

VANESSA UEMURA DA FONSECA

**Sequenciamento de transcritos completos e variantes de *splicing* da adrenal  
de cães**

SÃO PAULO

2022

VANESSA UEMURA DA FONSECA

**Sequenciamento de transcritos completos e variantes de *splicing* da adrenal de cães**

## **VERSÃO CORRIGIDA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutora em Ciências

**Departamento:** Reprodução Animal

**Área de Concentração:** Reprodução Animal

**Orientadora:** Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane

São Paulo

2022

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

### DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia BuffD'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 4210  
FMVZ

Fonseca, Vanessa Uemura da  
Sequenciamento de transcritos completos e variantes de *splicing* da adrenal de cães / Vanessa Uemura da Fonseca. – 2022.  
137 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Reprodução Animal, São Paulo, 2022.

Programa de Pós-Graduação: Reprodução Animal.

Área de concentração: Reprodução Animal.

Orientadora: Profª. Dra. Paula de Carvalho Papa Keohane.

1. CYP11B. 2. HSD3B. 3. Glândulas adrenais. 4. Cães. 5. Isoformas. I. Título.

**CERTIFICADO**

Certificamos que a proposta intitulada "O papel da 3B-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 e tipo 2 na glândula adrenal de cães ", protocolada sob o CEUA nº 4521290317, sob a responsabilidade de **Paula de Carvalho Papa e equipe; Vanessa Uemura da Fonseca** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (CEUA/FMVZ) na reunião de 03/08/2017.

We certify that the proposal "Characterization of 3B-hydroxysteroid desidrogenase type 1 and 2 in canine adrenal glands", utilizing 20 Dogs (males and females), protocol number CEUA 4521290317, under the responsibility of **Paula de Carvalho Papa and team; Vanessa Uemura da Fonseca** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the School of Veterinary Medicine and Animal Science (University of São Paulo) (CEUA/FMVZ) in the meeting of 08/03/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **06/2017** a **12/2019**

Área: **Reprodução Animal**

Origem: **HOVET/FMVZ/USP**

Especie: **Cães**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 15 anos**

N: **20**

Linhagem: **Sem especificação de raça**

Peso: **2 a 30 kg**

Resumo: Há uma crescente prevalência do hiperadrenocorticism (HAC) ou Síndrome de Cushing em cães de meia idade a idosos. Para controle da hipercortisolemia o tratamento amplamente empregado é com o fármaco trilostano, bloqueador da esteroidogênese adrenal. Sua ação na zona fasciculada e reticular tem como objetivo controlar os nível de glicocorticoides, promovendo desta forma, melhora clínica e laboratorial da doença. Entretanto, seu uso exige especial atenção quanto aos níveis eletrolíticos, visto que sua ação também na zona glomerulosa do cortex adrenal impacta na síntese e secreção da aldosterona. Embora o fármaco atue em todas as zonas do córtex adrenal, sugere-se que a magnitude de decréscimo hormonal não seja proporcional entre todas elas, visto que laboratorialmente raramente há hipercalemia significativa, o que nos faz pensar na possibilidade de diferentes tipos ou expressões enzimáticas entre as zonas adrenais. Hipotetizamos que as glândulas adrenais de cães expressem diferentes isoformas da enzima 3 $\beta$ -HSD nas zonas do córtex, o que confere especificidade na produção esteroidogênica e impacte na resposta clínica que cães com hiperadrenocorticism tem quando utilizado o medicamento trilostano para controle.

Local do experimento: As necrópsias dos animais que vieram a óbito no HOVET/FMVZ/USP (carta de ofício enviada ao HOVET, aguardando aprovação da bioética para posterior liberação dos cadáveres) serão realizadas na sala de estudos anatômicos no Setor de Anatomia do Departamento de Cirurgia ou na sala de necrópsia do Departamento de Patologia (ainda a ser solicitado após aprovação do projeto perante ao CEUA/FMVZ). As adrenais serão processadas no Laboratório para Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia sob responsabilidade da Profa. Dra. Paula de Carvalho Papa.

São Paulo, 15 de agosto de 2017

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais

Roseli da Costa Gomes  
Secretaria Executiva da Comissão de Ética no Uso de Animais





## Comissão de Ética no Uso de Animais

Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia  
Universidade de São Paulo

São Paulo, 12 de maio de 2022

CEUA N 4521290317

(ID 009065)

Ilmo(a). Sr(a).

Responsável: Paula De Carvalho Papa

Área: Reprodução Animal

Título da proposta: "Sequenciamento de transcritos completos e variantes de splicing da adrenal de cães".

### CERTIFICADO (Alteração do cadastro versão de 18/abril/2022)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 18/abril/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Após a ampliação do projeto para a técnica de sequenciamento IsoSeq da Pacific Biosciences, tem se um vasto dado do transcriptoma adrenal, o que possibilitou olhar para outras enzimas da cascata esteroidogênica. Com isso fez-se necessário uma solicitação de troca de título junto ao CEUA e adequação com os achados. Solicito a troca de título para ?Sequenciamento de transcritos completos e variantes de splicing da adrenal de cães?, ao invés de 'O papel da 3?-hidroxiesteroide desidrogenase tipo 1 e tipo 2 na glândula adrenal de cães' ".

*Comentário da CEUA: Título alterado atendendo solicitação do responsável*

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autora: FONSECA, Vanessa Uemura

Título: Sequenciamento de transcritos completos e variantes de *splicing* da adrenal de cães

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Reprodução Animal da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof(a). Dr(a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## DEDICO

Aos meus pais, José Malaquias da Fonseca (*in memorian*) e Luiza Michiko Uemura da Fonseca, meus exemplos de dignidade, perseverança, resiliência, esforço e vitória. Agradeço por me apoiarem em todas as decisões, por me darem suporte para chegar até aqui, a vocês tudo devo.

Ao meu amado marido, parceiro e presente de Deus, Vinícius Miranda Villas Bôas, pelo amor e companheirismo em todos os momentos ao longo desta tese, por estar ao meu lado quando obtive bons e maus resultados.

A estes amores pacientes e incondicionais dedico este momento

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Dra Paula de Carvalho Papa Keohane por todo seu conhecimento, minha primeira grande inspiração dentro da endocrinologia, agradeço por ter me mostrado um mundo imenso de possibilidades e dentro dele me dado oportunidades da primeira iniciação científica até a conclusão deste doutorado.

Às amigas que a vida científica me deu, que além de jamais deixarem de acreditar que eu conseguiria, sempre estiveram dispostas a me ajudar com ensinamentos e conselhos. Bianca Ferrarini Zanetti, Liza Margareth Medeiros de Carvalho Sousa, Ana Paula Mattoso Miskulin Cardoso e Danila Barreiro Campos toda minha admiração pelo conhecimento, mulheres e profissionais que vocês são.

À minha nova família da Universidade Santo Amaro, a docência e a convivência com vocês é um grande presente, me faz aprender diariamente e querer ser melhor a cada dia, agradeço por entenderem e me apoiarem na finalização deste projeto. Em especial agradeço aos meus coordenadores Rafael Garabet Agopian e Elizabeth Bohland, aos meus parceiros e amigos na disciplina de Clínica Médica professor Edilson Isídio da Silva Júnior e professora Juliana de Paula Nhanharelli, a todos os funcionários e residentes do HOVET-UNISA.

Aos professores, funcionários e pós-graduandos do Departamento de Reprodução Animal que sempre que precisei, estiveram dispostos a me ajudar a encontrar soluções. Meu agradecimento especial à professora Camila Infantosi Vannucchi, seu olhar de carinho e incentivo foi diversas vezes um grande estímulo e me deu confiança de que tudo daria certo. Obrigada!

Meu agradecimento especial à querida Harumi e ao seu trabalho de excelência, obrigada por nos receber e sempre procurar respostas para todas as demandas que levamos.

Ao melhor bioinformata, Osvaldo Reis Junior do Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho em Ciências da Vida (LaCTAD) da UNICAMP, pelas mil reuniões com muita paciência que me fizeram ter alguma noção de bioinformática e encontrar o meu caminho neste projeto.

Ao Professor Dr. Chin Jia Lin e à técnica Natalia Gomes Gonçalves, do laboratório de Patologia Molecular LIM 22 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo por me receberem e me ensinarem a técnica de microdissecção. Agradeço imensamente a Dra Nancy Francoeur e Dra Maya Fridrikh do Instituto Icahn de Ciência de Dados e Tecnologia Genômica da Escola de Medicina Icahn no Monte Sinai (NY, EUA) por me ajudarem a viabilizar o sequenciamento, otimizando o número de SMRTbell a serem usadas e maximizando os resultados.

Aos meus amigos Flavia Helena Bonetti Reijani e Felipe Reijani, que divido os atendimentos na nossa clínica, obrigada por entenderem minhas crises de ansiedade e serem grandes apoiadores na minha jornada.

Aos amigos da área da endocrinologia veterinária que tanto me inspiram diariamente, Priscila Viau Furtado, Karen Bluwol, Hilka Frisson, Ricardo Henrique Miziara, Rodrigo Ubukata e todos da diretoria da Associação Brasileira de Endocrinologia Veterinária.

Aos colegas do Laboratório de Estudos Morfofuncionais e Endocrinologia (LEME) e equipe do Setor de Anatomia, Francislaine Garcia, Cintia Pinto da Silva, professor José Roberto Kfoury Junior, Rose e Diogo, agradeço a colaboração no estudo e trocas científicas que vivenciamos.

