵⁾ identificaram a família miR-34 como uma importante via de inibição de crescimento celular. O miR-34 localiza-se no cromossomo 1p36, região frequentemente deletada em diversas neoplasias. Um aumento da expressão do miR-34 mediado pelo *TP53* em células submetidas a estresse foi evidenciado neste estudo. Além disso, a infusão exógena de miR-34 foi capaz de inibir o crescimento celular independente do p21, via efetora reconhecida do *TP53*. Altamente conservado desde larvas a grandes mamíferos, a família do miR-34 demonstrou ser uma das muitas vias de ação supressora tumoral dependente do supressor tumoral *TP53* ⁽¹¹⁵⁾.

Devido a suas dimensões reduzidas, os miRNAs apresentam maior estabilidade e resistência a degradação que a maioria dos compostos de ácido ribonucléicos. Assim, mostrou-se possível a extração de miRNAs íntegros em amostras mantidas por longo período em temperatura ambiente como a partir de amostras de tecido conservados em parafina ^(116, 117). Mais recentemente, a identificação de miRNAs no soro e plasma abriu novas oportunidades na utilização dessas moléculas ^(118, 119). A partir de então, vários autores vem confirmando a identificação de padrões de expressão específicos de miRNAs no soro de pacientes com neoplasia, permitindo a sua utilização como biomarcadores ⁽¹²⁰⁻¹²²⁾.

1.6 MicroRNA e carcinoma do córtex da suprarrenal

Com importância reconhecida no controle da proliferação celular e diferenciação tecidual, a participação dos miRNAs na patogênese dos tumores adrenocorticais era esperada. A evidência inicial surgiu com a observação de que o produto da expressão do gene *H19*, previamente reconhecido como um RNA não codificador, seria capaz de gerar um miRNA ⁽¹²³⁾. O gene *H19*, localizado no *locus* 11p15, tem sua expressão diminuída na síndrome de Beckwith-Wiedemann e parece ter o papel de regular a expressão do gene *IGF2* ⁽⁶⁾. O grau de metilação do gene *H19* demonstrou ser mais intenso em tumores adrenocorticais em comparação aos tecidos normais, sendo sua expressão inversamente relacionada à expressão do gene *IGF2* em estudo *in vitro*. Além disso, o uso de inibidores de metilação

elevou a expressão do gene *H19* e resultou em diminuição redução da expressão do gene *IGF2* ⁽¹²⁴⁾.

Mais recentemente, o papel dos miRNAs foi estudado em diversas patologias da suprarrenal. Em amostras de hiperplasia adrenal nodular pigmentosa, 44 miRNAs apresentaram alterações quantitativas quando comparado ao tecido normal ⁽¹²⁵⁾. A expressão de miRNA foi relacionada a severidade da síndrome de Cushing nesses pacientes, com as concentrações de cortisol sérico à meia-noite sendo inversamente proporcional a expressão do miRNA let-7b. Além disso, o miR-449, significativamente diminuído nas amostras estudadas, mostrou atuar como inibidor da via Wnt/ β -catenina através do controle de expressão da proteína WISP2. Em um segundo estudo, amostras de adrenais com doença macronodular massiva revelaram alteração da expressão de 37 miRNAs em relação ao tecido normal ⁽¹²⁶⁾. Nesse estudo, o grau de expressão de miR-130a e miR-382 foi proporcional aos valores de cortisol sérico dosados à meia-noite. Além disso, o miR-200b, um dos miRNAs mais suprimidos nos tecidos estudados, foi identificado como inibidor do gene *MATR3*, um inibidor da matrix nuclear relacionada ao controle da transcrição gênica.

Em tumores adrenocorticais da população adulta, o perfil de expressão de miRNA mostrou ser distinto em adenomas e carcinomas ⁽¹²⁷⁻¹³²⁾. Grupos de miRNAs foram utilizados na tentativa de diferenciar adenomas de carcinomas ^(127, 129), ou classificar os carcinomas quanto a sobrevida ^(128, 131), ambos com boa eficácia. Um resultado comum aos estudos foi a hiperexpressão do miR-483 em carcinomas. Localizado no

intron 2 do gene *IGF2*, a expressão de miR-483 e *IGF2* parecem reguladas pelos mesmos fatores ^(129, 133). O miR-483 provavelmente contribui para a ação biológica do *IGF2* por apresentar ação anti-apoptótica ⁽¹³⁴⁾. Em crianças, o perfil de expressão de miRNAs não apresentou a mesma capacidade de distinção entre os grupos de tumores ⁽¹³⁵⁾. Nessa população, nenhum grupo de miRNA foi capaz de separar tumores malignos dos benignos.

2 OBJETIVOS

Objetivos

- 1- Comparar o perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais malignos, benignos e tecido normal do córtex da suprarrenal.
- 2- Avaliar as diferenças no perfil de expressão de microRNAs entre os carcinomas do córtex da suprarrenal da população adulta e pediátrica.
- 3- Comparar o perfil de expressão de microRNAs entre as amostras de tumores adrenocorticais caracterizados por:
 - a- Presença ou ausência da mutação germinativa p.R337H do supressor tumoral p53.
 - b- Evidência ou não de hiperexpressão da via Wnt/ β -catenina.
 - c- Evidência ou não de hiperexpressão da via *IGF2*.

3 MÉTODOS

3.1 Considerações éticas

Este estudo foi conduzido de acordo com os princípios éticos seguindo as orientações contidas na declaração de Helsinki. O consentimento por escrito foi obtido de todas as pacientes ou pais/tutores antes que os procedimentos de pesquisa fossem iniciados. O protocolo de estudo foi submetido ao Comitê de Ética da instituição e aprovado (número de protocolo de pesquisa na CAPPesq: 0023/10).

3.2 Pacientes

Trinta e seis pacientes não relacionados, de ambos os sexos, provenientes do ambulatório da Unidade de Suprarrenal do Serviço de Endocrinologia do Hospital das Clínicas e do ambulatório da Oncologia Clínica do Instituto do Câncer do Estado de São Paulo foram estudados. Os tumores adrenocorticais foram diagnosticados em 19 crianças (5 meninos e 14 meninas; idade ao diagnóstico variando de 0,9 a 15 anos) e 17 adultos (4 do sexo masculino e 13 do sexo feminino; idade ao diagnóstico variando de 23 a 66 anos). Todos os pacientes foram submetidos à avaliação hormonal que incluiu a determinação do cortisol urinário em amostra de 24 horas, avaliação da supressão de cortisol sérico após 1 mg de dexametasona, concentrações plasmáticas de ACTH, andrógenos (testosterona, androstenediona, DHEA e seu composto sulfatado),

precursores esteroidais (17-hidroxiprogesterona, 11-deoxicortisol), estradiol, aldosterona e atividade plasmática de renina. Os dados clínicos estão representados na Tabela 1 e Tabela 2.

Em todos os tumores foram estudados os critérios anatomopatológicos de Weiss ⁽²⁴⁾ (Anexo A). Os tumores adrenocorticais em pacientes adultos foram classificados de acordo com esses critérios, com valores maiores ou igual a três determinando o diagnóstico de malignidade. Devido a limitação dos critérios de Weiss na população pediátrica, o diagnóstico definitivo de malignidade foi definido a partir de um estadiamento avançado (III ou IV) ou evolução clínica desfavorável. O prognóstico dos pacientes foi avaliado a partir do estadiamento da Organização Mundial de Saúde (Anexo B).

Tabela 1 - Características clínicas dos 19 pacientes pediátricos com tumores adrenocorticais estudados

Paciente	Idade	Sexo	Síndrome Clínica	Estadio	Escore Weiss	Tratamento Cirúrgico	Metástase	Diagnóstico	Mutação p53	Expressão mRNA do IGF-2	Expressão de β -catenina
1	2,2	F	V	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	47,39	Membrana
2	2,3	M	V	II	4	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	44,50	Membrana
3	2,2	F	V	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	2,10	Membrana
4	1,4	M	V/C	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	26,60	Núcleo e citoplasma
5	15,6	F	V/C	IV	7	Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão	Carcinoma	p.R337H	123,08	Núcleo e citoplasma
6	2,6	M	V	III	7	Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão	Carcinoma	p.R337H	18,60	Membrana
7	1,0	F	V	II	5	Adrenalectomia	Pulmão	Carcinoma	p.R337H	32,59	Membrana
8	1,6	F	V	II	3	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	9,00	Não disponível
9	1,9	F	V	I	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	20,17	Membrana
10	5,0	M	V	III	5	Adrenalectomia e metastasectomia	Pulmão	Carcinoma	p.R337H	107,65	Membrana
11	3,0	F	V	I	3	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	38,16	Membrana
12	2,4	F	V/C	II	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	52,25	Núcleo e citoplasma
13	2,6	F	V	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	22,89	Núcleo e citoplasma
14	0,9	F	V/C	II	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	34,84	Membrana
15	2,5	F	V	II	7	Adrenalectomia	Não	Adenoma	p.R337H	50,40	Membrana
16	9,0	M	C	I	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	0,27	Membrana
17	2,0	F	V/C	III	7	Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão e linfonodo	Carcinoma	Ausente	43,72	Membrana
18	13,0	F	V	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	9,00	ND
19	1,0	F	V/C	II	6	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Não disponível	9,00	ND

1 M: masculino, F: feminino, V: síndrome virilizante, C: síndrome de Cushing, CV: síndrome endócrina mista (síndrome de Cushing e síndrome virilizante), ND: dados não disponíveis.

Tabela 2 - Características clínicas e histopatológicas dos 17 tumores de adultos estudados

Paciente	Idade	Sexo	Síndrome Clínica	Estadio	Escore Weiss	Tratamento Cirúrgico	Metástase	Diagnóstico	Mutação p53	Expressão mRNA do IGF-2	Expressão de β -catenina
1	63,7	F	NF	IV	7	Adrenalectomia e nefrectomia	Fígado e pele	Carcinoma	ND	9,00	ND
2	31,4	F	A	II	6	Adrenalectomia	Pulmão	Carcinoma	p.R337H	9,00	ND
3	31,1	M	I	III	4	Adrenalectomia e nefrectomia	Linfonodo	Carcinoma	Ausente	107,85	ND
4	33,0	M	NF	IV	5	Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão e fígado	Carcinoma	Ausente	79,85	ND
5	56,4	F	C	III	8	Adrenalectomia	Pulmão e fígado	Carcinoma	Ausente	9,00	ND
6	23,5	F	V/C	III	5	Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão e fígado	Carcinoma	Ausente	9,00	ND
7	54,6	M	NF	IV	7	Metastasectomia	SNC	Carcinoma	ND	ND	ND
8	66,3	F	C	II	4	Adrenalectomia	Não	Carcinoma	Ausente	9,00	ND
9	38,2	F	A	II	3	Adrenalectomia	Fígado e linfonodo	Carcinoma	Ausente	9,00	ND
10	44,7	F	NF	IV	8	Adrenalectomia	Pulmão	Carcinoma	Ausente	74,38	Núcleo e citoplasma
11	34,3	F	NF	II		Adrenalectomia e nefrectomia	Pulmão e peritônio	Carcinoma	ND	ND	ND
12	46,5	F	V/C	III	7	Adrenalectomia e nefrectomia	Não	Carcinoma	Ausente	77,27	Membrana
13	37,4	F	V	II	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	99,00	ND
14		M	NF	II	5	Adrenalectomia	Linfonodo	Carcinoma	ND	ND	ND
15	27,0	F	C	II	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	ND	0,16	Membrana
16	24,0	F	C	I	2	Adrenalectomia	Não	Adenoma	ND	1,14	Membrana
17	37,0	F	C	I	1	Adrenalectomia	Não	Adenoma	Ausente	0,17	Membrana

M: masculino, F: feminino, V: síndrome virilizante, C: síndrome de Cushing, CV: síndrome endócrina mista (síndrome de Cushing e síndrome virilizante), ND: dados não disponíveis.

3.3 Estudo Molecular

O atual projeto foi desenvolvido em colaboração com pesquisadores do Laboratório de Biologia Molecular do Instituto Sírio-Libanês de Ensino e Pesquisa (ISLEP), em São Paulo. Nesse centro de pesquisa foi utilizado os equipamentos para quantificação e análise de qualidade do miRNA (BioAnalyzer 2100, Agilent Technologies, EUA), assim como do equipamento para leitura da placas de array (SDS 7900HT, Applied Biosystems – Life Technologies, EUA) e o programa de análise dos dados Real Time Statminer (Integromics, Granada, Espanha).

3.3.1 Extração do RNA

Os tecidos tumorais foram obtidos durante procedimento cirúrgico habitual e armazenados em nitrogênio líquido. Para extração de RNA foi utilizado o produto comercial mirVana® (Ambion - Life thecnologies, EUA). Este método específico de extração permite o isolamento tanto de amostras constituídas por RNAs pequenos (com menos de 200 pb) como de RNA total, porém preservando os miRNAs geralmente perdidos em métodos de extração habituais. A extração de RNA total foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante, o que permitiu o melhor controle da qualidade do material extraído sem prejuízo na avaliação da expressão dos miRNAs. As amostras congelados a -80 °C foram maceradas e colocadas em tubo de microcentrífuga de 1,5 ml estéril. Ao tubo foram então adicionados 500 µl do tampão de lise e 50 µl do aditivo de homogeneização e a solução foi deixada por 10 minutos no gelo. Logo após, foram adicionados 500 µl de ácido fenol-

clorofórmio e as amostras foram homogeneizadas e centrifugadas na velocidade máxima de 10.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. A fase aquosa foi removida para um novo tubo e foi adicionado um terço do volume de etanol 100% e então, a solução transferida para um filtro e centrifugada a 10.000 rpm por 15 segundos. O filtro que contém o RNA total foi lavado com 700 µl da solução de lavagem 1, e as amostras centrifugadas por 10 segundos a 10.000 rpm, seguidas por mais duas lavagens com 500 µl da solução de lavagem 2/3, centrifugadas nos intervalos por 10 segundos a 10.000 rpm. Após a retirada do excesso da solução de lavagem com mais uma centrifugação de 10.000 g por cerca de 60 segundos, o filtro foi transferido para um novo tubo de microcentrífuga de 1,5 mL estéril e o RNA total foi resgatado com a adição de 100 µl de solução de eluição a 95 °C no filtro e as amostras novamente centrifugadas a 10.000 g por 30 segundos. O filtrado contendo o RNA total foi então armazenado em freezer -80 °C até ser utilizado.

A quantificação e pureza do RNA total extraído foi avaliada por espectrofotometria utilizando o equipamento NanoVue (GE Health Life Sciences) a partir da relação de absorbância A₂₆₀/A₂₈₀ nm 260/230 nm. A qualidade do RNA total foi avaliada por meio do perfil e do valor de integridade (RIN = “*RNA integrity number*”) obtidos após eletroforese em “chip” (*microfluidic chip*) no equipamento BioAnalyzer 2100 (Agilent Technologies, EUA) com utilização do kit RNA Nano6000 (Agilent Technologies, EUA). As amostras foram consideradas adequadas na presença de RIN maior ou igual a 5,0.

3.3.2 Construção do cDNA

O DNA complementar (cDNA) de cada paciente foi sintetizado por meio de produto comercial *TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit* e dos primers *Megaplex RT* (AppliedBiosystems – Life Technologies, EUA). Dois grupos de olinonucleotídeos (Pool A e Pool B), cada um contendo até 380 sequências iniciadoras específicas, foram utilizados para transcrição reversa. Cada oligonucleotídeo é complementar a um único microRNA maduro. Durante a reação, os oligonucleotídeos específicos assumem uma configuração em forma de “grampo de cabelo” ao hibridizarem no miRNA-alvo e promovem um alongamento das moléculas que serão sintetizadas. As moléculas de cDNA resultantes da reação de transcrição reversa são mais longas que os miRNAs e podem então ser utilizadas como moldes para o ensaio TaqMan (Figura 2). Não foi realizada etapa de pré-amplificação tendo em vista a disponibilidade de RNA total abundante e para evitar a adição de etapas interferentes no processamento da amostra. Foram utilizados 600 ng de RNA total para cada grupo de oligonucleotídeo. Posteriormente, realizamos o protocolo de reação para amostras sem pré-amplificação conforme orientação do fabricante (*Megaplex Pools for microRNA expression. Analysis protocol, PN 4399721 rev c 07/2010, AppliedBiosystems*).