À professora Claudimara Ferini Pacicco Lotfi e todos os pós-graduandos do seu Laboratório de Estrutura e Função celular, por abrirem o laboratório e me ensinar muito sobre cultivo celular.

Aos tutores que disponibilizaram seus animais para que com a ciência fosse possível descobertas importantes nesse projeto e em inúmeros outros.

Aos meus familiares e amigos que me apoiaram incondicionalmente, me deram força e entenderam minhas ausências. Todo meu amor e gratidão por vocês.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pelo apoio financeiro durante o período de realização da tese.

“Desistir... eu já pensei seriamente nisso  
Mas nunca me levei realmente a sério  
É que tem mais chão nos meus olhos  
do que o cansaço nas minhas pernas  
Mais esperança nos meus passos  
do que tristeza nos meus ombros  
Mais estrada no meu coração  
Do que medo na minha cabeça”

**(Cora Coralina)**

## RESUMO

FONSECA, V.U. **Sequenciamento de transcritos completos e variantes de *splicing* da adrenal de cães**. 137f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

Na nova era da genética, o mundo das “ômicas” revela novas informações para compreensão desde o código genético até a função de proteínas no organismo. O transcriptoma é definido como um conjunto de todas as moléculas de RNA expressas em uma determinada célula ou tecido. Entre as diferentes plataformas moleculares, ganham destaque o sequenciamento de RNA por *short reads*, o chamado RNA-seq, e por *long reads*, denominado Iso-Seq. A complexidade dos organismos está relacionada com mecanismos que expandem a capacidade codificadora do genoma, neste contexto, o *splicing* alternativo é um dos mecanismos moleculares capazes de aumentar significativamente o repertório proteico de um organismo. No *splicing* alternativo, contrário do que ocorre no *splicing* constitutivo em que a sequência de RNAm é fiel ao gene, os íntrons do pré-RNAm podem sofrer processamento, dando origem a uma ou mais isoformas. Hipotizamos que os genes HSD3B e CYP11B sintetizassem diferentes isoformas, cujas proteínas resultantes fossem a explicação para diferença na síntese de aldosterona e cortisol, bem como a diferente ação do trilostano nas zonas glomerulosa e fasciculada. Este projeto teve como objetivo principal caracterizar as isoformas das enzimas esteroideogênicas e de genes tumorigênicos no córtex adrenal de cães sem endocrinopatias e com endocrinopatia adrenal, diagnosticada como Síndrome de Cushing ACTH-independente. Esta tese apresenta dados da análise de sequenciamento de transcritos completos pelo Iso-Seq, baseado na tecnologia de Sequenciamento de Molécula Única em Tempo Real (SMRT) e dados complementares de RNA-seq do sequenciamento de córtex das glândulas adrenais de cães depositados em repositório público denominado *Sequence Read Archive* (SRA). Neste projeto foram sequenciados 4 córtex de glândulas adrenais não tumorais e 3 carcinomas adrenocorticais de cães. Foi demonstrado que há apenas um locus para o gene HSD3B e um locus para o gene CYP11B. Foi encontrado um grande número de isoformas para cada gene que codifica enzimas da cascata esteroideogênica. Os resultados foram filtrados pelo controle de qualidade *nonsense-mediated RNA decay* (NMD) e infere-se alta probabilidade de serem verdadeiras 96 isoformas dentre as 178 descritas do gene STAR, 11 isoformas verdadeiras de 33 descritas do gene CYP11A1, 1 isoforma verdadeira de 22 descritas do gene HSD3B, 14 isoformas verdadeiras de 74 descritas do gene CYP17A1, 14



isoformas verdadeiras de 48 descritas do gene CYP21A2, e 2 isoformas verdadeiras de 7 isoformas da CYP11B. Não há diferença significativa quanto a produção de isoformas dos genes SF-1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53, MC2R, SOAT1 e CTNNB1 no tecido tumoral e não tumoral em cães. Conclui-se que o sequenciamento de transcritos completos pela técnica Iso-Seq pelo sistema PacBio forneceram informações novas para melhorar a anotação do genoma do cão e compreender o mecanismo de expansão da capacidade dos genes da cascata esteroidogênica gerarem diferentes enzimas.

Palavras-chaves: CYP11B. HSD3B. Glândulas adrenais. Cães. Isoformas.

## ABSTRACT

FONSECA, V.U. **Full-length transcripts sequencing and splicing variants of canine adrenal glands.** 137f. Tese (Doutorado em Ciências)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, 2022.

In the new era of genetics, the world of “omics” reveals new information for understanding from the genetic code to the function of proteins in the organism. The transcriptome is defined as a set of all RNA molecules expressed in a specific cell or tissue. Among the different molecular platforms, RNA sequencing by short reads, called RNA-seq, and by long reads, called Iso-Seq, are highlighted. The complexity of organisms is related to mechanisms that expand the coding capacity of the genome, in this context, alternative splicing is one of the molecular mechanisms capable of significantly increasing the protein repertoire of an organism. In alternative splicing, contrary to what occurs in constitutive splicing in which the mRNA sequence is faithful to the gene, the pre-mRNA introns can undergo processing, giving rise to one or more isoforms. We hypothesized that the HSD3B and CYP11B genes synthesized different isoforms, whose resulting proteins could explain the difference in aldosterone and cortisol synthesis, as well as the different action of trilostane on the zona glomerulosa and fasciculata. The main objective of this project was to characterize the isoforms of steroidogenic enzymes and tumorigenic genes in the adrenal cortex of dogs without endocrinopathies and with adrenal endocrinopathy diagnosed as ACTH-independent Cushing's Syndrome. This thesis brings together data from the sequencing analysis of full transcripts by Iso-Seq, based on the Single Molecule Real-Time Sequencing (SMRT) and complementary RNA-seq data from sequencing the cortex of the adrenal glands of dogs, deposited in a public repository called Sequence Read Archive (SRA). In this project, 4 non-tumor adrenal cortex and 3 adrenocortical carcinomas of dogs were sequenced. It has been shown that there is only one locus for the HSD3B gene and one locus for the CYP11B gene. A large number of isoforms were found for each gene encoding enzymes of the steroidogenic cascade. The results were filtered by nonsense-mediated RNA decay (NMD) quality control and then it was inferred with a high probability of being true 96 isoforms of the 178 described of the STAR gene, 11 true isoforms of 33 described of the gene CYP11A1, 1 true isoform of 22 described of the gene HSD3B, 14 true isoforms of 74 described isoforms of the CYP17A1 gene, 14 true isoforms of 48 described of the CYP21A2 gene, and 2 true isoforms of 7 isoforms of CYP11B. There is no significant difference in the production of isoforms of the SF-1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53, MC2R, SOAT1 and

CTNNB1 genes in tumor and non-tumor tissue in dogs. It is concluded that the sequencing of complete transcripts by the technique Iso-Seq by the PacBio system provided new information to improve the annotation of the dog genome and to understand the mechanism of expansion of the capacity of the genes of the steroidogenic cascade to generate different enzymes.

Keywords: CYP11B. HSD3B. Adrenal glands. Dogs. Isoforms.

## LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

3bHSD	Enzima 3beta-hidroxiesteroide desidrogenase
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
AGP	Primórdio adrenogonadal
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMRC5	<i>Armadillo Repeat Containing 5</i>
Ang1	Angiopoetina 1
Ang2	Angiopoetina 2
AVP	Arginina vasopressina
bFGF	Fator de crescimento fibroblástico básico
CRH	Hormônio liberador da corticotrofina
CTNNB1	Catenina beta 1
CYB5	Citocromo b5
CYP11A1	Gene que codifica a P450 <sub>scc</sub>
CYP11B1	Gene que codifica a P450 <sub>11beta</sub>
CYP11B2	Gene que codifica a P450 <sub>aldo</sub>
CYP17A1	Gene que codifica a P450 <sub>17alfa,liase</sub>
CYP19A1	Gene que codifica a enzima aromatase
CYP21A2	Gene que codifica a 21-hidroxilase
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Sulfato de dehidroepiandrosterona
DOC	Desoxicorticosterona
ERBB2	Receptor do fator de crescimento epidérmico membro da família do homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritroblástica
FSM	<i>Full Splice Match</i>
GATA4	<i>GATA-binding protein 4</i>
GIPR	Receptor do peptídeo inibidor gástrico
GLUT4	Transportador de glicose 4
GNAS	Gene que codifica a subunidade alfa da proteína G estimulatória
HAC	Hiperadrenocorticismo
HAMP	Hiperplasia adrenal macronodular primária
hCG	Gonadotrofina coriônica humana

HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HHA	Hipotálamo hipófise adrenal
HSD3B	Gene que codifica a 3beta-HSD
HSD3B1	Gene que codifica a 3beta-HSD do tipo I
HSD3B2	Gene que codifica a 3beta-HSD do tipo II
HTR	Receptores da serotonina
IGF-2	Fator de crescimento semelhante à insulina 2
IGFBP2	Proteína 2 de ligação ao IGF
INSR	Receptor de insulina
IRS1	Substrato do receptor de insulina
ISM	<i>Incomplete Splice Match</i>
Iso-Seq	Sequenciamento de isoformas de leitura longa
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LH	Hormônio luteinizante
LHR	Receptor do hormônio luteinizante
MAPK9	<i>Mitogen-activated protein kinase 9</i>
MAPK13	<i>Mitogen-activated protein kinase 13</i>
MAPK14	<i>mitogen-activated protein kinase 14</i>
MC2R	Receptor da melanocortina 2
NIC	<i>Novel In Catalog</i>
NMD	<i>Nonsense-mediated RNA decay</i>
NNC	<i>Novel Not in Catalog</i>
ORF	<i>Open Reading Frame</i>
P450 <sub>11b</sub>	Enzima 11beta-hidroxilase
P450 <sub>17a,liase</sub>	Enzima 17alfa-hidroxilase/17-20 liase
P450 <sub>aldo</sub>	Enzima P450 aldosterona sintase
P450 <sub>scc</sub>	Enzima P450 <i>side chain cleavage</i>
PacBio	<i>Pacific Biosciences</i>
PDE	Fosfodiesterase
PI3KCA	Subunidade catalítica da PI3K
PI3KCG	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit gamma</i>
PI3KR3	<i>Phosphoinositide-3-kinase regulatory subunit 3</i>
PKA	Proteína quinase A
PRKACA	<i>Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha</i>

PRKACB	<i>Protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta</i>
POMC	Pró-opiomelanocortina
PTTG1	<i>Pituitary Tumour-transforming Gene-1</i>
PRKAR1A	<i>Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha</i>
PRKAR1B	<i>Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta</i>
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina
RIN	<i>RNA integrity number</i>
RNA	Ácido nuclear ribonucleico
RNAm	Ácido nuclear ribonucleico mensageiro
RNAs	<i>small nuclear RNAs</i>
RNA <sub>t</sub>	Ácido nuclear ribonucleico total
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
SC	Síndrome de Cushing
SF-1	<i>Steroidogenic factor-1</i>
SOCS1	<i>Supressor of cytokine signaling 1</i>
SMRT	<i>Single Molecule Real Time</i>
snRNPs	Complexos ribonucleoproteicos nucleares
SRA	<i>Sequence Read Archive</i>
SRAA	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
STAR	<i>Steroidogenic acute regulatory protein</i>
TOP2A	Topoisomerase II Alpha
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
VEGFA	Fator de crescimento endotelial vascular A
WT1	<i>Wilms tumor suppressor-1</i>
ZF	Zona fasciculada
ZF/R	Zonas fasciculada/reticular
ZG	Zona glomerulosa
ZR	Zona reticular
WT1	<i>Wilms tumor suppressor-1</i>

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desenvolvimento da glândula adrenal e das gônadas.....	30
Figura 2 - Cascata esteroidogênica adrenal em humanos.....	33
Figura 3 - Cascata esteroidogênica adrenal em humanos (azul) e sugestão em cães (vermelho).....	36
Figura 4 - Sequenciamento de RNA pelo método RNA-seq versus Iso-Seq.....	53
Figura 5 - Processo de <i>splicing</i> do RNAm em organismos eucariotos.....	54
Figura 6 - Diversos mecanismos de <i>splicing</i> alternativo em precursores de RNAm.....	55
Figura 7 - Variedade proteica originada de eventos de <i>splicing</i> alternativo.....	56
Figura 8 - Glândula adrenal de cão (A) secção transversal, (B) com o córtex contendo a zona glomerulosa (seta), zona fasciculada e reticular (asterisco), e a camada medular (M). Separação da camada cortical e medular com uso de bisturi (C e D). Aumento 50x. Barra: 400 $\mu$ m.....	61
Figura 9 - Secção transversal obtida de amostra de adrenal de cão criopreservada.....	64
Figura 10- Disposição esquemática dos exons de um exemplo de gene de referência e a classificação de diferentes isoformas.....	71
Figura 11 - Locus do gene STAR em humanos com apenas 1 transcrito (A, seta vermelha). Locus do gene STAR em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação	



parcial das 178 variantes de *splicing* do gene STAR a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).....82

Figura 12 - Locus do gene CYP11A1 em humanos com 2 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP11A1 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 33 variantes de *splicing* do gene CYP11A1 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).....83

Figura 13 - Loci dos genes HSD3B1 e HSD3B2 em humanos com 2 transcritos cada (A, setas vermelhas). Locus do gene HSD3B em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Identificação das 22 variantes de *splicing* do gene HSD3B a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).....84

Figura 14 - Locus do gene CYP17A1 em humanos com 2 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP17A1 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 74 variantes de *splicing* do gene CYP17A1 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).....85

Figura 15 - Locus do gene CYP21A2 em humanos com 4 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP21A2 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 48 variantes de *splicing* do gene CYP21A2 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).....86

Figura 16 - Locus do gene CYP11B demonstrando falha na identificação das isoformas a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães.....87

Figura 17 - Abrangência do sequenciamento de córtex total de 4 amostras de glândulas adrenais de cães (A). Locus do gene CYP11B demonstrando falha na identificação das isoformas a partir do Iso-Seq nas amostras de córtex total, ZG e ZF/ZR (B). Locus do gene CYP17A1 mostrando contaminação das células da ZF/ZR na microdissecação da ZG (C).....90

Figura 18 - Loci dos genes CYP11B1 e CYP11B2 em humanos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP11B em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Identificação das 7

variantes de *splicing* do gene CYP11B a partir do RNA-seq de glândulas adrenais de cães (C).....91

Figura 19- Imagem de tomografia computadorizada segmento abdominal da paciente 1 pelo corte sagital evidenciando a formação em polo cranial da adrenal direita (seta branca) e polo caudal sem alterações (seta preta).....95

Figura 20 - Imagem de tomografia computadorizada segmento abdominal da paciente 1 pelo corte coronal evidenciando a formação em polo cranial da adrenal direita (seta branca) e polo caudal sem alterações (seta preta) .....95

Figura 21 - Imagem ultrassonográfica da adrenal direita (A) e esquerda (B) da paciente 2 portadora de Síndrome de Cushing ACTH-independente devido neoplasia bilateral.....96

Figura 22 - Fotomicrografia da glândula adrenal do cão identificando a cápsula (CP), a camada cortical com a zona arciforme (ZA), zona fasciculada (ZF), zona reticular (ZR), e a camada medular (M). HE, Aumento 40X. Barras: 500µm.....106

Figura 23- Fotomicrografia do córtex adrenal do cão evidenciando a cápsula (CP) zona arciforme (ZA) e zona fasciculada (ZF). HE, Aumento 200X. Barra: 100µm.....107

Figura 24 - Fotomicrografia do córtex adrenal do cão evidenciando a zona intermediária (seta). HE, Aumento 100X, barra 200 µm. (A) e 200X, barra 100 µm (B).....107

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Resultado de saída do software do Agilent 2100 Bioanalyzer, demonstrando o ladder utilizado como calibrador (A), e gráfico representativo evidenciando alta qualidade do RNA total, sendo identificado os picos referentes às bandas 18S e 28S.....66
- Gráfico 2 - Número de isoformas do córtex adrenal de cães por gene.....78
- Gráfico 3 - Ilustração da estrutura das isoformas (A). Distribuição das isoformas das adrenais de cães de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante (B) (cores claras representam isoformas não codificantes e cores escuras isoformas codificantes).....79
- Gráfico 4 - Distribuição das isoformas das glândulas adrenais de cães pelos sítios de *splicing* canônicos e não canônicos.....80
- Gráfico 5 - Número de isoformas por gene oriundas de carcinomas adrenocorticais de cães.....98
- Gráfico 6 - Distribuição das isoformas de carcinomas adrenocorticais de cães de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante (cores claras representam isoformas não codificantes e cores escuras isoformas codificantes) .....99
- Gráfico 7 - Distribuição das isoformas de carcinomas adrenocorticais de cães pelos sítios de *splicing* canônicos e não canônicos.....100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações e qualidade do RNAt do córtex adrenal utilizado no sequenciamento Iso-Seq.....	77
Tabela 2 - Resultados hormonais de diagnóstico da Síndrome de Cushing ACTH-independente.....	94

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Etiologias relatadas da Síndrome de Cushing em cães até o ano de 2022.....	47
Quadro 2 - Dados de resenha dos cães, causa do óbito e tempo entre o óbito e coleta das amostras (n=8) .....	75
Quadro 3 - Loci dos genes que codificam enzimas da cascata esteroidogênica da adrenal de cães e número de isoformas de cada um.....	81
Quadro 4 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas da cascata esteroidogênica adrenal de cães.....	88
Quadro 5 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD da CYP11B da adrenal de cães.....	92
Quadro 6 - Descrição ultrassonográfica das alterações em adrenais.....	94
Quadro 7 - Imuno-histoquímica dos carcinomas adrenocorticais de glândula adrenal de cães.....	95
Quadro 8 - Loci de genes frequentemente envolvidos na tumorigênese adrenal e números de isoformas encontradas pelo sequenciamento Iso-Seq de carcinomas adrenocorticais de cães.....	101
Quadro 9 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas obtidas de carcinoma adrenocorticais de cães.....	101
Quadro 10 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas obtidas de adrenais não neoplásicas de cães.....	104