Figura 2. Etapa de transcrição reversa (RT) na utilização do TaqMan Human MicroRNA Array da AppliedBiosystems. Cada um dos *pools* Megaplex RT contém um conjunto de *primers* que assumem uma configuração em grampo (“*stem-loop*”) durante a reação e cada primer é complementar a um microRNA maduro. As moléculas de cDNA resultantes da reação de RT são mais longas que os microRNAs e podem então ser utilizadas como moldes para o ensaio TaqMan. Adaptado de Chen, C; Nucleic Acids Res. 2005 Nov 27;33(20):e179

3.3.3 Amostra de suprarrenal normal

O perfil de expressão classificado como proveniente de tecido suprarrenal normal foi obtido a partir do estudo de amostra comercial de RNA (*Human Adrenal Cortex RNA POLY A+* - Clontech, EUA). A amostra comercialmente disponível era constituída por RNAs extraídos a partir de tecido de córtex de suprarrenal obtidos de 25 cadáveres de ambos os sexos, com idade entre 22 e 67 anos, falecidos por trauma. Os RNAs foram extraídos pelo método de tiocianato-guanidina modificado seguido pela seleção de RNAs com cadeia poli-A através de dupla filtragem por colunas de oligo(dT)-celulose. O tamanho dos RNAs poli-A variaram de 0,2 a 10 Kb

em eletroforese de gel de agarose denaturado (Clonatech, certificate of analysis, lot number 7110209). Essa amostra foi utilizada como amostra de referência na análise da quantificação relativa.

3.3.4 Determinação do Perfil de Expressão de MicroRNA

O perfil de expressão de microRNAs foi determinado em cada amostra isoladamente utilizando-se a plataforma TaqMan MicroRNA Array v3.0 (AppliedBiosystems – Life technologies, EUA). Trata-se de ensaio de PCR em tempo real com sondas de hidrólise baseado no sistema TLDA (*TaqMan Low Density Arrays*) (AppliedBiosystems – Life technologies, EUA). Essa plataforma é constituída de dois cartões de microfluidos independentes (*Human MicroRNA A Card v2.0* e *Human MicroRNA B Card v3.0*). Cada cartão apresenta oligonucleotídeos específicos e sondas TaqMan suficientes para a análise de expressão de 377 microRNAs, além de 4 genes controles, totalizando 754 microRNAs nos dois cartões, constituindo quase a totalidade de microRNAs relatados em humanos na base de dados Sanger miRBase v.10 (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml>).

O uso de cartões de microfluidos permite a distribuição da amostra nos 384 poços por centrifugação minimizando erros. Para cada cartão foram distribuídos 600 ng de cDNA entre as oito canaletas, perfazendo 75 ng por canaleta, que foi centrifugado em duas etapas sequenciais por 1 minuto e 1200 rpm. O mesmo processo foi repetido para os cartões *Human MicroRNA A* e *Human MicroRNA B*. Cartões onde a distribuição do material parecesse inadequada, constatado pela presença de volume residual inapropriado nas

canaletas, foram descartados. Após a centrifugação, os cartões foram selados para evitar o refluxo das amostras, e as canaletas destacadas.

A quantificação do cDNA foi realizada em equipamento SDS 7900HT (AppliedBiosystems – Life technologies, EUA). O ciclo em que a curva de amplificação ultrapassou o limiar de detecção da fluorescência (CT) foi determinado e utilizado para a quantificação da expressão gênica. A quantificação de cada miRNA foi calculada pelo ΔCT , representado pela diferença de expressão entre o gene alvo e o controle endógeno de uma determinada amostra. Os níveis de expressão relativa dos miRNAs foram obtidos pela utilização do método $2^{-\Delta\Delta CT}$, onde $\Delta\Delta CT$ corresponde a diferença entre o ΔCT das amostras estudadas ⁽¹³⁶⁾. Os genes para controle endógeno foram selecionados dentre os genes candidatos por meio da equação geNorm ⁽¹³⁷⁾. Esse teste utiliza a média da variância pareada entre um particular gene candidato e todos os outros genes candidatos levando a formação de um escore onde os menores valores determinam os genes mais estáveis. Após a exclusão sequenciada dos genes com pior pontuação, foram selecionados os genes *U6*, *RNU44*, *RNU48*. Como a diferença na pontuação do escore de estabilidade entre esses genes ultrapassava o ponto de corte estabelecido na equação (até 0,15) considerado adequado para a seleção de gene único como normalizador, foi optado pela utilização dos três genes como genes para controle endógeno. A média geométrica dos genes foi utilizado para a normalização ⁽¹³⁷⁾.

A acurácia da plataforma TLDA foi avaliada pela correlação dos resultados de duas corridas independentes da amostra comercial de RNA

(138). Os estudos de expressão apresentaram boa reprodutibilidade, com a comparação entre as placas demonstrando boa correlação (correlação entre CT, $r=0,728$; correlação entre ΔCT , $r=0,997$).

3.4 Estudo de vias celulares importantes na tumorigenese adrenocortical

Foram analisados os perfis de expressão de miRNA entre amostras de tumores, tanto da população pediátrica quanto adulta, que haviam sido caracterizados previamente quanto a alterações de vias reconhecidamente importantes na tumorigênese adrenocortical. Os grupos estudados foram divididos em: presença ou não de hiperexpressão do gene *IGF2*, presença ou não de expressão anômala da proteína β -catenina, presença ou não da mutação p.R337H do p53 (Tabela 1 e Tabela 2).

Dados sobre a expressão do mRNA de *IGF2* estavam disponíveis em 33 pacientes, 14 adultos e 19 crianças. A expressão do mRNA do *IGF2* foi considerada aumentada quando houve ganho maior que duas vezes no seu nível de expressão ⁽⁷²⁾. Dados sobre a expressão de β -catenina estavam disponíveis em 21 pacientes, 5 adultos e 16 crianças. A expressão de β -catenina foi considerada como anômala na evidência de acúmulo citoplasmático ou nuclear por meio de estudo imunohistoquímico ⁽⁷⁶⁾. Os dados da pesquisa de mutação no exon 10 do gene *TP53* estavam disponíveis em 29 pacientes, 11 adultos e 18 crianças ⁽¹²⁾.

3.5 Análise dos dados por bioinformática

3.5.1 Processamento dos dados de expressão

Os dados com as curvas de expressão foram extraídos do equipamento SDS 7900HT através do programa de gerenciamento do equipamento do fabricante e analisados inicialmente no programa ExpressionSuite versão 1.0.1 (AppliedBiosystems – Life Technologies, EUA). Com esse programa foi avaliada a qualidade das curvas de amplificação de cada amostra individualmente. A seguir, foi analisado o conjunto de todas as placas para determinação do limiar de detecção da fluorescência para cada miRNA, gerando o valor de CT. O limiar de detecção foi determinado automaticamente pelo programa e corrigido manualmente para cada um dos 754 genes estudados quanto necessário. Os dados de CT das placas foram então analisados utilizando os programas RealTime Statminer (Integromics, Espanha) e Excel (Microsoft, EUA). A fim de selecionar os genes de maior relevância, foram excluídos das análises subsequentes os miRNAs que não apresentaram expressão em pelo menos 20 das 36 amostras estudadas.

3.5.2 Análise estatística

Para a comparação entre o perfil de expressão dos grupos de interesse foi utilizado o teste t – Limma. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A correção para múltiplos testes foi realizada com a equação de Benjamini-Hochberg ⁽¹³⁹⁾.

Para a construção do agrupamento hierárquico foi utilizado o programa R/Bioconductor utilizando os miRNAs com diferença estatisticamente significativa e de acordo com a variância entre os grupos de interesse, com a distância entre as amostras determinada pela sua distância Euclidiana e o agrupamento realizado pelo ligação completa (*complete linkage*).

Para a construção da curva ROC (*receiver operating characteristic*) foi calculada utilizando o programa Graphpad Prism versão 6 (GraphPad, EUA).

O diagrama de Veen foi construído utilizando o programa Veeny (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>).

3.5.3 Predição dos alvos e vias dos miRNAs

A análise dos potências alvos e das vias gênicas moduladas pelos miRNAs selecionados foi realizada por meio do programa *Ingenuity Pathways Analysis* (IPA) versão 5.0 (*Ingenuity Systems - Qiagen*, EUA). O IPA é um banco de dados carregado com informações revisadas individualmente e onde é possível realizar a interligação de resultados de estudos genéticos com essas informações anteriormente descritas, criando redes gênicas, avaliando as interligações com várias vias celulares, predizendo biomarcadores, ou pontos de ação de novas moléculas. No estudo atual, o IPA foi utilizado na predição de alvos de miRNAs de interesse e na determinação de potenciais novas vias na tumorigênese adrenocortical.

4 RESULTADOS

4.1 Comparação do perfil de expressão de miRNAs entre tumores adrenocorticais malignos e benignos *versus* tecido normal do córtex da suprarrenal

4.1.1 Tumores da população adulta *versus* tecido normal

A comparação entre adenomas adrenocorticais (4 amostras) diagnosticados em adultos e o tecido normal representado pelo pool comercial revelou 95 genes com desregulação, a grande maioria (90,5%) apresentando hiperexpressão. Após correção para múltiplos testes com método de Benjamini-Hochberg, 63 genes mantiveram significância estatística, todos com expressão aumentada em adenomas quando comparados ao tecido normal (dados não publicados).

A comparação entre carcinomas adrenocorticais diagnosticados em adulto (13 amostras) e o tecido normal revelou 85 genes com alteração de expressão, em sua maioria (96,4%) com aumento da expressão em tecido tumoral. Após a correção estatística para múltiplos teste com método de Benjamini-Hochberg, 60 genes mantiveram sua significância estatística (dados não publicados). Os genes miR-98 e miR-562 foram os únicos a apresentarem perda de expressão, enquanto os genes miR-30d, miR-223, miR-17 e miR-16 estavam entre os com maior ganho de expressão nos carcinomas. Vale ressaltar que vários miRNAs da família let-7 apresentaram ganho de expressão em carcinomas em relação ao tecido normal.

4.1.2 Tumores da população pediátrica versus tecido normal

A comparação entre adenomas da população pediátrica (14 amostras) e o tecido normal revelou 61 genes com desregulação. A grande parte desses genes (91,8%) demonstrou ganho de expressão em tecido tumoral, com apenas 5 genes apresentando perda de expressão. Após correção para múltiplos testes, 31 genes mantiveram significância estatística, com o miR-98 sendo o único a apresentar perda de expressão, e os miR-30d, miR-223, miR-17 e miR-16 estando entre os com maior ganho (dados não publicados).

A comparação entre carcinomas da população pediátrica (5 amostras) e o tecido normal revelou 79 genes com desregulação. O miR-98 foi o único com perda de expressão. Os miR-30d, miR-17, miR-223 e miR-454 apresentaram maior ganho de expressão. Após correção para múltiplos testes, 55 genes mantiveram significância estatística, todos com aumento de expressão em carcinomas pediátricos em relação ao tecido normal (dados não publicados). Novamente, chamou a atenção a presença de miRNAs da família let-7, além do miR-483, com ganho de expressão em carcinomas em relação ao tecido normal.

4.1.3 Análise dos genes diferentemente expressos entre os grupos de interesse

Quatro distintos grupos de interesse foram constituídos de acordo com as características histológicas do tumor, evolução clínica (adenoma e carcinoma), e faixa etária no momento do diagnóstico (crianças e adultos). Os miRNAs diferentemente expressos entre esses grupos de interesse e tecido normal foram inicialmente analisados através do estudo de conjuntos utilizando o diagrama de Venn (Figura 3). Após a identificação dos genes que apareciam repetidos entre os grupos de interesse, 85 miRNAs foram incluídos nessa análise, 65 por alteração em adenomas e 70 em carcinomas. Vinte e dois (25,8%) miRNAs alterados eram comuns à todos os grupos estudados. Treze (15,2%) miRNAs apresentaram alteração de expressão apenas em adenomas da população adulta. Não houve miRNAs que caracterizassem adenomas da população pediátrica. Nos carcinomas, sete (8,2%) miRNAs apresentaram alteração de expressão apenas em adultos enquanto cinco (5,8%) apresentaram alteração apenas em crianças. Considerando somente os 70 miRNAs alterados nos carcinomas, o perfil de expressão de adultos e crianças parece bastante semelhante, com somente 18 (25,7%) e 12 (17,1%) miRNAs caracterizando adultos e crianças, respectivamente. Alguns miRNAs apresentaram diferença de expressão em intersecções de interesse, como genes comuns aos adenomas e ausentes nos carcinomas (2 miRNAs), ou, comuns aos carcinomas e ausente nos adenomas (8 miRNAs), dados apresentados na Tabela 3.

Figura 3 - Gráfico de conjuntos de Veen. Representação gráfica dos conjuntos compostos pelos genes expressos em cada grupo estudado e suas interseções. Adulto ACA, adenomas de adultos; Ped ACA, adenomas pediátricos; Adulto ACC, carcinomas de adultos; Ped ACC, carcinomas pediátricos

Tabela 3 - MicroRNAs diferentemente expressos em adenomas e carcinomas adrenocorticais utilizando o diagrama de Veen

miRNAs exclusivos de Adulto ACA	miRNAs exclusivos de Adulto ACC	miRNAs exclusivos de Pediátrico ACC	miRNAs comuns a Adulto ACA e Pediátrico ACA	miRNAs comuns a Adulto ACC e Pediátrico ACC
miR-134-5p	miR-15b-3p	miR-1227-3p	miR-323-3p	miR-106b-3p
miR-139-5p	miR-212-3p	miR-483-3p	miR-409-3p	miR-1267
miR-151-5p	miR-378a-5p	miR-592		miR-1290
miR-222-3p	miR-520c-3p	miR-604		miR-181a-5p
miR-324-5p	miR-562	miR-99a-3p		miR-337-5p
miR-330-3p	miR-636			miR-34b-3p
miR-345-5p	miR-92a-1-5p			miR-550a-3p
miR-382-5p				miR-93-5p
miR-485-3p				
miR-491-5p				
miR-493-3p				
miR-770-5p				
miR-29c-5p				

Comparação entre o grupo de interesse e tecido adrenocortical normal. Genes diferentemente expressos ($p < 0,05$) após correção estatística para múltiplos testes pelo método de Benjamini-Hochberg. ACA: adenoma adrenocortical, ACC: carcinoma adrenocortical.

No intuito de avaliar o quanto o perfil de expressão de miRNAs dos grupos estudados seria capaz de distingui-los dos demais, foi realizado a análise por agrupamento hierárquico. Inicialmente, os grupos adulto e pediátrico foram avaliados isoladamente. Seguindo os critérios de seleção especificados anteriormente (ver Métodos), 24 miRNAs foram selecionados para construção de agrupamento hierárquico não supervisionado na população de adulta (Figura 4). Não houve uma clara distinção entre adenomas e carcinomas, porém, a maior parte dos adenomas permaneceu em uma mesma região. Quando analisado de acordo com a agressividade do tumor, medida pela ocorrência de metástase à distância, foi possível reconhecer um padrão de distribuição das amostras seguindo os três principais ramos do dendrograma. Assim, o ramo A selecionou um grupo com menor taxa de recorrência (40%), quando comparado ao ramo B (66%) e o ramo C (100%).

Foram selecionados 41 miRNAs para a construção do agrupamento hierárquico não supervisionado na população pediátrica. Mais uma vez, não houve uma clara distinção entre adenomas e carcinomas, porém, a maior parte dos carcinomas pediátricos permaneceu em uma mesma região (Figura 5). A seguir, foi realizado agrupamento hierárquico único utilizando os miRNAs selecionados na população adulta e pediátrica. O agrupamento de todas as amostras não revelou um padrão de distribuição reconhecível, tanto quando avaliado pela idade do diagnóstico dos pacientes como pela malignidade do tumor. A avaliação dos principais ramos do dendrograma demonstrou, porém, que os carcinomas pediátricos e adenomas de adultos tendiam a aparecer agrupados (ramos A e B respectivamente) (Figura 6).

Figura 4 - Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas da população adulta. Foram selecionados miRNAs com diferença estatisticamente significativa e de acordo com a variância entre os grupos de interesse, com a distância entre as amostras determinada pela sua distância Euclidiana e o agrupamento realizado pela ligação completa (*complete linkage*). No gráfico, a cor verde significa genes hipoexpresso e a cor vermelha genes hiperexpresso. Os ramos principais do dendrograma foram identificados e separados em grupos (A, B, C). A barra inferior identifica os adenomas (azul) e carcinomas (vermelho). A ocorrência de metástase à distância é identificada com a letra M na linha inferior

Figura 5 - Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas da população pediátrica. Foram selecionados miRNAs com diferença estatisticamente significativa e de acordo com a variância entre os grupos de interesse, com a distância entre as amostras determinada pela sua distância Euclidiana e o agrupamento realizado pelo ligação completa (*complete linkage*). No gráfico, a cor verde significa genes hipoexpresso e a cor vermelha genes hiperexpresso. A barra inferior identifica os adenomas (azul) e carcinomas (vermelho)

Figura 6 - Agrupamento hierárquico não supervisionado com adenomas e carcinomas combinando a população adulta e pediátrica. Foram selecionados miRNAs com diferença estatisticamente significativa e de acordo com a variância entre os grupos de interesse, com a distância entre as amostras determinada pela sua distância Euclidiana e o agrupamento realizado pelo ligação completa (*complete linkage*). No gráfico, a cor verde significa genes hipoexpresso e a cor vermelha genes hiperexpresso. Os ramos principais do dendrograma foram identificados e separados em grupos (A, B, C). A barra intermediária identifica adultos (amarelo) e crianças (verde). A barra inferior identifica os adenomas (azul) e carcinomas (vermelho). A ocorrência de metástase à distância é identificada com a letra M na linha inferior

4.2 Comparação do perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais benignos e malignos

A comparação entre adenomas e carcinomas de população adulta revelou 89 genes diferentemente expressos. Desses, 28 (31,5%) genes apresentaram perda de expressão, enquanto 61 (68,5%) genes apresentaram ganho de expressão em carcinomas. Dentre os miRNAs com maior perda de expressão estavam o miR-665, miR-608, miR-485-5p. Dentre os miRNAs com maior ganho estavam os miR-483-3p, miR-483-5p, miR-567 e miR-659 (Anexo C). Apenas 9 genes mantiveram a significância estatística quando realizado correção para múltiplos testes pelo método de Benjamini-Hochberg, todos com aumento de expressão em carcinomas em relação a adenomas (Tabela 4).

Tabela 4 - MicroRNAs com alteração de expressão em carcinomas de adultos tendo como referência adenomas de adultos

MicroRNA	Nível de expressão	P-valor
hsa-miR-106b-3p	36,15	0,0485
hsa-miR-1290	57,94	0,0116
hsa-miR-320b	67,62	0,0151
hsa-miR-449a	22,55	0,0485
hsa-miR-483-3p	541,27	0,0116
hsa-miR-483-5p	114,19	0,0485
hsa-miR-521	84,95	0,0485
hsa-miR-659-3p	132,15	0,0485
hsa-miR-892b	36,26	0,0485

Genes que mantiveram a significância estatística após correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg

A comparação entre adenomas e carcinomas da população pediátrica revelou 21 genes diferentemente expressos. Três miRNAs apresentaram perda expressão em carcinomas, o miR-376b-3p, miR-133b e miR-139-5p. Dentre os miRNAs com maior ganho de expressão em carcinomas estavam o miR-31-3p, miR-566 e miR-141-3p (Anexo D). Entretanto, após correção para múltiplos testes nenhum dos miRNAs manteve diferença estatisticamente significativa.

A avaliação dos miRNAs diferentemente expressos em carcinomas na comparação com adenomas revelou diferenças entre a população adulta e pediátrica. Oitenta e dois miRNAs foram característicos da população adulta enquanto 14 apresentaram alteração de expressão apenas em crianças. Sete miRNAs eram comuns aos dois grupos, representando 7,9% e 33,3% dos miRNAs com alteração de expressão em adultos e crianças, respectivamente (Tabela 5).

Tabela 5 - MicroRNAs diferentemente expressos entre adenomas e carcinomas e comuns à população adulta e pediátrica

microRNA	Nível de expressão em adultos	Nível de expressão em crianças
miR-106-3p	36,15	7,41
miR-139-5p	-8,71	-5,64
miR-141	23,10	45,33
miR-34b-3p	14,92	5,69
miR-449a	22,55	7,96
miR-523-3p	29,01	9,80
miR-572	12,80	10,50

microRNAs diferentemente expressos ($p < 0,05$) sem correção do P-valor para múltiplos testes.

4.2.1 Avaliação de microRNAs específicos para o diagnóstico de carcinoma adrenocortical

Com o objetivo de avaliar a capacidade de miRNAs específicos em diferenciar adenomas de carcinomas da suprarrenal, foram selecionados os miR-106b, miR-1290 e miR-483-3p para construção de curva ROC. Os três miRNAs foram escolhidos por apresentarem expressão significativamente alterada exclusivamente em carcinomas quando comparados com a amostra normal (Figura 3), e terem apresentado diferença com significância estatística na comparação entre adenomas e carcinomas de adultos (Tabela 4).

Os três miRNAs selecionados demonstraram acurácia melhor na distinção entre adenomas e carcinomas em adultos do que em crianças. O miR-106b apresentou uma área sob a curva (AUC) de 0,961 (IC 95% 0,869 a 1,054; $p=0,006$) em adultos e AUC = 0,841 (IC 95% 0,603 a 1,025; $p=0,041$) em crianças. O miR-483-3p também demonstrou melhores resultados em adultos, com AUC = 0,961 (IC 95% 0,872 a 1,051; $p=0,006$) e AUC = 0,514 (IC 95% 0,251 a 0,777; $p=0,9$) em adultos e crianças, respectivamente. O miR-1290 apresentou o melhor resultado em adultos, com AUC = 1,0 (IC 95% 1,0; $p=0,003$) contra AUC = 0,614 (IC 95% 0,344 a 0,884; $p=0,45$) em crianças (Figura 7). Assim, com um nível de expressão do miR-1290 menor que 10,3 seria possível o diagnóstico de adenoma com 100% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Figura 7 - Curva ROC com os microRNAs selecionados para distinção de adenomas e carcinomas. As curvas foram construídas com o resultado do nível de expressão das amostras (4 adenomas de adulto, 13 carcinomas de adulto, 14 adenomas pediátrico, 5 carcinomas pediátricos). A área sob a curva esta representada no gráfico. O miR-1290 demonstrou melhor acurácia dentre os escolhidos microRNAs (AUC=1,0)

4.3 Comparação do perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais da população adulta e pediátrica

A oncogênese adrenocortical na população pediátrica apresenta dependência de vias intracelulares distintas. Com o intuito de realçar as diferenças de expressão dos miRNAs nessas amostras, realizamos a comparação direta entre o grupo de tumores da população pediátrica utilizando o grupo de tumores da população adulta como referência.

4.3.1 Adenomas na população adulta versus população pediátrica

Quando comparado aos adenomas de adultos, os adenomas pediátricos apresentaram 38 miRNAs com expressão alterada. A maior parte desses miRNAs apresentavam redução da sua expressão na população pediátrica. Os miR-635, miR-139-5p e miR-34a foram os mais hipoexpressos. Apenas 8 miRNAs apresentaram aumento de expressão em adenomas pediátricos quando comparados a adenomas em adultos, entre eles o miR-483-3p e miR-483-5p (Anexo E). Quando aplicado a correção para múltiplos testes, apenas o miR-483-3p e o miR-483-5p mantiveram sua significância estatística (Tabela 6).

Tabela 6 - MicroRNAs com alteração de expressão em adenomas pediátricos tendo como referência adenomas de adultos

MicroRNA	Nível de expressão	P- valor
hsa-miR-483-3p	1191,82	0,009
hsa-miR-483-5p	329,52	0,009

Genes que mantiveram a significância estatística após correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg

4.3.2 Carcinomas na população adulta versus população pediátrica

A comparação entre carcinomas da população adulta e carcinomas pediátricos revelou 4 miRNAs hiperexpressos nos carcinomas pediátricos (miR-566, miR-92b-5p, miR-33a-3p, miR-27b-5p). Outros 26 miRNAs apresentaram significativa redução de expressão em carcinomas pediátricos, entre eles o miR-204-5p e o miR-139-5p (Anexo F). Após correção para múltiplos testes, entretanto, nenhum dos genes manteve significância estatística.

4.4 **Análise do perfil de expressão de miRNAs de acordo com alterações das vias IGF-2, Wnt e p53**

O estudo das amostras com hiperexpressão da via do IGF2 revelou 83 genes diferentemente expressos. Destes, 8 miRNAs apresentaram perda de expressão, enquanto 75 miRNAs apresentaram ganho de expressão em tumores com alteração dessa via (Anexo G). Após a correção para múltiplos testes, 4 miRNAs mantiveram significância estatística: miR-483-3p, miR-483-5p, miR-296-5p e miR-1290 (Tabela 7).

Tabela 7 - MicroRNAs com alteração de expressão em tumores com níveis elevados de expressão tendo como referência tumores com níveis baixos de expressão do gene *IGF2*

MicroRNA	Nível de expressão	P-valor *
hsa-miR-296-5p	36,70	0,0470
hsa-miR-1290	87,82	0,0112
hsa-miR-483-5p	333,31	0,0001
hsa-miR-483-3p	934,66	0,0001

Genes que mantiveram a significância estatística após correção do p-valor pelo método de Benjamini-Hochberg.

Entre as amostras previamente estudadas para expressão de β -catenina, a comparação revelou 46 miRNAs diferentemente expressos. Doze apresentaram aumento de expressão nas amostras com acúmulo anômalo de β -catenina, com o miR-101-5p e miR-381-3p dentre os mais hiperexpressos. Trinta e quatro genes apresentaram redução de expressão nas amostras com acúmulo anômalo de β -catenina. Os miR-675-5p, miR-409-5p e miR-136-3p foram os mais hipoexpressos (Anexo H). Após correção para múltiplos testes, porém, nenhum miRNA manteve diferença estatisticamente significativa.

Cinquenta e três miRNAs se mostraram diferentemente expressos entre as amostras previamente estudadas para mutação no exon 10 do gene *TP53*. Seis miRNAs demonstraram aumento de expressão, enquanto 47 demonstraram redução de expressão em amostras com presença de mutação do *TP53*. Os miR-455-3p, miR-204-5p e let-7i-3p apresentaram maior redução da expressão (Anexo I). Após correção para múltiplos testes, nenhum miRNA manteve significância estatística.

4.5 Análise de redes gênicas afetadas por microRNAs desregulados nos tumores adrenocorticais

Foram observadas redes gênicas potencialmente alteradas em todas as análises realizadas, envolvendo frequentemente vias de crescimento e proliferação celulares (Tabela 8). As redes gênicas mais representativa biologicamente foram selecionadas para representação. Analisando os miRNAs alterados entre adenomas e carcinomas pediátricos, foi representado rede gênica onde o gene *IGF1R* apresenta papel central, sendo alvo dos miRNAs hipoexpressos miR-133-3p, 139-5p, 376a-3p (Figura 8). O miR-184, hiperexpresso nessa rede, apesar de apresentar como alvo inibitório potencial o gene *IGF1R* havia sido relatado previamente em estudos envolvendo tumores adrenocorticais ⁽¹²⁷⁾. A análise dos miRNAs alterados entre adenomas e carcinomas de adultos revelou o miR483-3p em uma posição central em várias redes gênicas. Dentre as redes afetadas pelo miR-483-3p, chama a atenção o potencial papel inibitório sobre os reguladores de transcrição YAP1 e TEAD2 da via de controle de proliferação celular *Hippo* (Figura 9). A via *Hippo* está afetada em outras neoplasias mas o seu papel nos tumores adrenocorticais ainda não foi estudado ⁽¹⁴⁰⁾.

Tabela 8 - Redes gênicas obtidas com o uso do IPA para análise dos microRNAs alterados em tumores adrenocorticais. Escore IPA determina a chance dos microRNAs realmente afetarem a via predita. Um Escore IPA maior que 2 prediz uma forte interferência da via analisada

Comparações analisadas	Redes gênicas potencialmente afetadas	Escore IPA
Adenoma de adulto vs Carcinoma de adulto	Sinalização celular, metabolismo de ácidos nucleicos	33
	Câncer, morfologia tecidual, Crescimento e proliferação celular	29
	Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo, morfologia celular	28
Adenoma pediátrico vs Carcinoma pediátrico	Ciclo celular, câncer, distúrbios gastrointestinais	22
	Câncer, distúrbios gastrointestinais, injúria orgânica	16
	Câncer, morte celular, doenças hematológicas	3
Carcinoma de Adulto vs Carcinoma Pediátrico	Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo, cancer	26
	Distúrbios endócrinos, doenças gastrointestinais, distúrbios metabólicos	23
	Ciclo celular, crescimento e proliferação celular, sinalização celular	14
IGF2, hiperexpressão vs normal	Câncer, Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo	33
	Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo, morfologia celular	25
	Câncer, desenvolvimento orgânico, injúria orgânica	25
p53, mutados vs não mutados	Câncer, injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo	31
	Sinalização celular, moléculas de transporte, metabolismo de ácidos nucleicos	23
	Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo, câncer	22
Wnt, expressão anômala vs normal	Injúria orgânica, doenças do sistema reprodutivo, distúrbios de desenvolvimento	35
	Distúrbios hereditários, Doenças do sistema músculo-esquelético, Distúrbios do desenvolvimento	18
	Metabolismo dos carboidratos, transporte molecular	18

Figura 8 - Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre adenomas e carcinomas pediátricos. A alteração de expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade das cores (verde hipossensibilizado, vermelho hiperexpresso). Legenda na figura discrimina os símbolos utilizados.

Figura 9 - Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre adenomas e carcinomas de adultos. A alteração de expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade das cores (verde hipossensível, vermelho hipersensível). Legenda na figura discrimina os símbolos utilizados.

A análise das redes afetadas pelos miRNAs alterados nos tumores adrenocorticais com hiperexpressão do gene *IGF2* revelou a quimiocina CXCL12 em um papel central (Figura 10). A quimiocina CXCL12 aparece como alvo potencial de diversos miRNAs hiperexpressos em tumores com expressão aumentada do gene *IGF2*, sugerindo que essa via pode ter um papel biológico importante na tumorigênese adrenocortical. A via CXCL12 foi avaliada previamente em estudos de expressão gênica em tumores adrenocorticais, tanto em adultos como em crianças ^(79, 86, 141). Em todos os estudos, incluindo um realizado pelo nosso grupo, o CXCL12 aparece hipoexpresso.

Figura 10 - Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a expressão do gene *IGF2*. A alteração de expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade das cores (verde hipoxpresso, vermelho hiperexpresso). Legenda na figura discrimina os símbolos utilizados.

A análise de uma das redes afetadas pelos miRNAs alterados nos tumores adrenocorticais com expressão anômala de β -catenina revelou o Cox-2 como potencial alvo, uma via celular previamente relacionada a via Wnt/ β -catenina (142) (Figura 11). Nessa rede, o gene *PTGS2*, que codifica a Cox-2, enzima que participa do metabolismo das prostaglandinas, apareceu como alvo principal de vários miRNAs desregulados. Alterações na via Cox-2 parecem ser importantes para o desenvolvimento de neoplasias de cólon, onde a via Wnt/ β -catenina tem papel reconhecidamente importante ⁽¹⁴³⁾. O papel da via Cox-2 em tumores adrenocorticais ainda não foi explorado.