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>28</b>
2.1	MORFOLOGIA E FISILOGIA DAS GLÂNDULAS ADRENAIS DE CÃES.....	28
2.2	DIFERENÇAS ENZIMÁTICAS NA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA DE CÃES .....	34
2.3	SÍNDROME DE CUSHING EM CÃES .....	36
2.4	TRATAMENTO DA SÍNDROME DE CUSHING COM O BLOQUEADOR DA ENZIMA 3B-HSD	42
2.5	SÍNDROME DE CUSHING ACTH-INDEPENDENTE EM CÃES E OS PRINCIPAIS DIFERENCIAIS DAS NEOPLASIAS ADRENAIS.....	43
2.6	INVESTIGAÇÕES MOLECULARES DOS ADENOMAS E CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS EM CÃES COM SC ACTH-INDEPENDENTE .....	47
2.7	MECANISMOS MOLECULARES DE ADENOMAS E CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS EM HUMANOS.....	50
2.8	SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO .....	51
2.9	<i>SPLICING</i> E <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO .....	53
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>58</b>
3.1	Objetivos .....	58
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>60</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ISOFORMAS DAS ENZIMAS DA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA NA GLÂNDULA ADRENAL DE CÃES .....	60
4.1.1	Coleta e armazenamento das amostras.....	60
4.1.2	Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE).....	61
4.1.3	Processamento das amostras pré e pós microdissecção de captura a laser .....	62
4.1.4	Extração de RNA total tecidual, quantificação e controle de qualidade do RNA .....	65
4.1.5	Preparo de biblioteca e sequenciamento em sistema PacBio .....	68
4.1.6	Bioinformática dos dados de Iso-Seq dos córtex de adrenais de cães .....	69
4.1.7	Bioinformática dos dados de RNA-seq obtidos do repositório público <i>Sequence Read Archive</i>	71

4.2	PESQUISA DE VARIANTES DE <i>SPLICING</i> EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS DE CÃES	72
4.2.1	Caracterização dos pacientes e bioinformática dos dados de Iso-Seq	72
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>74</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ISOFORMAS DAS ENZIMAS DA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA ADRENAL	74
5.1.1	Coleta de glândulas adrenais e controle de qualidade	74
5.1.2	Dados de Iso-Seq das enzimas da cascata esteroideogênica	77
5.1.3	Dados de RNA-seq da CYP11B obtidos do repositório público <i>Sequence Read Archive</i>	90
5.2	VARIANTES DE <i>SPLICING</i> EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS DE CÃES	92
5.2.1	Caracterização dos pacientes com síndrome de Cushing ACTH-independente	92
5.2.2	Dados de Iso-Seq dos carcinomas adrenocorticais de cães	97
5.3	HISTOLOGIA DAS GLÂNDULAS ADRENAIS DE CÃES SEM ENDOCRINOPATIA	105
5.3.1	Análise microscópica das glândulas adrenais	105
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>109</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>122</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>124</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As glândulas adrenais assumem posição craniomedial aos rins nos animais domésticos. Em 1563, quando foram descritas anatomicamente em humanos por Bartholomeo Eustachius, estas foram descritas como glândulas suprarrenais, uma descrição anatômica de glândulas localizadas acima dos rins, posição esta que passou a nomeá-las. Entretanto, nos animais domésticos há diferenças quanto à sua localização, o prefixo *ad-*, significa próximo aos rins, portanto, glândulas adrenais é uma terminologia mais adequada, por exemplo, no caso dos cães.

As glândulas adrenais em cães são amplamente estudadas, visto que há diversas enfermidades que podem acometê-las, como por exemplo, a doença de Addison, síndrome de Cushing, feocromocitoma, hiperaldosteronismo e o incidentaloma. A síndrome de Cushing (SC) ou hiperadrenocorticismo (HAC) são termos que se referem às diversas anormalidades clínicas e laboratoriais decorrentes do excesso de glicocorticoides, endógenos ou exógenos. Esta endocrinopatia é a mais estudada dentre todas as demais que acometem as glândulas adrenais. Na área da endocrinologia veterinária há 897 publicações sobre síndrome de Cushing entre os anos de 1953 e 2022. Dentre todas as endocrinopatias que acometem os cães, a síndrome de Cushing é a terceira mais estudada, estando atrás apenas do *Diabetes mellitus* e a obesidade canina.

Embora haja um amplo conhecimento sobre a morfofisiologia das glândulas adrenais de cães, uma parte deste conhecimento nunca foi investigado na espécie, tendo sido adotado até o momento como equivalente ao encontrado em humanos, visto que há uma semelhança histológica e de produção hormonal entre as espécies. Entretanto, com o avanço da biologia molecular nos últimos anos e o surgimento da nova era da genética, o mundo das “ômicas”, que revela novas informações para compreensão desde o código genético até a função de proteínas no organismo, vem sendo possível caracterizar diferenças entre as espécies quanto à cascata esteroidogênica e na base molecular de surgimento dos tumores que acometem essas glândulas.

O presente estudo baseou-se na transcriptômica, especificamente na técnica denominada Iso-Seq, para mapear as isoformas e investigar as enzimas da cascata esteroidogênica e genes relacionados à tumorigênese adrenal. A compreensão do

código genético e expressão gênica de adrenais saudáveis e tumorais é fundamental para o avanço no conhecimento desta glândula na espécie canina, possibilitando desta forma, o desenvolvimento de novas técnicas diagnósticas e terapêuticas no futuro da endocrinologia veterinária.

As ideias centrais que nortearam as investigações neste estudo vieram da intenção de confirmar a existência de apenas um gene HSD3B e CYP11B em cães, como descrito por Kowalewski (2006) e Sanders (2016); criando na sequência a hipótese de que para que houvesse diferença de ação do trilostano nas zonas glomerulosa e fasciculada, diferentes isoformas da HSD3B gerariam diferentes enzimas 3 $\beta$ -HSD atuantes nestas zonas, o que confeririam diferentes respostas ao fármaco, explicando desta forma, a diferença no bloqueio na síntese de aldosterona e cortisol durante o tratamento da Síndrome de Cushing. De forma semelhante, diferentes isoformas do mesmo gene CYP11B presente nas duas zonas, gerariam diferentes enzimas, o que explicaria a especificidade da zona glomerulosa em sintetizar aldosterona e da zona fasciculada o cortisol. Com este conceito de que um mesmo gene pode expressar diferentes isoformas, conseqüentemente sintetizar diferentes proteínas, pensou-se na hipótese de que alguns genes frequentemente envolvidos na tumorigênese adrenal expressassem isoformas com potencial para síntese de proteínas aberrantes, e que isso poderia participar do processo patológico da doença e seria um potencial para estabelecimento de diagnósticos futuros.

## ***2 Revisão de literatura***

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 MORFOLOGIA E FISIOLOGIA DAS GLÂNDULAS ADRENAIS DE CÃES

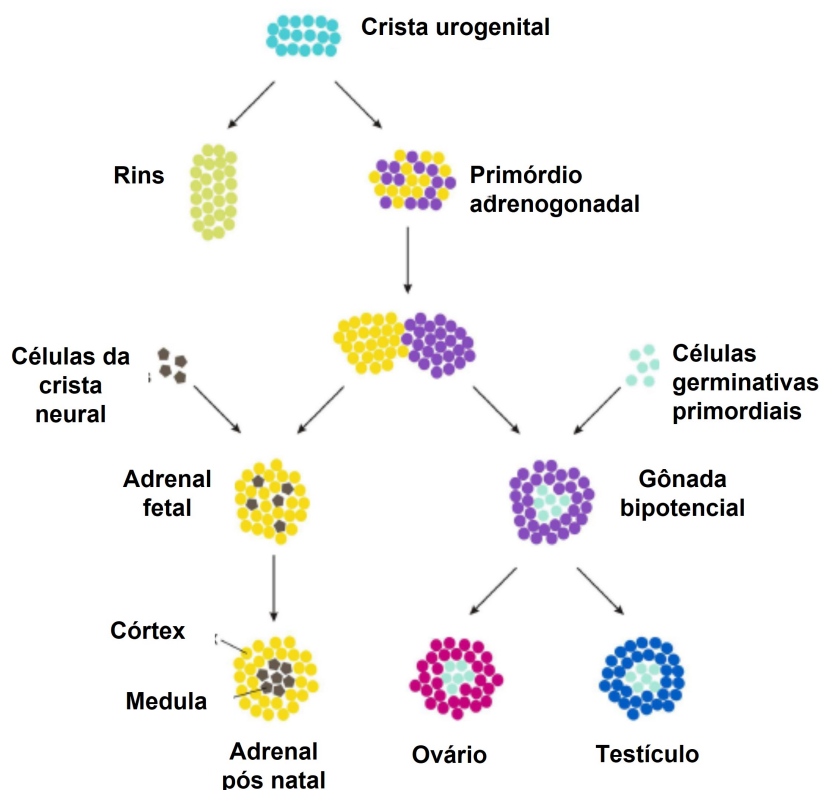
As glândulas adrenais em cães, assim como em humanos, são órgãos pares, localizadas próximas à junção toracolombar e em posição retroperitoneal. Nos cães as adrenais assumem posição craniomedial aos rins, sendo a glândula esquerda próxima à aorta abdominal e a direita próxima à veia cava caudal. A glândula adrenal direita localiza-se ventralmente ao processo transversal da última vértebra torácica, sendo os dois terços craniais cobertos pelo processo caudado do fígado. Já a adrenal esquerda está posicionada ventral ao processo transversal da segunda vértebra lombar. Na superfície dorsal das adrenais elas tocam as artérias mesentérica cranial e artéria frenicoabdominal, enquanto na face ventral o contato com as veias frenicoabdominais frequentemente formam uma depressão conferindo um aspecto bilobado às glândulas. As adrenais são supridas difusamente por ramos oriundos da aorta abdominal, artéria renal, frenicoabdominal, lombar e mesentérica cranial. Enquanto a drenagem venosa da adrenal direita é feita diretamente para a veia cava, e da esquerda se dirige à veia renal esquerda. Em geral as adrenais tem o formato alongado, achatado, bilobado e assimétrico (DYCE; SACK; WENSING, 2010). O tamanho da adrenal varia principalmente de acordo com a idade, raça e peso, sendo em geral de 2 a 3 cm de comprimento, e a largura de 0,5 a 1 cm (DYCE; SACK; WENSING, 2010; DE CHALUS et al., 2013; SOULSBY et al., 2015).