A análise das redes gênicas afetadas pelo miRNAs desregulados nas amostras com mutação do supressor tumoral p53 revelou, como alvos potenciais, moléculas importantes nas vias de crescimento celular, como a Akt e Ras (Figura 12). Alguns miRNAs presentes como hipoexpressos nessa rede gênica, como o miR-34a, eram reconhecidos previamente como efetores da via do supressor tumoral p53 ⁽¹¹⁵⁾.

Figura 11 - Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a expressão anômala de β -catenina. A alteração de expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade das cores (verde hipoexpresso, vermelho hiperexpresso). Legenda na figura discrimina os símbolos utilizados

Figura 12 - Representação gráfica de uma rede gênica afetada pelo microRNAs alterados na comparação entre tumores de acordo com a presença da mutação p.R337H do supressor tumoral p53. A alteração de expressão dos microRNAs é representada pela gradação da intensidade das cores (verde hipoeexpresso, vermelho hiperexpresso). Legenda na figura discrimina os símbolos utilizados

5 DISCUSSÃO

Um único defeito genético raramente é suficiente para o desenvolvimento de uma neoplasia maligna ⁽¹⁴⁴⁾. Mesmo em situações onde são reconhecidas alterações germinativas, o desenvolvimento da neoplasia requer a somatória de eventos genéticos envolvendo oncogenes e genes supressores tumorais. Em neoplasias, regiões de perda e ganhos cromossômicos são consideradas como sítios prováveis de genes supressores e oncogenes, respectivamente, e ajudaram na identificação de mecanismos de carcinogênese. Entretanto, em várias regiões de alteração cromossômica não eram reconhecidos genes com potencial de participar do processo de tumorigênese. O reconhecimento dos miRNAs e da sua participação nos mecanismos de diferenciação, crescimento e proliferação tecidual levaram ao estudo destes como participantes do processo de desenvolvimento de neoplasias ⁽¹⁴⁵⁾. O reconhecimento da existência de miRNAs em regiões de alterações cromossômicas antes não justificadas foi o primeiro sinal ⁽¹⁴⁶⁾. Atualmente, os miRNAs são reconhecidos como atores importantes no desenvolvimento e crescimento de neoplasias, compondo uma classe denominada oncomiRs.

Em nosso estudo, avaliamos o perfil de expressão de 754 miRNAs em 36 tumores adrenocorticais benignos e malignos diagnosticados em crianças e adultos. Quatro grupos de interesse foram constituídos de acordo com as características histológicas do tumor, evolução clínica (adenoma e carcinoma), e faixa etária no momento do diagnóstico (crianças e adultos).

Inicialmente, realizamos a comparação entre o perfil de expressão de miRNAs de cada um dos quatro grupos de interesse com a amostra de tecido adrenal normal. Em nosso estudo, utilizamos RNA comercialmente disponível formado por 25 amostras de córtex de suprarrenal como referência de tecido adrenal normal. Observamos alteração de expressão em todos os grupos estudados, com 63 miRNAs desregulados nos adenomas e 60 miRNAs desregulados nos carcinomas de adultos, e 31 miRNAs desregulados nos adenomas e 55 miRNAs desregulados nos carcinomas das crianças. O ganho de expressão de miRNAs nos tecidos tumorais foi o evento mais frequentemente encontrado. É notável que a perda de expressão de miRNAs tem sido o evento mais comumente relatado em outras neoplasias malignas ⁽¹⁴⁷⁾. A perda de expressão de miRNAs nos tecidos neoplásicos teria, supostamente, papel ativo na carcinogênese, já que a maior parte dos alvos inibidos por esses miRNAs participariam de vias de proliferação e diferenciação celular ⁽¹⁴⁸⁾. Entretanto, os nossos achados confirmam estudos anteriores ^(130, 131). Schmitz *et al.* ⁽¹³⁰⁾ estudaram o perfil de 667 miRNAs em 9 adenomas e 7 carcinomas adrenocorticais obtidos a partir de amostras fixadas em parafina. Nesse estudo, a comparação entre o perfil de expressão dos carcinomas e amostra de córtex adrenal normal revelou 75 miRNAs hiperexpressos e 62 hipoexpressos. Ozata *et al.* ⁽¹³¹⁾ avaliaram em 26 adenomas e 22 carcinomas da suprarrenal um amplo perfil de expressão de miRNAs que incluiu 903 genes. A comparação entre o perfil de miRNAs de carcinomas e tecido adrenal normal revelou, novamente, o ganho de expressão como evento mais frequente, com 44 miRNAs

hiperexpressos e apenas 3 hipoexpressos em carcinomas. Além disso, e também de maneira semelhante aos nossos achados, foi observada a presença de membros da família let-7 entre os miRNAs hiperexpressos. A família de miRNAs let-7 contém treze membros localizados em nove diferentes cromossomos, está entre o miRNAs mais conservados entre as espécies, e é reconhecida como importante supressor tumoral por inibir vias importantes para o desenvolvimento de tumores, estando frequentemente hipoexpressa em outras neoplasias malignas ⁽¹⁴⁹⁾.

O segundo passo do nosso estudo foi a comparação entre o perfil de miRNA das amostras tumorais e o tecido adrenal normal por meio do gráfico de conjuntos de Venn. Esse gráfico permite, de uma maneira simples e rápida, a visualização de diferenças e semelhanças entre perfis de expressão gênica. Após a identificação dos genes que apareciam repetidos entre os grupos de interesse, 85 miRNAs foram utilizados para a construção do gráfico de conjuntos. A análise de conjuntos revelou que a maior intersecção, constituída por 22 miRNAs (25,8%), correspondia aos miRNAs desregulados comuns a todos os grupos tumorais, fazendo crer que esses seriam miRNAs com expressão alterada desde os primeiros momentos da tumorigênese (Figura 3). Quando focamos as atenções nos dois grupos de carcinoma, observamos que sete (8,2%) miRNAs apresentaram alteração de expressão apenas em adultos enquanto cinco (5,8%) apresentaram alteração apenas em crianças, sugerindo que esses tumores apresentariam perfis de expressão de miRNAs similares. Mesmo considerando somente os 70 miRNAs alterados nos carcinomas, o perfil de expressão de adultos e

crianças pareceu semelhante, com somente 18 (25,7%) e 12 (17,1%) miRNAs caracterizando adultos e crianças, respectivamente (Figura 3). Também foram observados miRNAs em intersecções de interesse e com potencial aplicação como biomarcadores (Tabela 3).

Com a intenção de avaliar o quanto o perfil de expressão de miRNAs dos grupos estudados seria capaz de distingui-los dos demais, realizamos a análise por agrupamento hierárquico de miRNAs selecionados. Infelizmente, não houve uma clara distinção entre as amostras de carcinoma e adenoma tanto na população adulta como na pediátrica (Figura 4 e Figura 5). Nos adultos, baseado nos três ramos principais do dendrograma, conseguimos identificar a separação de grupos divididos pela chance de recorrência (40% no ramo A, 66% no ramo B e 100% no ramo C). Duas amostras chamaram a nossa atenção pela localização dentro do agrupamento hierárquico: Adulto_14 e Adulto_15. A amostra Adulto_14 é proveniente de um carcinoma adrenal que evoluiu com ocorrência de metástase porém se posicionou no ramo A, entre amostras de adenomas. Entretanto, essa neoplasia apresenta características bastante indolentes, uma vez que o paciente permanece com tratamento exclusivo com mitotano após mais de cinco anos do diagnóstico de metástases à distância e com muito bom controle da doença neoplásica. A amostra Adulto_15 é proveniente de um adenoma de suprarrenal produtor de cortisol, com escore histopatológico de Weiss igual a 2, porém foi posicionado no ramo B entre os carcinomas. Talvez, esse tumor específico apresentasse maior potencial de malignização

ou, até, represente um caso de diagnóstico precoce de um carcinoma que estava em evolução ^(85, 129).

O agrupamento hierárquico das amostras pediátricas não conseguiu distinguir adenomas de carcinomas. Outros fatores, como a idade do diagnóstico ou agressividade tumoral, não foram distinguíveis. O agrupamento hierárquico onde foram incluídos os grupos adulto e pediátrico também não revelou um padrão de distribuição reconhecível, tanto quando avaliado pela idade do diagnóstico como pela malignidade do tumor. Houve, porém, a tendência da concentração dos carcinomas pediátricos e dos adenomas de adultos, localizados nos ramos A e B, respectivamente (Figura 6). A observação de interposição entre amostras benignas e malignas na avaliação por agrupamento hierárquico havia sido previamente relatada em estudos de perfil de expressão de microRNAs em tumores adrenocorticais, tanto na população adulta como pediátrica ^(128, 129, 131, 135). Soon *et al.* ⁽¹²⁸⁾ avaliaram a expressão de microRNAs em 27 adenomas e 22 carcinomas de córtex suprarrenal de pacientes adultos. O agrupamento hierárquico das amostras revelou um caso de carcinoma que apresentou boa evolução clínica entre o grupo de adenomas. Patterson *et al.* ⁽¹²⁹⁾ classificaram tumores adrenocorticais diagnosticados em adultos somente pelo seu comportamento clínico, e analisaram o perfil de expressão de miRNA em uma amostra constituída de 10 carcinomas e 26 adenomas. A análise por agrupamento hierárquico evidenciou a presença de 5 amostras de adenomas interpostas entre os carcinomas, fato atribuído pelos autores ao contínuo de evolução entre carcinomas e adenomas. Também Ozata *et al.*

⁽¹³¹⁾ observaram amostras de tecido classificado histologicamente como carcinoma interpostas entre os adenomas. No único estudo da literatura que aborda o perfil de expressão de miRNAs em tumores pediátricos, Doghman *et al.* ⁽¹³⁵⁾ avaliaram vinte e cinco amostras, todas classificadas quanto à malignidade de acordo com critérios histopatológicos de Weiss. Nesse estudo anterior, vinte e seis microRNAs apresentaram alteração de expressão entre os tumores e o tecido adrenal normal. Análise não supervisionada baseada na expressão de microRNAs revelou a presença de três subgrupos: (1) de tecido normal, (2) de tumores com baixa chance de recidiva, e (3) de tumores com alta chance de recidiva. Entretanto, essa distinção não foi absoluta, estando presente amostras de tecido classificadas histologicamente como adenoma interpostas entre o subgrupo de carcinomas com elevada chance de recidiva, e de tecidos classificados histologicamente como carcinomas interpostas entre o subgrupo de tecido normal. A distinção entre grupos de tumores adrenocorticais pediátricos por meio de estudos de perfil de expressão gênica tem se mostrado imperfeita mesmo com o uso de painéis amplos de RNA mensageiro, demonstrando a grande interposição de padrão genético nessa população ⁽⁸⁶⁾.

Um dos pontos de interesse do nosso estudo foi a comparação do perfil de expressão de miRNAs entre tecido benigno e maligno da suprarrenal. Nossa comparação revelou o ganho de expressão como a ocorrência mais comum entre os miRNAs desregulados em carcinomas tanto de adultos como de crianças. Em adultos, nove miRNAs apresentaram diferença de expressão com significância estatística após correção para

múltiplos testes. O miR-483, tanto -3p quanto -5p, apareceram em posição de destaque devido a grande diferença em seu nível de expressão entre os grupos. Localizado no intron 2 do gene *IGF2*, a hiperexpressão do miR-483 tem sido um resultado comum à vários estudos de perfil de expressão com tumores adrenocorticais ^(128, 129, 131, 135) (Tabela 9). A expressão de miR-483 e *IGF2* parecem reguladas pelos mesmos fatores e provavelmente apresentam ações biológicas semelhantes ^(129, 133, 134). Em crianças, a comparação do perfil de expressão de miRNAs entre adenomas e carcinomas revelou 21 genes diferentemente expressos, com somente três hipoexpressos (miR-376b-3p, miR-133b, miR-139-5p). Entretanto, essa diferença não se manteve estatisticamente significativa após correção para múltiplos testes.

Tabela 9 - Alteração do perfil de expressão de microRNA entre adenomas e carcinomas adrenocorticais em estudos prévios

Estudo	Alteração observada	microRNA
Tombol, 2009⁽¹²⁷⁾	Ganho de expressão	mir-196b, mir-210, mir-184, mir-376a, mir-506, mir-181b#, mir-181d, mir-192, mir-424, mir-503#, mir-215, mir-615
	Perda de expressão	mir-375, mir-222#, mir-214, mir-491, mir-511, mir-342, mir-30e-3p, mir-365, mir-299-5p, mir-485-5p
Soon, 2009⁽¹²⁸⁾	Ganho de expressão	miR-339-5p, miR-130b, miR-483-5p, miR-106b, miR-148b, miR-93, miR-135a, miR-320a, miR-503, miR-450a, miR-542-3p, miR-143, miR-181b, miR-542-5p
	Perda de expressão	miR-335, miR-195, miR-557, miR-708, miR-29c*, miR-617, miR-647, let-7c, miR-202
Patterson, 2011⁽¹²⁹⁾	Ganho de expressão	miR-665, miR-1246, miR-483-5p, miR-642, miR-1308
	Perda de expressão	miR-1290, miR-600, let-7a, miR-195, miR-126, miR-125a-5p, miR-26a, miR-193b, let-7d, miR-29a, miR-125b, let-7f, miR-26b, miR-214, miR-268-5p, miR-768-3p
Ozata, 2011⁽¹³¹⁾	Ganho de expressão	let-7a, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i, miR-106b, miR-125a-5p, miR-127-3p, miR-140-5p, miR-15b, miR-1975, miR-21, miR-210, miR-29a, miR-29b, miR-320b, miR-320c, miR-320d, miR-376c, miR-410, miR-424, miR-432, miR-483-3p, miR-483-5p, miR-487b, miR-503, miR-506, miR-513a-5p, miR-513b, miR-513c, miR-514, miR-720
	Perda de expressão	miR-101, miR-151-3p, miR-195, miR-1974, miR-1977, miR-199a-3p, miR-199a-5p, miR-202, miR-214, miR-29c*, miR-30a, miR-494, miR-497, miR-557, miR-572, miR-877*, miR-99a
Chabre, 2013⁽¹³²⁾	Ganho de expressão	miR-503, miR-514, miR-509-3P, miR-93, miR-148B, miR-508-3P, miR-513a-5p
	Perda de expressão	miR-335, miR-195, miR-497, miR-199a-3p, miR-199a-5p

A diferenciação entre carcinomas e adenomas é um ponto crucial para determinação de tratamento e prognóstico dos pacientes com tumor adrenocortical. A possibilidade de isolar miRNAs a partir de líquidos corporais o torna um potencial biomarcador. Por esse motivo, nós selecionamos alguns miRNAs para distinção potencial entre adenomas e carcinomas. Utilizamos três microRNAs diferentemente expressos entre adenomas e carcinomas no nosso estudo para a construção de uma curva ROC. Os três miRNAs selecionados apresentaram maior acurácia em adultos. Dentre eles, o miR-1290 foi o que apresentou melhores resultados na curva ROC, com uma área sob a curva (AUC) de 1,0. Assim, um nível de expressão de miR-1290 menor que 10,3 poderia diagnosticar um adenoma com 100% de sensibilidade e especificidade no grupo adulto. Distinção semelhante não foi possível no grupo pediátrico. A ampliação do número de amostras estudadas é necessária para confirmação desses resultados. Outros estudos tentaram utilizar miRNAs como biomarcadores em tumores adrenocorticais ^(127-129, 131, 135). Em pacientes com carcinoma de adrenal, Soon *et al.* ⁽¹²⁸⁾ relataram que o nível de expressão de miR-195 e miR-483-5p possibilitaria a separação de dois grupos com sobrevida distintas. Assim, a maior expressão de miR-195, bem como a menor expressão de miR-483-5p foram associados a menor sobrevida câncer-específico tanto isoladamente como em combinação. Ozata *et al.* ⁽¹³¹⁾ relataram que a hiperexpressão de miR-503, miR-1202 e miR-1275 estava associada a menor sobrevida em carcinomas de adultos. Patterson *et al.* ⁽¹²⁹⁾ avaliaram um grupo de miRNAs (miR-100, miR-125, miR-195 e miR-483-5p) na

tentativa de diferenciar adenomas de carcinomas. Dos quatro miRNAs avaliados, o miR-483-5p demonstrou melhor acurácia na curva ROC, com AUC de 0,943. Tombol *et al.* ⁽¹²⁷⁾ avaliaram três miRNAs (miR-184, miR-503 e miR-511) e relataram que a diferença entre a expressão do miR-511 e miR-503 conseguiria distinguir adenomas de carcinomas com uma sensibilidade de 100% e especificidade de 97%. Chabre *et al.* ⁽¹³²⁾ demonstraram que o miR-483-5p estava hiperexpresso em carcinomas e poderia ser isolado do soro, identificando um grupo de pior prognóstico. Doghman *et al.* ⁽¹³⁵⁾ avaliaram a capacidade dos miRNAs diferentemente expressos em distinguir adenomas de carcinomas da população pediátrica. Entretanto, não foi possível a determinação de microRNAs capazes de discriminar pacientes com e sem recidiva tumoral, resultado que se assemelha ao obtido no nosso estudo.

A comparação entre adenomas de crianças e adenomas de adultos revelou diferenças em diversos miRNAs, sendo a hipoexpressão de miRNAs nas amostras pediátricas o evento mais observado. Mas foram o miR-483-3p e miR-483-5p os únicos a apresentarem significância estatística após correção para múltiplos teste, ambos muito mais expressos em adenomas pediátricos do que em adenomas de adultos (Tabela 6). A comparação entre os carcinomas de adultos e pediátricos revelou o mesmo padrão inicial dos adenomas, com diferenças entre o perfil de expressão principalmente por hipoexpressão de miRNAs nos carcinomas pediátricos. Entretanto, após correção estatística para múltiplos testes, nenhum miRNA manteve diferença significativa.

Uma parte dos tumores utilizados no nosso estudo havia sido caracterizado previamente quanto a presença de mutação do supressor tumoral p53 (p.R337H), expressão anômala de β -catenina, e nível de expressão de *IGF2* ^(12, 72, 76). Assim, para avaliar se haveriam diferenças no perfil de expressão de microRNAs de acordo com as alterações dessas vias moleculares, comparamos: (1) tumores com presença *versus* ausência de hiperexpressão do *IGF2*; (2) tumores com presença *versus* ausência de expressão anômala de β -catenina; (3) tumores com presença *versus* ausência de mutação do *TP53*. A comparação entre amostras divididas de acordo com nível de expressão de *IGF2* revelou mais uma vez o miR-483-3p e miR-483-5p como significativamente hiperexpressos, achado esperado devido a co-expressão desse miRNA e o *IGF2* ⁽¹³⁴⁾. Dois outros miRNAs, o miR-296-5p e miR-1290, também apresentaram hiperexpressão significativa nas amostras com *IGF2* hiperexpresso. O miR-296-5p foi previamente caracterizado como inibidor da proteína pro-apoptótica PUMA ⁽¹⁵⁰⁾. O miR-1290 foi relatado como hiperexpresso em neoplasia maligna do cólon, outra neoplasia onde ocorre comumente hiperexpressão de *IGF2*, e parece ativar vias de crescimento celular como o Akt e Wnt / β -catenina ⁽¹⁵¹⁾.

A análise de redes gênicas e suas interrelações permite a melhor compreensão dos achados de estudos moleculares. O Ingenuity Pathway Analysis (IPA) é uma das ferramentas disponíveis para esse fim, criando redes gênicas que auxiliam na interpretação de dados assim como possibilitam a exploração de novos mecanismos celulares. Nós realizamos, por meio do IPA, a análise dos potenciais alvos dos miRNAs desregulados e

das redes gênicas potencialmente envolvidas (**Tabela 8**). A observação de que vias relacionadas ao câncer estavam entre as mais provavelmente afetadas reforça a importância biológica dos nossos achados. A avaliação dos miRNAs desregulados na comparação entre adenomas e carcinomas em crianças revelou resultados interessantes (Figura 8). A menor expressão do miR-133a-3p, miR-139-5p e miR-376-3p revelou o IGF1R como alvo comum dos três miRNAs. Apesar do miR-184, com expressão aumentada nos nossos resultados, dividir o mesmo alvo e parecer desenvolver ação antiproliferativa, biologicamente se demonstrou que este miRNA apresenta ação de oncogene em outras neoplasias ^(152, 153). O miR-184 foi identificado como hiperexpresso em tumores adrenocorticais previamente, reforçando a hipótese de sua ação como oncogene também no tecido da suprarrenal ⁽¹²⁷⁾.

A análise das redes gênicas afetadas pelos miRNAs diferentemente expressos nos carcinomas dos adultos chama a atenção a participação do miR-483 (Figura 9). Presente entre os miRNAs mais hiperexpressos nesse grupo, tanto o miR-483-3p quanto o miR-483-5p se apresentaram com papel central nas redes gênicas. Chama a atenção a ação do miR-483-3p sobre moléculas da via Hippo, como os genes *YAP1* e *TEAD2*. A via Hippo está entre umas das vias de crescimento celular mais conservadas entre mamíferos ⁽¹⁵⁴⁾. Diferentemente de outras vias de crescimento, a via Hippo não sofre ação de ligantes externos, mas parece ser ativado por proteínas presentes na membrana plasmática que participam dos mecanismos de adesão e polarização celular. Assim, a principal função da via em tecidos maduros seria de inibir o crescimento celular em situações de alta densidade

celular por meio da inibição do ativador de transcrição YAP1 ⁽¹⁵⁵⁾. A expressão aumentada do gene *YAP1*, responsável pela expressão do fator de transcrição, foi relatada em diversas neoplasias, sendo associado a estadiamento avançado e pior prognóstico ⁽¹⁴⁰⁾. Mais recentemente, o gene *YAP1* foi descrito como fundamental para a tumorigênese ocasionada pela hiperexpressão da β -catenina ⁽¹⁵⁶⁾. Entretanto, o fator de transcrição YAP1 parece exercer também uma ação supressora tumoral em alguns tecidos. Foi relatado que a presença da YAP1 no citoplasma levaria a ação antiproliferativa e que sua inibição por miRNAs com ação oncogênica seria necessária para o crescimento tumoral. Curiosamente, esses achados tem sido relatados em tumores com diferenciação neuroendócrina, como a neoplasia de pulmão de pequenas células e o carcinoma medular da tireóide ^(155, 157). O papel da via Hippo em tumores adrenocorticais ainda não foi explorado.

No estudo atual, detectamos que vários miRNAs hiperexpressos no grupo de tumores com ativação da via IGF2 parecem atuar na inibição da expressão da quimiocina CXCL12 (Figura 10). A CXCL12 é uma quimiocina potente inicialmente identificada como regulador da resposta imune, atuando na migração de linfócitos para tecidos inflamados ⁽¹⁵⁸⁾. Atua pela ligação principalmente no CXCR4, um receptor acoplado à proteína G. Posteriormente, a via CXCL12-CXCR4 foi implicada na disseminação e metástase, tendo sua expressão aumentada em diversas neoplasias malignas ⁽¹⁵⁹⁻¹⁶¹⁾. Apesar disso, a expressão do CXCL12 está diminuída em carcinomas adrenocorticais tanto em adultos como em crianças ^(79, 86).

Estudando vias relacionadas a metástase, nosso grupo confirmou a menor expressão de CXCL12 em carcinomas pediátricos ⁽¹⁴¹⁾. Curiosamente, esse achado se dá em uma população que apresenta, quase que invariavelmente, aumento da expressão do IGF2, sugerindo a presença de vias celulares mutuamente excludentes ⁽⁷²⁾. Nosso dado sugere que a hiperexpressão de alguns miRNAs seria o mecanismo pelo qual ocorre a inibição de CXCL12 nas células neoplásicas.

O entendimento da ação da via Wnt/ β -catenina nas neoplasias malignas veio, em grande parte, do estudo de famílias portadoras de Polipose Adenomatosa Familiar, uma síndrome de predisposição ao câncer associado a ocorrência de inúmeros pólipos em cólon e relacionada a presença de mutação inativadora no gene *APC* ⁽¹⁴²⁾. O gene *APC* é um regulador da via Wnt/ β -catenina agindo como gene supressor tumoral. Curiosamente, a perda da função do gene *APC* e ativação da via Wnt/ β -catenina esta associada a maior expressão da ciclooxygenase-2 (Cox-2), enzima limitante da conversão de ácido araquidônico em prostaglandinas e frequentemente hiperexpressa tanto em pólipos como em neoplasia malignas do cólon ⁽¹⁴³⁾. Além disso, o uso de inibidores da Cox-2 mostrou reduzir a dimensão dos pólipos e ser útil na prevenção de neoplasias malignas do cólon ⁽¹⁴²⁾. É interessante observar que a nossa análise dos miRNAs desregulados em amostras de tumores adrenocorticais com expressão anômala de β -catenina gerou uma rede onde o gene *PTGS2*, que expressa a enzima Cox-2, aparece em uma posição central (Figura 11). Por essa análise, o *PTGS2* sofreria ação por miRNAs tanto hiper- como

hipoexpressos. Estudos anteriores demonstraram que a hiperexpressão de *PTGS2* não ocorreria por duplicações ou translocações, devendo ocorrer por mecanismos translacionais e pós-translacionais ⁽¹⁴³⁾. A participação de miRNAs nesse controle já foi relatada ⁽¹⁶²⁾. Assim, o esclarecimento do papel da enzima Cox-2 na tumorigênese adrenal poderia levar à novas opções de tratamento para essa neoplasia.

A análise das possíveis redes gênicas influenciadas pelos miRNAs diferentemente expressos em amostras com mutação do exon 10 do gene *TP53* confirmou a ação destes como supressores tumorais (Figura 12). Grande parte dos miRNAs hipoexpressos nas amostras *TP53* mutadas tem como prováveis alvos moléculas importantes para o crescimento e proliferação celular, como o AKT e RAS. A menor expressão do miR34a, reconhecida como uma das vias efetoras do *TP53*, é um claro exemplo.

Algumas limitações do nosso estudo merecem ser comentadas. Com o intuito de permitir a comparação entre os grupos tumorais e o tecido normal, foi utilizado como tecido de referência um produto comercial constituído por RNA extraído pelo método de tiocianato-guanidina modificado e selecionado por cadeia poli-A (Clontech, certificate of analysis, lot number 7110209). Esses fatores poderiam levar a perda de miRNAs durante a extração. Foi relatado que a seleção de RNA por cadeia poli-A alterou o perfil de expressão de microRNA em um estudo ⁽¹⁶³⁾. Da mesma maneira, optamos pela não utilização da etapa de pré-amplificação, o que pode ter levado a não representação de miRNAs com muito baixa expressão nas amostras estudadas. Como foram excluídos da análise os

miRNAs sem expressão em um número representativo das amostras, isso pode, em parte, justificar o baixo número de genes hipoexpressos no nosso estudo. Além disso, a realização das reações de construção de cDNA em momentos diferentes durante o desenvolvimento do trabalho poderia ter influenciado esse achado, já que mesmo pequenas variações na reação podem se refletir em mudança de expressão de determinado gene. Nesse estudo foram utilizados apenas quatro amostras de adenoma de adulto para elaboração do perfil de expressão desse grupo, baseado no achado de estudos de expressão de RNA mensageiro que demonstraram um padrão uniforme nesse grupo ^(78, 79). Entretanto, como observado em outros estudos de perfil de expressão de miRNA em tumores adrenocorticais, algumas amostras de adenoma podem apresentar perfil mais próximo a carcinomas ^(129, 135). Nesse caso, o menor número de amostras nesse grupo pode ter dificultado a identificação de amostras com padrão distinto dos demais.

O estudo do perfil de expressão transcricional em diversas neoplasias ajudaram de maneira significativa na classificação dos tumores, na determinação de prognóstico, na previsão de resposta terapêutica, bem como na descoberta de genes e caracterização de suas vias de sinalização ^(148, 164). Recentemente, o estudo do perfil de expressão dos miRNAs vem acrescentando dados importantes, algumas vezes com vantagens em relação aos tradicionais estudos de RNA mensageiro ⁽⁹⁸⁾. Além disso, o seu potencial uso como biomarcador para diagnóstico e seguimento de neoplasias pode transformar os miRNAs em ferramentas importantes para a prática médica diária.

6 CONCLUSÕES

- 1- O perfil de expressão de microRNAs entre tumores adrenocorticais e tecido normal do córtex da suprarrenal revelou um grupo de microRNAs diferencialmente expressos em adultos e crianças.
- 2- O ganho de expressão de microRNAs foi o evento mais frequente encontrado nos tumores adrenocorticais.
- 3- O miR-483-3p está entre os microRNAs mais hiperexpressos em tumores adrenocorticais de adultos e crianças.
- 4- O miR-483-3p está mais expresso em carcinomas do que em adenomas da população adulta.
- 5- A expressão do miR-1290 foi capaz de distinguir adenomas de carcinomas com alta sensibilidade e especificidade.
- 6- O perfil de expressão de microRNAs é diferente em amostras de tumor adrenocortical caracterizados por alteração do IGF2, Wnt/ β -catenina, e p53.

Anexo A - Critérios histopatológicos de Weiss. As amostras foram classificadas de acordo com os achados histopatológicos de Weiss, sendo atribuído uma nota para cada característica. A somatória da pontuação classifica como carcinoma as amostras com pontuação maior ou igual a 3.

Critério	Valor do critério	
	0	1
Grau nuclear	1 e 2	3 e 4
Número de mitoses	≤ 5 / 50 campos 400x	≥ 6 / 50 campos 400x
Mitoses atípicas	Não	Sim
Células claras	$>25\%$	$\leq 25\%$
Arquitetura difusa	$\leq 33\%$ da superfície	$>33\%$ da superfície
Necrose confluyente	Não	Sim
Invasão venosa	Não	Sim
Invasão sinusoidal	Não	Sim
Infiltração capsular	Não	Sim

Anexo B - Estadiamento das neoplasias malignas primárias do córtex da suprarrenal.