A glândula adrenal é histológica- e funcionalmente dividida em duas camadas: córtex (*corticis*, do latim significa casca) e medula (*medulla*, do latim significa interno). A embriogênese e o desenvolvimento pós-natal precoce fornecem uma estrutura contextual para a compreensão dos mecanismos envolvidos na zonação e homeostase adrenocorticais. Embora estrutura e funcionalmente distintos, o córtex adrenal, o ovário e os testículos surgem de um progenitor em comum, o primórdio adrenogonadal (AGP). O AGP é derivado de uma região especializada do epitélio celíaco conhecida como crista urogenital (figura 1). Células no AGP expressam os fatores de transcrição *Wilms tumor suppressor-1* (WT1), *GATA-binding protein 4* (GATA4) e *steroidogenic factor-1*

(SF-1, também chamado de AdBP4 ou NR5A1) (LAUFER et al., 2012; BANDIERA et al., 2013; PIHLAJOKI et al., 2015). Com o progresso do desenvolvimento, as células progenitoras do córtex adrenal e das gônadas se separam e ativam diferentes programas transcricionais. As células progenitoras adrenais que compõem o AGP migram dorso medialmente no mesênquima subjacente, elevam a expressão de SF-1 e reduzem a expressão de WT1 e GATA4 (VAL; MARTINEZ-BARBERA; SWAIN, 2007; BANDIERA et al., 2013). Em contraste, as células progenitoras gonadais no AGP migram dorso lateralmente no mesênquima subjacente e mantêm a expressão de SF-1, WT1 e GATA4. O primórdio adrenal é invadido por simpatoblastos que dão origem às células cromafins da medula. Posteriormente, as glândulas adrenais primordiais são envolvidas por células da cápsula, que são derivadas do mesênquima circundante e das células adrenais fetais que anteriormente expressavam SF-1 (WOOD et al., 2013; YATES et al., 2013).

O primórdio das glândulas adrenais em cães aparece como uma estrutura delgada no dia 27 ainda na fase embrionária, e possui uma estrutura cortical definitiva no dia 35 na fase fetal (SASAKI; NISHIOKA, 1998). Assim como em humanos, foi observado que a maturação final do córtex ocorre após o nascimento. Desta forma, o padrão histológico do córtex fetal de cães difere da estrutura clássica pós-natal; em cães foram descritas a zona definitiva, a zona de transição e a zona fetal, que se estendem da parte externa cortical para a interna, nesta ordem. A zona definitiva foi descrita como uma estreita faixa composta por células redondas e pequenas, enquanto a zona de transição e fetal tem citoplasma amplo ao redor do núcleo (THURÓCZY, 2020).

Figura 1 - Desenvolvimento da glândula adrenal e das gônadas



Fonte: Adaptado de: Pihlajoki *et al.* (2015).

Na fase adulta a organização definitiva é dividida em zona glomerulosa (mais externa), fasciculada (intermediária) e reticular (mais interna, em contato com a medula adrenal). As três zonas do córtex adrenal secretam diferentes hormônios esteroidais e sofrem influência de diferentes ajustes hormonais e enzimáticos. A zona glomerulosa (ZG) constitui cerca de 25% do córtex, sendo responsável fundamentalmente pela síntese de mineralocorticoides, por exemplo a aldosterona. A zona fasciculada (ZF) abrange cerca de 60% do córtex, sintetiza glicocorticoides, seu principal produto é o cortisol, e a reticular (ZR) apenas 15% do córtex, produz os glicocorticoides e baixa concentração de hormônios sexuais em cães (BEHREND, 2015).

A síntese de aldosterona é regulada por diversos fatores: o principal é a ação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) e a concentração de potássio. Já o controle da síntese de glicocorticoides é feito pela ação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. No hipotálamo há neurônios que compõem o núcleo paraventricular, que sintetizam o hormônio liberador da corticotrofina (CRH) e a arginina vasopressina

(AVP), estes hormônios através do sistema porta hipofisário chegam à adenohipófise, estimulando a síntese do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). O ACTH é sintetizado na adenohipófise a partir da clivagem da pró-opiomelanocortina (POMC); que além do ACTH, dá origem a outros peptídeos como os hormônios melanócito-estimulantes (MSH a, b e g) e b-endorfina. Os glicocorticoides por retroalimentação negativa inibem a transcrição do gene da POMC na adenohipófise, e do CRH e AVP no hipotálamo (ELIAS et al., 2018).

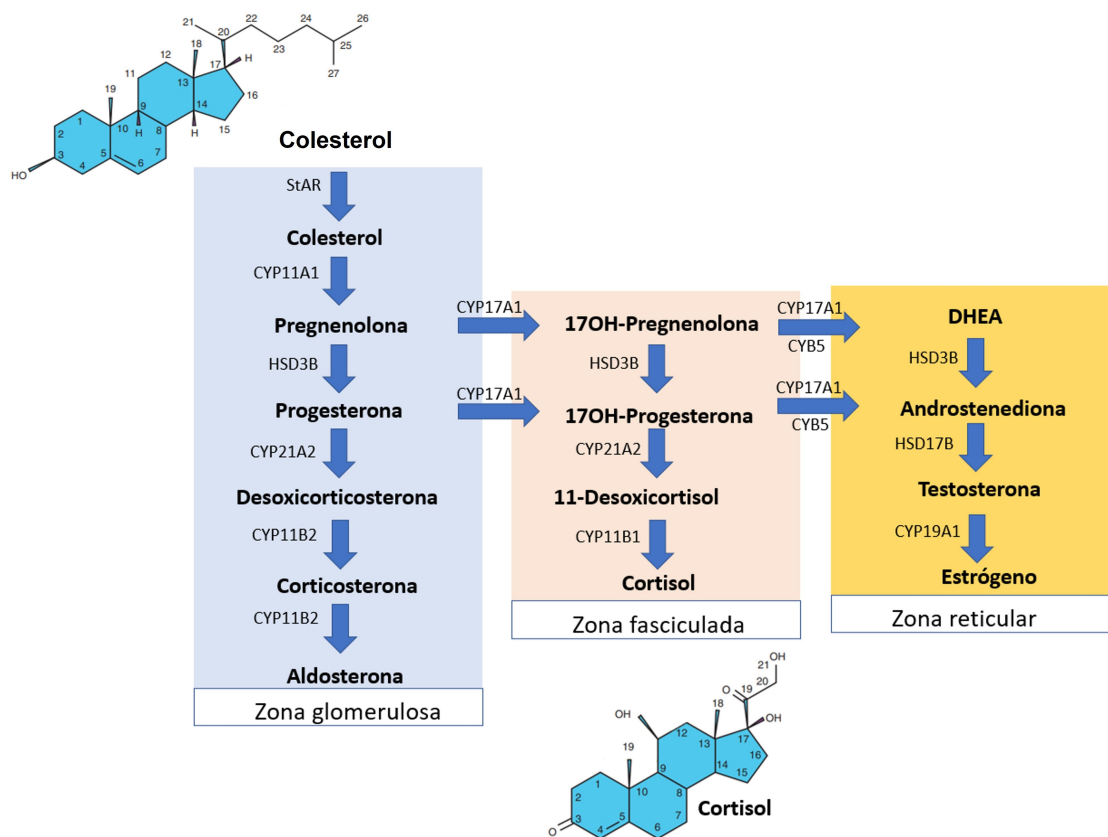
A principal função do ACTH é a estimulação da esteroidogênese adrenal por sua via canônica de estímulo MC2R-AMPC-PKA-CREBp. O ACTH se liga ao receptor da melanocortina 2 (MC2R), membro da superfamília de receptores acoplados à proteína G, que ativa adenilatociclase e aumenta a produção de monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), que por sua vez ativa a proteinoquinase A (PKA) e leva à fosforilação de diversas proteínas, incluindo a proteína ligadora ao elemento responsivo ao AMPC (CREB) (ELIAS et al., 2018). O ACTH por meio da atuação em seu receptor tem dois padrões de ações: uma ação imediata e outra lenta na esteroidogênese adrenal e proliferação celular. O efeito imediato do ACTH é o aumento da expressão da proteína reguladora da esteroidogênese aguda (STAR), que desempenha um papel fundamental no início da cascata, facilitando o transporte da molécula de colesterol para a membrana interna da mitocôndria, onde estão localizadas CYP11A1, adrenodoxina e adrenodoxina redutase, que realizam a clivagem inicial do colesterol. O efeito lento dado após algumas horas faz com que o ACTH aumente a síntese de todas as enzimas CYP (CYP11A1, CYP17A1, CYP21A2, CYP11B1) e da adrenodoxina (STEWART; KRONE, 2011). O ACTH também regula a transcrição do gene do seu próprio receptor MC2R, bem como dos receptores de colesterol *high density lipoprotein* (HDL) e *low density lipoprotein* (LDL). É fundamental a expressão de receptores específicos de LDL na membrana das células adrenocorticais para que haja captação de colesterol transportado pelas lipoproteínas de baixa densidade (LDL), que é a principal fonte de colesterol para a esteroidogênese (ELIAS et al., 2018).