Tumor primário (T)	
Tx	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
T1	Tumor ≤5cm na maior dimensão, confinado a adrenal
T2	Tumor >5cm, confinado a adrenal
T3	Tumor de qualquer tamanho com invasão local, mas sem invasão de órgãos adjacentes
T4	Tumor de qualquer tamanho com invasão de órgãos adjacentes
Linfonodos Regionais (N)	
Nx	Linfonodo regional não acessível
N0	Ausência de metástase linfonodal
N1	Presença de metástase linfonodal
Metástase a distância	
M0	Ausência de metástase a distância
M1	Presença de metástase a distância
Estadiamento	
Estadio I	T1 N0 M0
Estadio II	T2 N0 M0
Estadio III	T1-2 N1 M0 T3 anyN M0
Estadio IV	T4 anyN M0 anyTanyN M1

Anexo C - Lista de microRNAs diferentemente expressos em carcinomas de adulto tendo adenomas de adulto como referência. P-valor sem correção para múltiplos testes

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
has-miR-1305	MIMAT0005893	56,75	0,0013
has-miR-106b-3p	MIMAT0004672	36,15	0,0007
has-miR-1183	MIMAT0005828	14,43	0,0063
has-miR-1208	MIMAT0005873	21,30	0,0064
has-miR-1244	MIMAT0005896	24,87	0,0230
has-miR-1253	MIMAT0005904	17,87	0,0125
has-miR-1254	MIMAT0005905	11,60	0,0437
has-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	88,34	0,0045
has-miR-1270	MIMAT0005924	55,57	0,0025
has-miR-1275	MIMAT0005929	44,62	0,0056
has-miR-1282	MIMAT0005940	86,33	0,0043
has-miR-1290	MIMAT0005880	57,94	0,0000
has-miR-134-5p	MIMAT0000447	-15,69	0,0243
has-miR-139-5p	MIMAT0000250	-8,71	0,0159
has-miR-141-3p	MIMAT0000432	23,10	0,0019
has-miR-145-3p	MIMAT0004601	20,05	0,0101
has-miR-146b-5p	MIMAT0002809	-5,19	0,0490
has-miR-150-5p	MIMAT0000451	-5,44	0,0461
has-miR-15a-5p	MIMAT0000068	-9,00	0,0387
has-miR-16-5p	MIMAT0000069	-10,87	0,0073
has-miR-1825	MIMAT0006765	11,64	0,0480
has-miR-185-5p	MIMAT0000455	-11,23	0,0352
has-miR-186-5p	MIMAT0000456	-9,86	0,0086
has-miR-190a-5p	MIMAT0000458	10,47	0,0133
has-miR-195-5p	MIMAT0000461	-8,56	0,0150
has-miR-206	MIMAT0000462	7,88	0,0485
has-miR-218-5p	MIMAT0000275	-8,77	0,0065
has-miR-223-3p	MIMAT0000280	-9,65	0,0040
has-miR-24-3p	MIMAT0000080	-5,50	0,0280
has-miR-25-5p	MIMAT0004498	-8,00	0,0428
has-miR-28-3p	MIMAT0004502	-5,89	0,0118
has-miR-320b	MIMAT0005792	67,62	0,0001
has-miR-335-5p	MIMAT0000765	-6,05	0,0344
has-miR-337-5p	MIMAT0004695	10,86	0,0138
has-miR-345-5p	MIMAT0000772	-6,19	0,0124
has-miR-34a-5p	MIMAT0000255	-4,50	0,0406
has-miR-34b-3p	MIMAT0004676	14,92	0,0070
has-miR-374b-5p	MIMAT0004955	-4,14	0,0470
has-miR-376c-3p	MIMAT0000720	-13,39	0,0126
has-miR-432-3p	MIMAT0002815	21,10	0,0117
has-miR-449a	MIMAT0001541	22,55	0,0007
has-miR-449b-5p	MIMAT0003327	7,13	0,0154
has-miR-483-3p	MIMAT0002173	541,27	0,0000

continua

Anexo C - Lista de microRNAs diferentemente expressos em carcinomas de adulto tendo adenomas de adulto como referência. P-valor sem correção para múltiplos testes (conclusão)

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	114,19	0,0008
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	-63,01	0,0082
hsa-miR-487a-3p	MIMAT0002178	17,81	0,0072
hsa-miR-490-3p	MIMAT0002806	51,31	0,0037
hsa-miR-491-5p	MIMAT0002807	-9,61	0,0060
hsa-miR-493-3p	MIMAT0003161	-8,07	0,0403
hsa-miR-511	MIMAT0002808	-15,55	0,0161
hsa-miR-516b-3p	MIMAT0002860	39,34	0,0019
hsa-miR-517b	MIMAT0015949	51,94	0,0086
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	40,03	0,0036
hsa-miR-518b	MIMAT0002844	15,12	0,0114
hsa-miR-518d-3p	MIMAT0002864	30,08	0,0031
hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	5,53	0,0463
hsa-miR-519a-3p	MIMAT0002869	45,12	0,0076
hsa-miR-519e-3p	MIMAT0002829	58,62	0,0056
hsa-miR-520a-3p	MIMAT0002834	29,34	0,0090
hsa-miR-520c-3p	MIMAT0002846	16,09	0,0260
hsa-miR-520d-3p	MIMAT0002856	14,70	0,0169
hsa-miR-521	MIMAT0002854	84,95	0,0008
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	95,87	0,0021
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	29,01	0,0015
hsa-miR-524-3p	MIMAT0002850	11,11	0,0176
hsa-miR-542-3p	MIMAT0003389	7,70	0,0377
hsa-miR-545-3p	MIMAT0003165	60,46	0,0029
hsa-miR-564	MIMAT0003228	26,66	0,0080
hsa-miR-567	MIMAT0003231	259,03	0,0340
hsa-miR-571	MIMAT0003236	9,55	0,0494
hsa-miR-572	MIMAT0003237	12,80	0,0214
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	14,71	0,0431
hsa-miR-604	MIMAT0003272	47,23	0,0041
hsa-miR-608	MIMAT0003276	-73,40	0,0381
hsa-miR-618	MIMAT0003287	16,55	0,0110
hsa-miR-638	MIMAT0003308	12,84	0,0239
hsa-miR-639	MIMAT0003309	9,99	0,0334
hsa-miR-650	MIMAT0003320	49,57	0,0010
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	132,15	0,0004
hsa-miR-661	MIMAT0003324	35,16	0,0051
hsa-miR-663b	MIMAT0005867	25,63	0,0345
hsa-miR-665	MIMAT0004952	-263,04	0,0278
hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	-11,29	0,0333
hsa-miR-875-5p	MIMAT0004922	47,66	0,0087
hsa-miR-890	MIMAT0004912	-18,58	0,0288
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	36,26	0,0007
hsa-miR-92a-1-5p	MIMAT0004507	19,33	0,0151
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	77,23	0,0018
hsa-miR-99b-3p	MIMAT0004678	-6,67	0,0383

* . P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo D - Lista de microRNAs diferentemente expressos em carcinomas pediátricos tendo adenomas pediátricos como referência.

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
hsa-let-7a-3p	MIMAT0004481	5,72	0,027
hsa-miR-106b-3p	MIMAT0004672	7,41	0,045
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	-7,09	0,044
hsa-miR-135a-5p	MIMAT0000428	6,83	0,026
hsa-miR-135b-5p	MIMAT0000758	4,64	0,043
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-5,64	0,039
hsa-miR-141-3p	MIMAT0000432	45,33	0,041
hsa-miR-15b-3p	MIMAT0004586	11,76	0,036
hsa-miR-184	MIMAT0000454	28,02	0,029
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	149,81	0,009
hsa-miR-33a-3p	MIMAT0004506	8,61	0,016
hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	5,69	0,018
hsa-miR-361-3p	MIMAT0004682	29,24	0,032
hsa-miR-376b-3p	MIMAT0002172	-9,50	0,028
hsa-miR-449a	MIMAT0001541	7,96	0,038
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	9,80	0,041
hsa-miR-566	MIMAT0003230	133,47	0,004
hsa-miR-572	MIMAT0003237	10,50	0,015
hsa-miR-616-5p	MIMAT0003284	12,88	0,034
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	6,91	0,048
hsa-miR-92b-5p	MIMAT0004792	22,60	0,001

* . P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo E - Lista de microRNAs diferentemente expressos em adenomas pediátricos tendo adenomas de adultos como referência. P-valor sem correção para múltiplos testes.

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P.valor
hsa-miR-106b-3p	MIMAT0004672	9,71	0,046
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	-11,67	0,021
hsa-miR-1275	MIMAT0005929	19,44	0,040
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	-4,76	0,041
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	-37,30	0,001
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-14,84	0,007
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	-8,43	0,039
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	-25,07	0,000
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	-6,77	0,013
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	-4,55	0,049
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-9,21	0,008
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-10,72	0,009
hsa-miR-296-5p	MIMAT0000690	14,04	0,018
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	-6,44	0,034
hsa-miR-30c-5p	MIMAT0000244	-5,37	0,038
hsa-miR-328	MIMAT0004954	-5,95	0,030
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	-9,73	0,008
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	-12,43	0,050
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	-4,77	0,048
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-10,20	0,011
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	-25,08	0,006
hsa-miR-362-5p	MIMAT0000705	-8,22	0,047
hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	-4,55	0,049
hsa-miR-376a-5p	MIMAT0003386	10,56	0,026
hsa-miR-452-5p	MIMAT0001635	-12,51	0,025
hsa-miR-483-3p	MIMAT0002173	1191,82	0,000
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	329,52	0,000
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	-15,68	0,037
hsa-miR-487a-3p	MIMAT0002178	13,04	0,034
hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	-8,51	0,044
hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775	-16,94	0,005
hsa-miR-511	MIMAT0002808	-23,16	0,001
hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	-7,10	0,021
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	-10,75	0,022
hsa-miR-635	MIMAT0003305	-45,98	0,037
hsa-miR-650	MIMAT0003320	56,82	0,037
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-26,51	0,005
hsa-miR-708	MIMAT0004926	-29,17	0,005

* P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo F - Lista de microRNAs diferentemente expressos em carcinomas pediátricos tendo carcinomas de adultos como referência.

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
hsa-let-7b-3p	MIMAT0004482	-11,30	0,0456
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	-4,22	0,0351
hsa-miR-129-5p	MIMAT0000242	-8,51	0,0434
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	-4,68	0,0352
hsa-miR-133b	MIMAT0000770	-14,69	0,0190
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	-18,12	0,0173
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-9,62	0,0045
hsa-miR-182-5p	MIMAT0000259	-14,06	0,0143
hsa-miR-190a-5p	MIMAT0000458	-18,78	0,0005
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-20,58	0,0155
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	-109,54	0,0008
hsa-miR-211-5p	MIMAT0000268	-12,90	0,0291
hsa-miR-27b-5p	MIMAT0004588	9,41	0,0135
hsa-miR-338-3p	MIMAT0000763	-6,04	0,0467
hsa-miR-33a-3p	MIMAT0004506	15,08	0,0115
hsa-miR-362-3p	MIMAT0004683	-11,56	0,0417
hsa-miR-377-3p	MIMAT0000730	-7,82	0,0208
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-12,78	0,0050
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	-14,62	0,0476
hsa-miR-500a-5p	MIMAT0004773	-8,42	0,0205
hsa-miR-520f-3p	MIMAT0002830	-9,23	0,0151
hsa-miR-532-5p	MIMAT0002888	-9,82	0,0398
hsa-miR-548j-5p	MIMAT0005875	-13,75	0,0211
hsa-miR-566	MIMAT0003230	54,78	0,0044
hsa-miR-584-5p	MIMAT0003249	-17,87	0,0264
hsa-miR-625-5p	MIMAT0003294	-10,19	0,0029
hsa-miR-654-3p	MIMAT0004814	-11,69	0,0224
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	-10,04	0,0280
hsa-miR-92b-5p	MIMAT0004792	15,91	0,0110
hsa-miR-96-5p	MIMAT0000095	-10,36	0,0287

* P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo G - Lista de microRNAs diferentemente expressos em tumores com níveis elevados de expressão tendo como referência tumores com níveis de expressão baixa do gene *IGF2*.

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
has-miR-1305	MIMAT0005893	27,48	0,0101
has-miR-1	MIMAT0000416	19,52	0,0262
has-miR-106b-3p	MIMAT0004672	16,10	0,0090
has-miR-1208	MIMAT0005873	15,73	0,0347
has-miR-1238-3p	MIMAT0005593	15,56	0,0334
has-miR-1244	MIMAT0005896	18,99	0,0263
has-miR-1248	MIMAT0005900	-128,01	0,0082
has-miR-1253	MIMAT0005904	14,97	0,0326
has-miR-1254	MIMAT0005905	8,63	0,0346
has-miR-1255b-5p	MIMAT0005945	74,75	0,0061
has-miR-1264	MIMAT0005791	36,04	0,0270
has-miR-1267	MIMAT0005921	42,61	0,0012
has-miR-1270	MIMAT0005924	94,98	0,0015
has-miR-1275	MIMAT0005929	55,26	0,0004
has-miR-1276	MIMAT0005930	9,39	0,0396
has-miR-1282	MIMAT0005940	28,01	0,0420
has-miR-1290	MIMAT0005880	87,82	<0,0001
has-miR-130b-3p	MIMAT0000691	10,97	0,0233
has-miR-135a-5p	MIMAT0000428	12,77	0,0071
has-miR-135b-5p	MIMAT0000758	7,09	0,0243
has-miR-139-5p	MIMAT0000250	-7,89	0,0269
has-miR-141-3p	MIMAT0000432	39,38	0,0231
has-miR-149-3p	MIMAT0004609	37,33	0,0022
has-miR-181c-5p	MIMAT0000258	8,02	0,0194
has-miR-190b	MIMAT0004929	119,33	0,0040
has-miR-192-5p	MIMAT0000222	4,37	0,0491
has-miR-195-5p	MIMAT0000461	-5,49	0,0411
has-miR-200a-5p	MIMAT0001620	46,08	0,0058
has-miR-206	MIMAT0000462	12,87	0,0485
has-miR-215-5p	MIMAT0000272	8,33	0,0212
has-miR-218-5p	MIMAT0000275	-8,03	0,0030
has-miR-296-5p	MIMAT0000690	36,70	0,0002
has-miR-31-5p	MIMAT0000089	21,38	0,0236
has-miR-320b	MIMAT0005792	12,99	0,0367
has-miR-331-5p	MIMAT0004700	12,38	0,0473
has-miR-34b-3p	MIMAT0004676	8,33	0,0204
has-miR-363-3p	MIMAT0000707	10,93	0,0396
has-miR-375	MIMAT0000728	37,82	0,0003
has-miR-432-3p	MIMAT0002815	26,32	0,0022
has-miR-449a	MIMAT0001541	14,01	0,0084
has-miR-449b-5p	MIMAT0003327	10,43	0,0086

continua

Anexo G - Lista de microRNAs diferentemente expressos em tumores com níveis elevados de expressão tendo como referência tumores com níveis de expressão baixa do gene *IGF2*. (conclusão)

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
hsa-miR-483-3p	MIMAT0002173	934,66	<0,0001
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	333,31	<0,0001
hsa-miR-487a-3p	MIMAT0002178	17,87	0,0033
hsa-miR-490-3p	MIMAT0002806	25,80	0,0421
hsa-miR-506-3p	MIMAT0002878	22,89	0,0123
hsa-miR-509-3-5p	MIMAT0004975	51,03	0,0440
hsa-miR-511	MIMAT0002808	-7,32	0,0425
hsa-miR-516b-3p	MIMAT0002860	61,26	0,0005
hsa-miR-517b	MIMAT0015949	147,72	0,0189
hsa-miR-517c-3p	MIMAT0002866	39,35	0,0101
hsa-miR-518d-3p	MIMAT0002864	28,78	0,0163
hsa-miR-519a-3p	MIMAT0002869	83,43	0,0062
hsa-miR-519c-3p	MIMAT0002832	10,67	0,0436
hsa-miR-519e-3p	MIMAT0002829	76,54	0,0418
hsa-miR-520d-3p	MIMAT0002856	20,76	0,0058
hsa-miR-520g-3p	MIMAT0002858	518,91	0,0027
hsa-miR-521	MIMAT0002854	38,95	0,0261
hsa-miR-522-3p	MIMAT0002868	41,83	0,0266
hsa-miR-523-3p	MIMAT0002840	31,39	0,0013
hsa-miR-524-3p	MIMAT0002850	14,36	0,0233
hsa-miR-545-3p	MIMAT0003165	60,03	0,0054
hsa-miR-548p	MIMAT0005934	6,67	0,0484
hsa-miR-564	MIMAT0003228	55,95	0,0022
hsa-miR-571	MIMAT0003236	15,33	0,0090
hsa-miR-572	MIMAT0003237	10,15	0,0222
hsa-miR-582-3p	MIMAT0004797	7,95	0,0363
hsa-miR-592	MIMAT0003260	41,91	0,0064
hsa-miR-604	MIMAT0003272	83,87	0,0010
hsa-miR-608	MIMAT0003276	-27,32	0,0377
hsa-miR-617	MIMAT0003286	24,25	0,0127
hsa-miR-618	MIMAT0003287	14,29	0,0268
hsa-miR-639	MIMAT0003309	17,04	0,0441
hsa-miR-643	MIMAT0003313	17,57	0,0316
hsa-miR-650	MIMAT0003320	57,12	0,0062
hsa-miR-659-3p	MIMAT0003337	49,15	0,0073
hsa-miR-661	MIMAT0003324	11,90	0,0494
hsa-miR-665	MIMAT0004952	-184,82	0,0064
hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	-11,41	0,0315
hsa-miR-875-5p	MIMAT0004922	60,64	0,0076
hsa-miR-892b	MIMAT0004918	20,56	0,0093
hsa-miR-92a-1-5p	MIMAT0004507	16,70	0,0218
hsa-miR-939-5p	MIMAT0004982	13,73	0,0395

* P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo H - Lista de microRNAs diferentemente expressos em tumores com acúmulo anômalo (no núcleo celular) de beta-catenina tendo como referência tumores com expressão normal (na membrana celular).