Os hormônios esteroides tem em comum a origem da estrutura denominada ciclopentanoperhidrofenantreno, composta por três anéis de ciclohexano e um único anel de ciclopentano. Os camundongos, furões, cães e humanos diferem de outras espécies em relação à variedade de enzimas esteroidogênicas e cofatores expressos no



córtex adrenal, e essas diferenças têm implicações funcionais. Em humanos, furões e cães após a conversão de colesterol em pregnenolona pelo sistema mitocondrial da P450 *side chain cleavage*, também chamada de enzima de clivagem da cadeia lateral do colesterol (P450<sub>scc</sub>, gene CYP11A1), o córtex adrenal pode direcionar a pregnenolona para uma das três diferentes vias, duas delas sob ação da 17 $\alpha$ -hidroxilase/17-20 liase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> , liase, gene CYP17A1) (figura 2). A primeira possibilidade é a pregnenolona ser mantida como um C21,17-desoxicorticosteroide e seguir na via de produção de mineralocorticoides como a aldosterona. A segunda possibilidade é sofrer uma 17 $\alpha$ -hidroxilação e seguir a via C21-17-hidroxi que culmina na produção de glicocorticoides, tais como o cortisol. Outra possibilidade é seguir uma terceira via que após a 17 $\alpha$ -hidroxilação, sofre uma clivagem da ligação C17-20 para se tornar um C19-17-cetosteroide, levando à formação de andrógenos e estrógenos (BEUSCHLEIN; GALAC; WILSON, 2011; PIHLAJOKI et al., 2015). Duas proteínas chaves que são diferencialmente expressas entre as espécies são o CYP17A1 e seu regulador alostérico, o citocromo b5 (citb5 ou CYB5). A atividade da 17,20-liase do CYP17A1 é seletivamente aumentada pelo citb5 (AUCHUS, 2004; WAGNER et al., 2008).

Figura 2 - Cascata esteroidogênica adrenal em humanos



Fonte: Adaptado de Pihlajoki *et al.* (2015).

Células na ZF e ZR de furões, cães e humanos, possuem a atividade da 17 $\alpha$ -hidroxilase, conseqüentemente, o cortisol é o principal glicocorticoide secretado pela glândula adrenal nessas espécies (BIELINSKA *et al.*, 2006; BEUSCHLEIN; GALAC; WILSON, 2011). Nos humanos, o córtex adrenal começa a produzir dehidroepiandrosterona (DHEA) e sulfato de DHEA (DHEA-S) na adrenarca (6–8 anos de idade), e esse aumento na produção de andrógenos adrenal coincide com aumento da expressão do *citb5* na ZR (NAKAMURA *et al.*, 2009). Em condições fisiológicas as glândulas adrenais de furões e cães produzem apenas limitada quantidade de andrógenos. No caso dos furões esta escassez de produção de andrógenos na adrenal foi atribuída a baixa expressão de *citb5* no córtex adrenal (WAGNER *et al.*, 2008). A base molecular para a produção limitada de andrógenos pela adrenal do cão não foi caracterizada até o momento. Os ratos e camundongos não expressam em suas células adrenocorticais o CYP17A1, como resultado, a corticosterona é o principal

glicocorticoide secretado pelo córtex adrenal, e sob condições fisiológicas andrógenos não são produzidos neste tecido (KEENEY; JENKINS; WATERMAN, 1995).

Na rota de síntese de glicocorticoides, a pregnenolona passa por desidrogenação pela ação da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase (3 $\beta$ -HSD, gene HSD3B), levando à formação de progesterona. Tanto a pregnenolona quanto a progesterona podem ser hidroxiladas na posição C17 $\alpha$  pela enzima CYP17A1, formando 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona e 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteron, respectivamente. Na sequência ocorre uma 21-hidroxilação no retículo endoplasmático por ação da 21-hidroxilase (21-OH, gene CYP21A2), que promove a conversão de 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteron em 11-desoxicortisol. O 11-desoxicortisol é levado do retículo endoplasmático de volta para a membrana interna da mitocôndria, onde sofre uma 11-hidroxilação por meio da enzima 11 $\beta$ -hidroxilase (gene CYP11B1), dando origem ao principal glicocorticoide do córtex adrenal, o cortisol (STEWART; KRONE, 2011; BEHREND, 2015; ELIAS et al., 2018).

## 2.2 DIFERENÇAS ENZIMÁTICAS NA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA DE CÃES

Foram descritas 2 isoenzimas da 3 $\beta$ -HSD em humanos, 6 em camundongos, 4 em ratos e 1 em suínos (SIMARD et al., 2005). Luu-the e colaboradores em 1989 descreveram a sequência da 3 $\beta$ -HSD do tipo I (gene HSD3B1) em humanos (SIMARD et al., 2005). A segunda isoenzima foi denominada tipo II, pois cronologicamente foi isolada em humanos em 1991 (MORISSETTE et al., 1995). Em um estudo com corpo lúteo de cadelas apenas uma sequência gênica da HSD3B foi descrita, denominada 3 $\beta$ -HSD tipo II (gene HSD3B2), devido à similaridade da sequência gênica com a HSD3B2 de humanos (KOWALEWSKI et al., 2006). Além das adrenais já foram descritos outros locais de produção da 3 $\beta$ -HSD; a HSD3B1 de humanos é encontrada na glândula mamária, tumores de mama, placenta e pele; e a HSD3B2 em ovários e testículos (RHEAUME et al., 1991; SIMARD et al., 2005; THOMAS; BUCHOLTZ; KACSOH, 2012).

Em humanos as duas isoenzimas derivam de dois genes diferentes compostos por 4 exons cada, sendo cada exon similar em 77,4; 91,8; 94,5 e 91%. A 3 $\beta$ -HSD tipo I possui 372 aminoácidos, enquanto a do tipo II tem 371 aminoácidos, a sequência possui

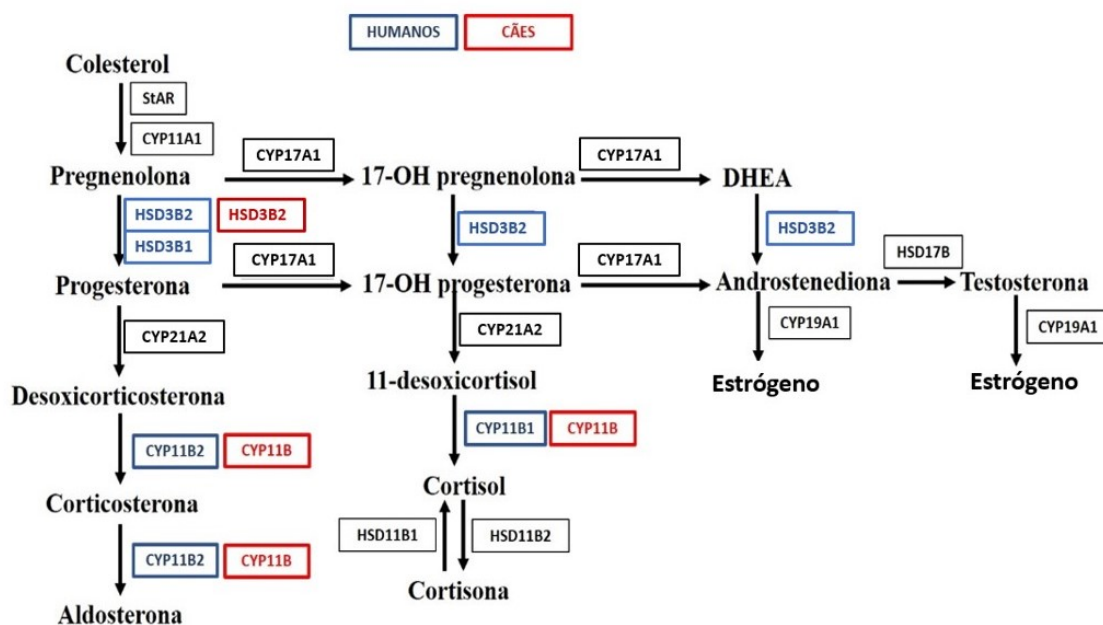
93,5% de similaridade (SIMARD et al., 2005). Até o momento apenas uma enzima 3b-HSD foi identificada em cães (KOWALEWSKI et al., 2006).

Para a síntese de aldosterona duas etapas são conhecidas como limitantes, a primeira é a regulação pela proteína STAR, envolvida com o transporte do colesterol, e a segunda relacionada com a etapa final da síntese da aldosterona, a conversão regulada pela CYP11B2 (BASSETT; WHITE; RAINEY, 2004). Em estudos com adenomas produtores de aldosterona foi sugerido que haja mais uma etapa limitante na síntese deste hormônio, sendo esta terceira etapa regulada pela enzima 3b-HSD (DOI et al., 2010). Em humanos há evidências que a 3b-HSD do tipo 2 seja responsável pela esteroidogênese em todo o córtex da adrenal, enquanto que a 3b-HSD tipo 1 esteja presente apenas na zona glomerulosa (DUPONT et al., 1991; DOI et al., 2010; KONOSU-FUKAYA et al., 2015). Em estudos com adenomas produtores de aldosterona em humanos foi observado correlação positiva entre o nível de expressão gênica de HSD3B1 e P450 aldosterona sintase (P450<sub>aldo</sub>, gene CYP11B2), e entre HSD3B1 e a concentração de aldosterona plasmática (KONOSU-FUKAYA et al., 2015).

Até o momento imagina-se que assim como em humanos a diferença na produção de hormônios entre as zonas glomerulosa e fasciculada, esteja relacionada à diferença em duas enzimas da família citocromo P450, uma encontrada apenas na zona glomerulosa e outra apenas na fasciculada e reticular. A CYP11B2 converte desoxicorticosterona (DOC) via corticosterona a aldosterona, e só é encontrada na zona glomerulosa. Já a enzima característica nas outras duas zonas é 17a-hidroxilase/17-20 liase (P450<sub>17a,liase</sub>, gene CYP17A1), que catalisa a 17 a -hidroxilação da pregnenolona e progesterona, bem como a clivagem da cadeia lateral em C17 de 17- a -hidroxi C21 esteroides. As outras enzimas esteroidogênicas, como HSD3B e CYP21A2, ocorrem em todas as três zonas (ELIAS et al., 2008; BEHREND, 2015). Sendo assim, a especificidade da síntese de mineralocorticoides na zona glomerulosa de humanos está relacionada diretamente a expressão específica de P450<sub>aldo</sub> (gene CYP11B2), enquanto que a síntese de glicocorticoides está diretamente relacionada à presença de 17a-hidroxilase e a enzima 11b-hidroxilase (gene CYP11B1) (LISUREK; BERNHARDT, 2004; PAYNE; HALES, 2004; MILLER; AUCHUS, 2011). Em contraste, bovinos, suínos e ovelhas tem apenas uma CYP11B para síntese de cortisol e aldosterona

(OGISHIMA; MITANI; ISHIMURA, 1989; BOON; COGHLAN; MCDUGALL, 1998; ROBIC; FARAUT; PRUNIER, 2014). Um estudo utilizou a técnica de *Southern blot* e sugeriu que cães também tem apenas uma CYP11B para as etapas finais de produção de mineralo- e glicocorticoides, como demonstrado na figura 3 (SANDERS et al., 2016).

Figura 3 - Cascata esteroidogênica adrenal em humanos (azul) e sugestão em cães (vermelho)



Fonte: Adaptado de: Sanders *et al.* (2016).

### 2.3 SÍNDROME DE CUSHING EM CÃES

A Síndrome de Cushing (SC) ou hiperadrenocorticismismo (HAC) são termos que se referem às diversas anormalidades clínicas e laboratoriais decorrentes do excesso de glicocorticoides, endógenos ou exógenos. Esse epônimo foi uma homenagem ao médico Harvey Williams Cushing que em 1932 descreveu pela primeira vez oito casos de excesso de cortisol, dentre estes casos identificou que seis deles eram secundários a adenomas hipofisários (STEWART; KRONE, 2011; BEHREND, 2015). A primeira descrição em cães foi em 1939 quando Verstraete & Thoonen mencionaram um adenoma de células basofílicas na adenohipófise de um cão Boxer de 9 anos de idade,

cujas principais manifestações clínicas eram alopecia, letargia e hipogonadismo (BABA; CÂTOI, 2007). A classificação da SC é dada em duas categorias, de acordo com os níveis circulantes da corticotrofina, também chamada de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH): ACTH-dependente e ACTH-independente. A SC ACTH-dependente ocorre quando o hipercortisolismo se origina da secreção excessiva de ACTH. Em cerca de 80 a 85% dos cães, o fator etiológico é um adenoma oriundo das células corticotróficas da adenohipófise (também denominado corticotropinoma). Em especial, o termo Doença de Cushing refere-se à secreção excessiva do hormônio ACTH oriundo de um corticotropinoma e é a forma prevalente tanto em humanos quanto em cães (STEWART; KRONE, 2011; BEHREND, 2015; VILAR et al., 2021). Na maioria dos casos, a Doença de Cushing ocorre devido a um microadenoma (diâmetro < 10 mm) hipofisário secretor de ACTH (BEHREND, 2015). A minoria é associada a um macroadenoma, cuja definição é de um tumor acima de 10mm de diâmetro e que se estende dorsal à sela túrcica (CASTILLO et al., 2006; LOTTATI; BRUYETTE, 2018). Recentemente foi relatado um caso de glioma hipofisário como causa da SC ACTH-dependente (ISHINO et al., 2019). As bases genéticas da Doença de Cushing ainda são pouco conhecidas em cães (HANSON et al., 2008; HANSON; MOL; MEIJ, 2010; ISHINO et al., 2011). Recentemente, tem sido demonstrado que mutações no gene da protease 8 ubiquitina-específica (USP8) são frequentes nos corticotropinomas humanos, entretanto, o mesmo não foi identificado em cães (PEREZ-RIVAS et al., 2015; SBIERA et al., 2016; KAGEYAMA et al., 2020).

Casos de secreção ectópica de ACTH podem corresponder a 10% dos casos de SC ACTH-dependente em humanos, sendo a causa mais comum os carcinomas pulmonares de células pequenas (VILAR et al., 2021). Em cães, 5 casos de secreção ectópica de ACTH levando a SC ACTH-dependente já foram relatados, com provável origem em tumores neuroendócrinos no fígado, pâncreas, mesentério do intestino delgado (região mesoepigástrica) e um caso de feocromocitoma (CHURCHER, 1999; GALAC et al., 2005; BURGNER et al., 2007; CASTILLO et al., 2014; LEE et al., 2020).

Os distúrbios adrenais primários representam até 20% dos casos da SC. Em geral, são causados por uma neoplasia adrenocortical primária, adenoma ou um carcinoma que produzem de forma autônoma o cortisol. O excesso de cortisol circulante

suprime o hormônio hipotalâmico CRH e o ACTH hipofisário, fazendo com que os níveis circulantes de ACTH estejam reduzidos ou indetectáveis. Consequentemente, esse feedback negativo crônico e supressão dos níveis de ACTH plasmático levam a uma atrofia da glândula contralateral, nos casos de tumor unilateral (BEHREND, 2015).

A SC é uma doença de evolução lenta e progressiva, porém é uma doença de alta morbidade e mortalidade dependendo da cronicidade do quadro. Trata-se de uma doença cujo efeito hormonal é multissistêmico e pode acarretar principalmente obesidade central, resistência insulínica, *Diabetes mellitus*, dislipidemia, esteatose hepática, imunossupressão, alterações dermatológicas e hipertensão arterial sistêmica (HERRTAGE & RAMSEY, 2015). Em humanos a SC apresenta incidência estimada em 2 a 3 casos por 1.000.000 habitantes/ano e prevalência em torno de 40 casos por 1.000.000 habitantes (STEFFENSEN et al., 2010; LACROIX et al., 2015). Em cães, a incidência é estimada em 1 a 2 casos por 1000 cães/ano, com aproximadamente 100 mil cães afetados anualmente (DE BRUIN et al., 2009; MAMELAK; OWEN; BRUYETTE, 2014). Em um estudo de prevalência realizado com cães inscritos em um plano de saúde sueco, foi notificado a SC aproximadamente em 1 cão a cada 236 cães entre 5 e 12 anos (BELLUMORI et al., 2013). Desta forma, comparativamente, enquanto a SC é considerada pouco frequente em humanos, na medicina veterinária é uma das endocrinopatias mais frequentes.

A SC acomete animais de meia idade a idosos, sendo a média de idade ao diagnóstico em torno de 10 anos. Em um levantamento brasileiro foi apontado que a maioria dos cães era de pequeno porte e tinha até 10 kg (73,9%). As raças mais frequentes neste estudo foram Poodle (27%), Dachshund (17,4%) e Yorkshire (10,4%) (MARTINS et al., 2019).

A SC vem sendo amplamente estudada e divulgada na medicina veterinária, com isso, a maior conscientização sobre as manifestações clínicas e impacto metabólico da doença, tem feito com que o diagnóstico seja muito mais precoce do que visto no passado (BEHREND et al., 2013). Consequentemente, as manifestações clínicas podem apresentar-se de maneira mais sutis. Os sinais clínicos da SC são causados principalmente pelos efeitos catabólicos, lipolítico, glicogênicos e imunossupressores do cortisol. Em 2012 o consenso sobre a abordagem diagnóstica do paciente com SC categorizou as manifestações clínicas de acordo com a frequência de ocorrência. Desta

forma, as manifestações mais comuns na doença são polidipsia, poliúria, polifagia, taquipneia, distensão abdominal, alopecia endócrina, hepatomegalia à palpação, fraqueza muscular e hipertensão arterial. Foram classificadas como menos comuns a letargia, hiperpigmentação, presença de comedos, atrofia cutânea, rarefação pilosa e alopecia, incontinência urinária, manifestações clínicas do *Diabetes mellitus*; e como incomuns, consequências do tromboembolismo, ruptura de ligamento cruzado cranial, paralisia facial, pseudomiotonia, atrofia testicular e anestro persistente (BEHREND et al., 2013).