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P.valor
hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	4,31	0,041
hsa-miR-101-5p	MIMAT0004513	78,26	0,028
hsa-miR-1179	MIMAT0005824	-9,19	0,025
hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	-6,15	0,028
hsa-miR-134-5p	MIMAT0000447	-6,97	0,028
hsa-miR-136-3p	MIMAT0004606	-24,25	0,003
hsa-miR-144-5p	MIMAT0004600	-5,41	0,030
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	-6,41	0,022
hsa-miR-202-5p	MIMAT0002810	-6,20	0,023
hsa-miR-20a-3p	MIMAT0004493	-7,48	0,012
hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	-11,03	0,022
hsa-miR-302b-3p	MIMAT0000715	18,91	0,036
hsa-miR-30a-3p	MIMAT0000088	-6,67	0,031
hsa-miR-335-3p	MIMAT0004703	-6,11	0,009
hsa-miR-337-3p	MIMAT0000754	-12,39	0,019
hsa-miR-340-3p	MIMAT0000750	-9,90	0,037
hsa-miR-369-5p	MIMAT0001621	-11,96	0,022
hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	-5,77	0,030
hsa-miR-373-3p	MIMAT0000726	12,07	0,016
hsa-miR-376a-3p	MIMAT0000729	-6,00	0,032
hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720	-10,03	0,012
hsa-miR-378a-5p	MIMAT0000731	-5,45	0,043
hsa-miR-381-3p	MIMAT0000736	23,23	0,009
hsa-miR-409-3p	MIMAT0001639	-14,24	0,007
hsa-miR-409-5p	MIMAT0001638	-35,39	0,040
hsa-miR-410-3p	MIMAT0002171	-9,56	0,039
hsa-miR-411-3p	MIMAT0004813	-11,90	0,040
hsa-miR-411-5p	MIMAT0003329	-5,18	0,032
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	9,75	0,048
hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	-12,11	0,011
hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	-14,77	0,049
hsa-miR-487b-3p	MIMAT0003180	-9,97	0,020
hsa-miR-493-3p	MIMAT0003161	-13,72	0,008
hsa-miR-499a-5p	MIMAT0002870	8,99	0,036
hsa-miR-500a-5p	MIMAT0004773	-14,73	0,009
hsa-miR-508-5p	MIMAT0004778	12,57	0,040
hsa-miR-520a-3p	MIMAT0002834	15,63	0,040
hsa-miR-543	MIMAT0004954	-6,33	0,047
hsa-miR-545-3p	MIMAT0003165	15,45	0,048
hsa-miR-550a-3p	MIMAT0003257	-5,41	0,017
hsa-miR-597-5p	MIMAT0003265	7,00	0,034
hsa-miR-616-3p	MIMAT0004805	12,29	0,036
hsa-miR-656-3p	MIMAT0003332	-10,29	0,027
hsa-miR-675-5p	MIMAT0004284	-38,02	0,003
hsa-miR-758-3p	MIMAT0003879	-14,64	0,015
hsa-miR-942-5p	MIMAT0004985	-7,50	0,007

* P-valor sem correção para múltiplos testes.

Anexo I - Lista de microRNAs diferentemente expressos em tumores com mutação tendo como referência tumores sem mutação no exon 10 do gene *TP53*.

MicroRNA	Identificação do miRBase	Nível de expressão	P-valor
hsa-let-7f-2-3p	MIMAT0004487	-2,85	0,047
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	-2,94	0,014
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	-12,40	0,011
hsa-miR-100-5p	MIMAT0000098	-2,29	0,042
hsa-miR-10a-5p	MIMAT0000253	-5,34	0,002
hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	-4,28	0,011
hsa-miR-1180-3p	MIMAT0005825	-4,70	0,029
hsa-miR-125a-5p	MIMAT0000443	-2,67	0,021
hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426	-2,20	0,039
hsa-miR-139-3p	MIMAT0004552	-7,21	0,016
hsa-miR-139-5p	MIMAT0000250	-5,78	0,004
hsa-miR-140-3p	MIMAT0004597	-3,04	0,026
hsa-miR-148a-3p	MIMAT0000243	-3,21	0,034
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	-2,73	0,040
hsa-miR-190b	MIMAT0004929	12,36	0,035
hsa-miR-191-3p	MIMAT0001618	-3,40	0,045
hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461	-5,39	0,002
hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	-2,75	0,029
hsa-miR-200a-3p	MIMAT0000682	-4,74	0,009
hsa-miR-203a	MIMAT0000264	-10,61	0,011
hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	-15,44	0,003
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	-2,56	0,043
hsa-miR-214-3p	MIMAT0000271	-2,54	0,029
hsa-miR-218-5p	MIMAT0000275	-3,20	0,013
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	-2,85	0,037
hsa-miR-26a-1-3p	MIMAT0004499	-6,34	0,007
hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082	-2,33	0,046
hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086	-2,63	0,047
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	-3,12	0,018
hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	-2,88	0,028
hsa-miR-335-5p	MIMAT0000765	-3,43	0,009
hsa-miR-339-5p	MIMAT0000764	-6,83	0,003
hsa-miR-342-3p	MIMAT0000753	-2,39	0,047
hsa-miR-345-5p	MIMAT0000772	-2,74	0,035
hsa-miR-34a-3p	MIMAT0004557	-3,45	0,013
hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	-6,61	0,004
hsa-miR-383-5p	MIMAT0000738	8,55	0,044
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	-4,65	0,035
hsa-miR-431-5p	MIMAT0001625	11,45	0,029
hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	-15,68	0,002
hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	-7,54	0,006
hsa-miR-483-3p	MIMAT0002173	11,10	0,021
hsa-miR-483-5p	MIMAT0004761	6,25	0,028
hsa-miR-488-3p	MIMAT0004763	-5,25	0,034
hsa-miR-500a-3p	MIMAT0002871	-8,11	0,006
hsa-miR-500a-5p	MIMAT0004773	-10,64	0,002
hsa-miR-501-5p	MIMAT0002872	-5,37	0,013
hsa-miR-502-3p	MIMAT0004775	-4,43	0,039
hsa-miR-593-3p	MIMAT0004802	17,75	0,027
hsa-miR-654-3p	MIMAT0004814	-6,86	0,011
hsa-miR-660-5p	MIMAT0003338	-2,90	0,050
hsa-miR-671-3p	MIMAT0004819	-4,19	0,037
hsa-miR-708-5p	MIMAT0004926	-6,57	0,015

* P-valor sem correção para múltiplos testes.

8 REFERÊNCIAS

1. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocrine reviews*. 1995;16:460-84.
2. Thompson GB, Young WF. Adrenal incidentaloma. *Current opinion in oncology*. 2003;15:84-90.
3. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer*. 2000;88(4):711-36. Epub 2000/02/19.
4. Roman S. Adrenocortical carcinoma. *Curr Opin Oncol*. 2006;18(1):36-42. Epub 2005/12/17.
5. Dackiw AP, Lee JE, Gagel RF, Evans DB. Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg*. 2001;25(7):914-26. Epub 2001/09/27.
6. Herbet M, Feige JJ, Thomas M. Insights into the role of genetic alterations in adrenocortical tumorigenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2009;300(1-2):169-74. Epub 2008/11/15.
7. Soon PS, McDonald KL, Robinson BG, Sidhu SB. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. *The oncologist*. 2008;13(5):548-61. Epub 2008/06/03.
8. Maher ER, Reik W. Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *The Journal of clinical investigation*. 2000;105(3):247-52. Epub 2000/02/17.
9. Malkin D. Li-fraumeni syndrome. *Genes & cancer*. 2011;2(4):475-84. Epub 2011/07/23.

10. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82(7):2027-31. Epub 1997/07/01.
11. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9330-5. Epub 2001/08/02.
12. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(10):4970-3. Epub 2001/10/16.
13. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Ali A, et al. A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000;85(2):637-44.
14. Luton JP, 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. *The New England journal of medicine.* 1990;322(17):1195-201.
15. Crucitti F, Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Crucitti P. The Italian Registry for Adrenal Cortical Carcinoma: analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. The ACC Italian Registry Study Group. *Surgery.* 1996;119(2):161-70.
16. Vassilopoulou-Sellin R, Schultz PN. Adrenocortical carcinoma. Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer.* 2001;92(5):1113-21.

17. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 2001;25(7):891-7.
18. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(5):838-45.
19. Stewart JN, Flageole H, Kavan P. A surgical approach to adrenocortical tumors in children: the mainstay of treatment. *Journal of pediatric surgery.* 2004;39(5):759-63.
20. Sahdev A, Reznick RH. Imaging evaluation of the non-functioning indeterminate adrenal mass. *Trends Endocrinol Metab.* 2004;15(6):271-6. Epub 2004/09/11.
21. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984;8(3):163-9. Epub 1984/03/01.
22. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer.* 1985;55(4):766-73. Epub 1985/02/15.
23. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol.* 1979;72(3):390-9. Epub 1979/09/01.

-
24. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 1989;13(3):202-6. Epub 1989/03/01.
 25. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Hormones & cancer*. 2011;2(6):333-40. Epub 2011/10/15.
 26. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1612-9. Epub 2002/12/03.
 27. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol*. 2003;27(7):867-81. Epub 2003/06/27.
 28. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol*. 1995;154(6):2004-9. Epub 1995/12/01.
 29. Fassnacht M, Allolio B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2009;23(2):273-89. Epub 2009/06/09.
 30. Allolio B, Fassnacht M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(6):2027-37. Epub 2006/03/23.

-
31. 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(3):155-86. Epub 1958/09/01.
 32. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol.* 1978;120(6):660-5. Epub 1978/12/01.
 33. Weiss L, Bertagna X, Chrousos G, Kawashima A, Kleihues P, Koch C, et al. Adrenal Cortical Carcinoma. Delellis R, Lloyd R, Heitz P, Eng C, editors: World Health Organization; 2004.
 34. Fassnacht M, Johansen S, Quinkler M, Bucszy P, Willenberg HS, Beuschlein F, et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. *Cancer.* 2009;115(2):243-50. Epub 2008/11/26.
 35. Wooten MD, King DK. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer.* 1993;72(11):3145-55. Epub 1993/12/01.
 36. Schulick RD, Brennan MF. Adrenocortical carcinoma. *World journal of urology.* 1999;17(1):26-34. Epub 1999/03/30.
 37. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol.* 2003;169(1):5-11. Epub 2002/12/13.
 38. Jensen JC, Pass HI, Sindelar WF, Norton JA. Recurrent or metastatic disease in select patients with adrenocortical carcinoma. Aggressive resection vs chemotherapy. *Arch Surg.* 1991;126(4):457-61. Epub 1991/04/01.

-
39. Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Lombardi CP, Crucitti P, Crucitti F, et al. Role of reoperation in recurrence of adrenal cortical carcinoma: results from 188 cases collected in the Italian National Registry for Adrenal Cortical Carcinoma. *Surgery*. 1997;122(6):1212-8. Epub 1998/01/14.
40. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):667-80. Epub 2005/09/21.
41. Haak HR, Hermans J, van de Velde CJ, Lentjes EG, Goslings BM, Fleuren GJ, et al. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. *Br J Cancer*. 1994;69(5):947-51. Epub 1994/05/01.
42. Williamson SK, Lew D, Miller GJ, Balcerzak SP, Baker LH, Crawford ED. Phase II evaluation of cisplatin and etoposide followed by mitotane at disease progression in patients with locally advanced or metastatic adrenocortical carcinoma: a Southwest Oncology Group Study. *Cancer*. 2000;88(5):1159-65. Epub 2000/03/04.
43. Baudin E, Pellegriti G, Bonnay M, Penfornis A, Laplanche A, Vassal G, et al. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. *Cancer*. 2001;92(6):1385-92. Epub 2001/12/18.
44. Hahner S, Fassnacht M. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*. 2005;6(4):386-94. Epub 2005/05/19.

-
45. Hermesen IG, Fassnacht M, Terzolo M, Houterman S, den Hartigh J, Lebouilleux S, et al. Plasma concentrations of o,p'DDD, o,p'DDA, and o,p'DDE as predictors of tumor response to mitotane in adrenocortical carcinoma: results of a retrospective ENS@T multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011;96(6):1844-51. Epub 2011/04/08.
46. Ahlman H, Khorram-Manesh A, Jansson S, Wangberg B, Nilsson O, Jacobsson CE, et al. Cytotoxic treatment of adrenocortical carcinoma. *World J Surg.* 2001;25(7):927-33. Epub 2001/09/27.
47. Fassnacht M, Terzolo M, Allolio B, Baudin E, Haak H, Berruti A, et al. Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. *The New England journal of medicine.* 2012;366(23):2189-97. Epub 2012/05/04.
48. Wortmann S, Quinkler M, Ritter C, Kroiss M, Johanssen S, Hahner S, et al. Bevacizumab plus capecitabine as a salvage therapy in advanced adrenocortical carcinoma. *Eur J Endocrinol.* 2010;162(2):349-56. Epub 2009/11/12.
49. Quinkler M, Hahner S, Wortmann S, Johanssen S, Adam P, Ritter C, et al. Treatment of advanced adrenocortical carcinoma with erlotinib plus gemcitabine. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(6):2057-62. Epub 2008/03/13.
50. Kroiss M, Quinkler M, Johanssen S, van Erp NP, Lankheet N, Pollinger A, et al. Sunitinib in refractory adrenocortical carcinoma: a phase II, single-arm, open-label trial. *J Clin Endocrinol Metab.* 2012;97(10):3495-503. Epub 2012/07/28.
51. Fraenkel M, Gueorguiev M, Barak D, Salmon A, Grossman AB, Gross DJ. Everolimus therapy for progressive adrenocortical cancer. *Endocrine.* 2013;44(1):187-92. Epub 2013/02/19.

-
52. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997;18(3):378-403. Epub 1997/06/01.
53. Ratcliffe J, Nakanishi M, Jaffe RB. Identification of definitive and fetal zone markers in the human fetal adrenal gland reveals putative developmental genes. *J Clin Endocrinol Metab.* 2003;88(7):3272-7. Epub 2003/07/05.
54. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):1110-5. Epub 1999/03/20.
55. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res.* 1996;56(18):4219-23. Epub 1996/09/15.
56. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(3):1116-21. Epub 1999/03/20.
57. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer.* 1999;81(2):300-4. Epub 1999/09/25.
58. Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, et al. Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol.* 1999;155(4):1039-45. Epub 1999/10/09.

-
59. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28(2):145-52. Epub 2000/05/29.
60. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(7):3467-74. Epub 2002/07/11.
61. Caron de Fromentel C, Pakdel F, Chapus A, Baney C, May P, Soussi T. Rainbow trout p53: cDNA cloning and biochemical characterization. *Gene*. 1992;112(2):241-5. Epub 1992/03/15.
62. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer*. 1993;54(3):408-10. Epub 1993/05/28.
63. Lin SR, Lee YJ, Tsai JH. Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(2):483-91. Epub 1994/02/01.
64. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(3):790-4. Epub 1994/03/01.
65. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, et al. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol*. 2001;145(2):207-12. Epub 2001/07/17.

-
66. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nature structural biology*. 2002;9(1):12-6. Epub 2001/12/26.
67. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC. Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(5):2976-81. Epub 2005/03/03.
68. Libe R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, et al. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res*. 2007;13(3):844-50. Epub 2007/02/10.
69. Koch CA, Pacak K, Chrousos GP. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(12):5367-84. Epub 2002/12/06.
70. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, et al. Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994;78(6):1444-53. Epub 1994/06/01.
71. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997;82(8):2559-65. Epub 1997/08/01.

-
72. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3524-31. Epub 2008/07/10.
73. Werner H, Karnieli E, Rauscher FJ, LeRoith D. Wild-type and mutant p53 differentially regulate transcription of the insulin-like growth factor I receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(16):8318-23. Epub 1996/08/06.
74. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22429-33. Epub 2006/06/24.
75. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, 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 Res.* 2005;65(17):7622-7. Epub 2005/09/06.
76. Heaton JH, Wood MA, Kim AC, Lima LO, Barlaskar FM, Almeida MQ, et al. Progression to adrenocortical tumorigenesis in mice and humans through insulin-like growth factor 2 and beta-catenin. *Am J Pathol.* 2012;181(3):1017-33. Epub 2012/07/18.
77. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(3):1819-29. Epub 2004/12/23.

-
78. Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006;154(4):587-98. Epub 2006/03/25.
79. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003;162(2):521-31. Epub 2003/01/28.
80. Fernandez-Ranvier GG, Weng J, Yeh RF, Khanafshar E, Suh I, Barker C, et al. Identification of biomarkers of adrenocortical carcinoma using genomewide gene expression profiling. *Arch Surg.* 2008;143(9):841-6; discussion 6. Epub 2008/09/17.
81. Laurell C, Velazquez-Fernandez D, Lindsten K, Juhlin C, Enberg U, Geli J, et al. Transcriptional profiling enables molecular classification of adrenocortical tumours. *Eur J Endocrinol.* 2009;161(1):141-52. Epub 2009/05/05.
82. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2009;27(7):1108-15. Epub 2009/01/14.
83. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res.* 2009;15(2):668-76. Epub 2009/01/17.

-
84. 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 Res.* 2010;70(21):8276-81. Epub 2010/10/21.
85. Assie G, Giordano TJ, Bertherat J. Gene expression profiling in adrenocortical neoplasia. *Mol Cell Endocrinol.* 2012;351(1):111-7. Epub 2011/11/08.
86. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2007;67(2):600-8. Epub 2007/01/20.
87. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans* *Cell.* 1993;75:855-62.
88. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998;391(6669):806-11. Epub 1998/03/05.
89. Hamilton AJ, Baulcombe DC. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science.* 1999;286(5441):950-2. Epub 1999/11/05.
90. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* 2009;136(4):642-55. Epub 2009/02/26.
91. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight. *Nat Rev Genet.* 2008;9:102-14.

-
92. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *The international journal of biochemistry & cell biology*. 2010;42(8):1316-29. Epub 2009/10/06.
93. Calin GA, Croce CM. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells. *Oncogene*. 2006;25(46):6202-10. Epub 2006/10/10.
94. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9. Epub 2002/11/16.
95. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med*. 2008;14(11):1271-7. Epub 2008/10/22.
96. Raveche ES, Salerno E, Scaglione BJ, Manohar V, Abbasi F, Lin YC, et al. Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood*. 2007;109(12):5079-86. Epub 2007/03/14.
97. Ventura A, Jacks T. MicroRNAs and cancer: short RNAs go a long way. *Cell*. 2009;136(4):586-91. Epub 2009/02/26.
98. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005;435(7043):834-8. Epub 2005/06/10.
99. Lee YS, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annual review of pathology*. 2009;4:199-227.

-
100. Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(26):15149-54. Epub 2001/12/14.
101. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, Di Leva G, Shimizu M, Wojcik SE, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1793-801. Epub 2005/10/28.
102. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008;299(4):425-36. Epub 2008/01/31.
103. Ranade AR, Cherba D, Sridhar S, Richardson P, Webb C, Paripati A, et al. MicroRNA 92a-2*: A Biomarker Predictive for Chemoresistance and Prognostic for Survival in Patients with Small Cell Lung Cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2010.
104. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*. 2006;9(3):189-98. Epub 2006/03/15.
105. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007;297(17):1901-8. Epub 2007/05/03.

-
106. Wurz K, Garcia RL, Goff BA, Mitchell PS, Lee JH, Tewari M, et al. MiR-221 and MiR-222 alterations in sporadic ovarian carcinoma: Relationship to CDKN1B, CDKN1C and overall survival. *Genes, chromosomes & cancer*. 2010;49:577-84.
107. Li X, Zhang Y, Zhang Y, Ding J, Wu K, Fan D. Survival prediction of gastric cancer by a seven-microRNA signature. *Gut*. 2010;59:579-85.
108. Chen CZ. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *The New England journal of medicine*. 2005;353(17):1768-71. Epub 2005/10/28.
109. Ota A, Tagawa H, Karnan S, Tsuzuki S, Karpas A, Kira S, et al. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*. 2004;64(9):3087-95. Epub 2004/05/06.
110. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*. 2005;435(7043):828-33. Epub 2005/06/10.
111. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47. Epub 2005/03/16.
112. Lee YS, Dutta A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*. 2007;21(9):1025-30. Epub 2007/04/18.
113. Kumar MS, Erkeland SJ, Pester RE, Chen CY, Ebert MS, Sharp PA, et al. Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(10):3903-8. Epub 2008/03/01.

-
114. Yu F, Yao H, Zhu P, Zhang X, Pan Q, Gong C, et al. let-7 regulates self renewal and tumorigenicity of breast cancer cells. *Cell*. 2007;131(6):1109-23. Epub 2007/12/18.
115. He L, He X, Lim LP, de Stanchina E, Xuan Z, Liang Y, et al. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*. 2007;447(7148):1130-4. Epub 2007/06/08.
116. Li J, Smyth P, Flavin R, Cahill S, Denning K, Aherne S, et al. Comparison of miRNA expression patterns using total RNA extracted from matched samples of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) cells and snap frozen cells. *BMC biotechnology*. 2007;7:36.
117. Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochemical and biophysical research communications*. 2009;390:1-4.
118. Chim SSC, Shing TKF, Hung ECW, Leung T-Y, Lau T-K, Chiu RWK, et al. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clinical chemistry*. 2008;54:482-90.
119. Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British journal of haematology*. 2008;141:672-5.
120. Heneghan HM, Miller N, Lowery AJ, Sweeney KJ, Newell J, Kerin MJ. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Annals of surgery*. 2010;251:499-505.

-
121. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2009;126:118-26.
122. Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2008;110:13-21.
123. Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*. 2007;13(3):313-6. Epub 2007/01/24.
124. Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkila P, Janne J, Voutilainen R. Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(3):1170-6. Epub 2002/03/13.
125. Iliopoulos D, Bimpaki EI, Nesterova M, Stratakis CA. MicroRNA signature of primary pigmented nodular adrenocortical disease: clinical correlations and regulation of Wnt signaling. *Cancer Res*. 2009;69(8):3278-82. Epub 2009/04/09.
126. Bimpaki EI, Iliopoulos D, Moraitis A, Stratakis CA. MicroRNA signature in massive macronodular adrenocortical disease and implications for adrenocortical tumourigenesis. *Clinical endocrinology*. 2010;72(6):744-51. Epub 2009/10/24.
127. Tombol Z, Szabo PM, Molnar V, Wiener Z, Tolgyesi G, Horanyi J, et al. Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(3):895-906. Epub 2009/06/24.

-
128. Soon PS, Tacon LJ, Gill AJ, Bambach CP, Sywak MS, Campbell PR, et al. miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. *Clin Cancer Res.* 2009;15(24):7684-92. Epub 2009/12/10.
129. Patterson EE, Holloway AK, Weng J, Fojo T, Kebebew E. MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. *Cancer.* 2011;117(8):1630-9. Epub 2011/04/08.
130. Schmitz KJ, Helwig J, Bertram S, Sheu SY, Suttorp AC, Seggewiss J, et al. Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. *Journal of clinical pathology.* 2011;64(6):529-35. Epub 2011/04/08.
131. Ozata DM, Caramuta S, Velazquez-Fernandez D, Akcakaya P, Xie H, Hoog A, et al. The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocr Relat Cancer.* 2011;18(6):643-55. Epub 2011/08/24.
132. Chabre O, Libe R, Assie G, Barreau O, Bertherat J, Bertagna X, et al. Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr Relat Cancer.* 2013;20(4):579-94. Epub 2013/06/13.
133. Baron-Bodo V, Horiot S, Lautrette A, Chabre H, Drucbert AS, Danze PM, et al. Heterogeneity of antibody responses among clinical responders during grass pollen sublingual immunotherapy. *Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology.* 2013;43(12):1362-73. Epub 2013/11/23.
134. Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, et al. Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res.* 2010;70(8):3140-9. Epub 2010/04/15.

-
135. Doghman M, El Wakil A, Cardinaud B, Thomas E, Wang J, Zhao W, et al. Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2010;70(11):4666-75. Epub 2010/05/21.
136. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8. Epub 2002/02/16.
137. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology.* 2002;3(7):RESEARCH0034. Epub 2002/08/20.
138. Li A, Yu J, Kim H, Wolfgang CL, Canto MI, Hruban RH, et al. MicroRNA array analysis finds elevated serum miR-1290 accurately distinguishes patients with low-stage pancreatic cancer from healthy and disease controls. *Clin Cancer Res.* 2013;19(13):3600-10. Epub 2013/05/24.
139. Hochberg Y, Benjamini Y. More powerful procedures for multiple significance testing. *Statistics in medicine.* 1990;9(7):811-8. Epub 1990/07/01.
140. Harvey KF, Zhang X, Thomas DM. The Hippo pathway and human cancer. *Nature reviews Cancer.* 2013;13(4):246-57. Epub 2013/03/08.
141. Lerario AM. Perfis de expressão de genes relacionados a metástases em uma coorte de pacientes adultos e pediátricos portadores de neoplasias do córtex da supra-renal. Faculdade de Medicina: Universidade de São Paulo; 2008.

-
142. Eisinger AL, Prescott SM, Jones DA, Stafforini DM. The role of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in colon cancer. *Prostaglandins & other lipid mediators*. 2007;82(1-4):147-54. Epub 2006/12/14.
143. Wu WK, Sung JJ, Lee CW, Yu J, Cho CH. Cyclooxygenase-2 in tumorigenesis of gastrointestinal cancers: an update on the molecular mechanisms. *Cancer letters*. 2010;295(1):7-16. Epub 2010/04/13.
144. Strillacci A, Valerii MC, Sansone P, Caggiano C, Sgromo A, Vittori L, et al. Loss of miR-101 expression promotes Wnt/beta-catenin signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. *The Journal of pathology*. 2013;229(3):379-89. Epub 2012/08/30.
145. Strillacci A, Griffoni C, Lazzarini G, Valerii MC, Di Molfetta S, Rizzello F, et al. Selective cyclooxygenase-2 silencing mediated by engineered E. coli and RNA interference induces anti-tumour effects in human colon cancer cells. *Br J Cancer*. 2010;103(7):975-86. Epub 2010/08/19.
146. Spisni E, Toni M, Strillacci A, Galleri G, Santi S, Griffoni C, et al. Caveolae and caveolae constituents in mechanosensing: effect of modeled microgravity on cultured human endothelial cells. *Cell biochemistry and biophysics*. 2006;46(2):155-64. Epub 2006/10/03.
147. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52. Epub 2000/08/30.
148. Deyell RJ, Attiyeh EF. Advances in the understanding of constitutional and somatic genomic alterations in neuroblastoma. *Cancer genetics*. 2011;204(3):113-21. Epub 2011/04/21.

-
149. da Silva MD, Silva RL, Costa Ferreira Neto JR, Guimaraes AC, Veiga DT, Chabregas SM, et al. Expression Analysis of Sugarcane Aquaporin Genes under Water Deficit. *Journal of nucleic acids*. 2013;2013:763945. Epub 2014/02/04.
150. Garcia Fernandez A, Chabrera C, Garcia Font M, Fraile M, Lain JM, Gonzalez S, et al. Mortality and recurrence patterns of breast cancer patients diagnosed under a screening programme versus comparable non-screened breast cancer patients from the same population: analytical survey from 2002 to 2012. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2013. Epub 2013/10/12.
151. Fron Chabouis H, Prot C, Fonteneau C, Nasr K, Chabreron O, Cazier S, et al. Efficacy of composite versus ceramic inlays and onlays: study protocol for the CECOIA randomized controlled trial. *Trials*. 2013;14:278. Epub 2013/09/06.
152. Wu GG, Li WH, He WG, Jiang N, Zhang GX, Chen W, et al. Mir-184 Post-Transcriptionally Regulates SOX7 Expression and Promotes Cell Proliferation in Human Hepatocellular Carcinoma. *PloS one*. 2014;9(2):e88796. Epub 2014/02/22.
153. Wong TS, Ho WK, Chan JY, Ng RW, Wei WI. Mature miR-184 and squamous cell carcinoma of the tongue. *TheScientificWorldJournal*. 2009;9:130-2. Epub 2009/02/17.
154. Johnson R, Halder G. The two faces of Hippo: targeting the Hippo pathway for regenerative medicine and cancer treatment. *Nature reviews Drug discovery*. 2014;13(1):63-79. Epub 2013/12/18.

-
155. Nishikawa E, Osada H, Okazaki Y, Arima C, Tomida S, Tatematsu Y, et al. miR-375 is activated by ASH1 and inhibits YAP1 in a lineage-dependent manner in lung cancer. *Cancer Res.* 2011;71(19):6165-73. Epub 2011/08/23.
156. Rosenbluh J, Nijhawan D, Cox AG, Li X, Neal JT, Schafer EJ, et al. beta-Catenin-driven cancers require a YAP1 transcriptional complex for survival and tumorigenesis. *Cell.* 2012;151(7):1457-73. Epub 2012/12/19.
157. Hudson J, Duncavage E, Tamburrino A, Salerno P, Xi L, Raffeld M, et al. Overexpression of miR-10a and miR-375 and downregulation of YAP1 in medullary thyroid carcinoma. *Experimental and molecular pathology.* 2013;95(1):62-7. Epub 2013/05/21.
158. Cojoc M, Peitzsch C, Trautmann F, Polishchuk L, Teleguev GD, Dubrovskaya A. Emerging targets in cancer management: role of the CXCL12/CXCR4 axis. *OncoTargets and therapy.* 2013;6:1347-61. Epub 2013/10/15.
159. Wald O, Shapira OM, Izhar U. CXCR4/CXCL12 axis in non small cell lung cancer (NSCLC) pathologic roles and therapeutic potential. *Theranostics.* 2013;3(1):26-33. Epub 2013/02/06.
160. Lee HJ, Jo DY. The role of the CXCR4/CXCL12 axis and its clinical implications in gastric cancer. *Histology and histopathology.* 2012;27(9):1155-61. Epub 2012/07/19.
161. Ehteshami M, Min E, Issar NM, Kasl RA, Khan IS, Thompson RC. The role of the CXCR4 cell surface chemokine receptor in glioma biology. *Journal of neuro-oncology.* 2013;113(2):153-62. Epub 2013/03/16.

-
162. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzzi G, Lazzarini G, et al. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Experimental cell research*. 2009;315(8):1439-47. Epub 2009/01/10.
163. Wang H, Ach RA, Curry B. Direct and sensitive miRNA profiling from low-input total RNA. *RNA*. 2007;13(1):151-9. Epub 2006/11/16.
164. Prat A, Ellis MJ, Perou CM. Practical implications of gene-expression-based assays for breast oncologists. *Nature reviews Clinical oncology*. 2012;9(1):48-57. Epub 2011/12/07.