O histórico e exame físico do paciente frequentemente dão subsídio para a solicitação de exames de rotina que dão suporte à suspeita da SC. O hemograma e contagem de plaquetas pode apresentar um quadro de eritrocitose, trombocitose, neutrofilia sem desvio à esquerda, linfopenia e eosinopenia. Nos bioquímicos, frequentemente há aumento significativo na atividade da fosfatase alcalina, devido aumento da isoforma esteroide induzida, aumento da alanina aminotransferase, hipertrigliceridemia, hipercolesterolemia e hiperglicemia. Nos exames de urina anormalidades como baixa densidade urinária, proteinúria e infecção no trato urinário inferior são achados frequentes nesta endocrinopatia (GILOR; GRAVES, 2011; BEHREND et al., 2013; BEHREND, 2015).

Na Doença de Cushing há elevada síntese e liberação do ACTH e reduzida capacidade de resposta à retroalimentação negativa do cortisol. O efeito cumulativo do ACTH no córtex adrenal ao longo do tempo determina o tamanho das glândulas adrenais e a capacidade de síntese do cortisol. Notavelmente, na Doença de Cushing é frequente a ocorrência de hiperplasia adrenocortical simétrica, embora alguns casos a assimetria possa ocorrer (BEHREND, 2015). Nas neoplasias adrenais secretoras de cortisol, a liberação hormonal independe do ACTH, embora alguma responsividade residual ao ACTH persista em grau variável. Nesses casos as concentrações aumentadas de cortisol suprimem a secreção do ACTH e, na evolução da doença, desta forma, espera-se atrofia das células não neoplásicas do córtex adrenal, por isso nos casos de neoplasia unilateral, no momento do diagnóstico é frequente algum grau de atrofia da glândula contralateral (BENCHEKROUN et al., 2010; BEHREND, 2015). Já foram descritos casos de ocorrência simultânea de neoplasia adrenal bilateral, ou neoplasia hipofisária e neoplasia adrenal unilateral concomitantes (GRECO et al., 1999;



MORANDI et al., 2007; BEHREND, 2015; BEATRICE et al., 2018; VAN BOKHORST et al., 2019).

A ultrassonografia adrenal em cães com SC é comumente utilizada como ferramenta diagnóstica para distinguir a SC ACTH-dependente da SC ACTH-independente. Alguns estudos demonstraram que o aumento na espessura da glândula adrenal é mais fidedigna para inferir adrenomegalia (SOULSBY et al., 2015; BENTO et al., 2016). Um estudo recente mostrou que a determinação da espessura da adrenal, considerando 4 faixas de peso, tem sensibilidade de cerca de 95,6% e as medidas variam entre as glândulas adrenais direita e esquerda. Desta forma, o aumento na glândula adrenal esquerda em cães entre 2,5 a 5 kg, 5 a 10 kg, 10 a 20 kg e 20 a 40 kg, é considerado quando a medida é superior a 0,51 cm, 0,55 cm, 0,64 cm e 0,73 cm, respectivamente. Foi observado que os valores de corte de normalidade, da espessura da adrenal direita, são maiores quando comparados com a esquerda nas 4 categorias, sendo 0,53 cm, 0,68 cm, 0,75 cm e 0,87 cm, respectivamente (MELIÁN et al., 2021). Na maioria dos cães com SC (56,0%) os achados ultrassonográficos são consistentes com a determinação da origem, sendo evidente quais casos são Doença de Cushing e quais são SC ACTH-independente secundário à neoplasia adrenal; porém em 39,6% dos casos ocorre assimetria adrenal equívoca (MELIÁN et al., 2021). Nos casos de assimetria adrenal equívoca, um valor de corte de  $\leq 0,5$  cm para a espessura da glândula contralateral é apropriado para o diagnóstico ultrassonográfico de neoplasia adrenal unilateral (BENCHEKROUN et al., 2010).

Embora a ultrassonografia seja uma ferramenta eficaz para avaliação das dimensões e presença de lesões adrenais, estudos que padronizem características para distinguir lesões benignas de malignas são necessários. Um estudo amplo envolvendo 119 cães com lesões em adrenal foi conduzido pareando as informações ultrassonográficas com resultados histológicos. Foi demonstrado que a análise ultrassonográfica tem 100% de especificidade e 63,7% de sensibilidade para identificar lesões adrenais. Os carcinomas de córtex adrenal em geral têm ecotextura heterogênea, com diversas áreas de calcificação, com áreas de hipo e hiperecogenicidade quando comparado com o córtex renal, podem fazer invasão vascular, embora estas características não sejam patognomônicas, são frequentes achados de malignidade. A dimensão da formação em glândula adrenal maior que 2 cm e identificações de massas

irregulares obtiveram alto valor preditivo para carcinoma adrenal. Já os adenomas de córtex adrenal em geral apresentam-se como nódulos e dimensões menores que 2 cm (PAGANI et al., 2016).

A distinção entre lesões benignas e malignas na medicina humana é realizada com frequência pela tomografia computadorizada (TC) com alta sensibilidade e especificidade (HAMRAHIAN et al., 2005). Em 2016 um estudo, utilizando microbolhas como contraste para realce ultrassonográfico, foi realizado em 24 cães com lesões adrenais na tentativa de promover a distinção de lesões benignas de malignas, e os resultados foram comparados aos achados citológicos e/ou histológicos (BARGELLINI et al., 2016). Neste estudo, e mais recentemente também em outro estudo em que a técnica foi novamente reavaliada, o realce de contraste e sua distribuição em cada lesão foi avaliada qualitativamente nas fases de realce (*wash in*) e clareamento (*wash out*) do contraste intravenoso. Combinando o grau de realce com a distribuição, que fornece informações sobre vascularização, a técnica mostrou-se promissora por permitir a distinção de lesões malignas *versus* benignas com uma sensibilidade de 69 a 100% e especificidade de 80 na 94% (BARGELLINI et al., 2016; NAGUMO et al., 2020).

As diretrizes de diagnóstico de SC publicadas no consenso de 2012 orientam que o teste de supressão com baixa dose de dexametasona seja o teste diagnóstico de eleição para a doença (BEHREND et al., 2013). O teste de estimulação com ACTH é realizado após a aplicação de ACTH sintético e estímulo máximo da atividade cortical no período de uma hora. Em cães com doença de Cushing, a capacidade do córtex adrenal de secretar cortisol é maior do que em cães saudáveis, sendo o córtex responsivo ao ACTH. No entanto, na SC ACTH-independente devido neoplasia adrenal, as células neoplásicas nem sempre são responsivas ao ACTH e podem secretar cortisol de forma irregular (GALAC et al., 2010a). A sensibilidade exata do teste de estimulação com ACTH para diagnóstico de SC é discutível e varia substancialmente entre os estudos, com resultados de 60% a 95% (BEHREND et al., 2013; BEHREND, 2015).

A diferenciação de um caso ACTH-dependente do ACTH-independente é fundamental, pois as escolhas terapêuticas irão impactar a longo prazo a qualidade de vida e sobrevida do paciente. O hipercortisolismo pode ser controlado clinicamente com medicações como o trilostano ou o mitotano (BEHREND, 2015). A hipofisectomia é o

tratamento de eleição para o adenoma hipofisário (VAN RIJN et al., 2016). Entretanto, a hipofisectomia não está amplamente disponível na rotina brasileira, não tendo relato na literatura nacional de dados até o presente momento. Já nos casos de neoplasia adrenal, devido a potencial malignidade da formação, a adrenalectomia é o tratamento de escolha após estabilização clínica do paciente (BEHREND, 2015).

#### 2.4 TRATAMENTO DA SÍNDROME DE CUSHING COM O BLOQUEADOR DA ENZIMA 3B-HSD

O trilostano é um medicamento amplamente utilizado no tratamento de SC em cães, como um inibidor competitivo da enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide desidrogenase. A 3 $\beta$ -HSD é uma oxidoreductase, localizada na crista da mitocôndria e no retículo endoplasmático liso, onde catalisa a desidrogenação e a  $\Delta^5$ - $\Delta^4$  isomerização dos precursores  $\Delta^5$  (pregnenolona, 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, dehidroandrosterona e o  $\Delta^5$ -diol) nos respectivos  $\Delta^4$  -cetoesteroides (progesterona, 17 $\alpha$ -hidroxiprogesteronona,  $\Delta^4$  -diona e testosterona) (DUPONT et al., 1991). O cortisol, aldosterona e androstenediona são produtos da progesterona através de diversas vias (figura 2), quando o trilostano bloqueia a 3 $\beta$ -HSD espera-se redução dos produtos finais (SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2006, 2008; REUSCH, 2010). Embora o tratamento com o trilostano cause redução tanto do cortisol quanto da aldosterona, foi relatado uma redução sérica de aldosterona menor quando comparada a proporção de redução do cortisol, mostrando que possivelmente há um bloqueio adicional entre a conversão de cortisona e cortisol e/ou atuação distinta do medicamento entre as zonas do córtex da adrenal. Foi sugerido um bloqueio adicional nas enzimas 11 $\beta$ -hidroxilase e 11 $\beta$ -HSD (WENGER et al., 2004; SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2006; REUSCH, 2010). Embora esperada alta casuística de hipercalemia com o uso do trilostano, diante da presença da 3 $\beta$ -HSD na zona glomerulosa, foi demonstrado que não há hipercalemia significativa na maioria dos casos tratados, corroborando com o achado de que não há significativo bloqueio da aldosterona pelo trilostano na zona glomerulosa (WENGER et al., 2004; FONSECA; YAMATO, 2011).

## 2.5 SÍNDROME DE CUSHING ACTH-INDEPENDENTE EM CÃES E OS PRINCIPAIS DIFERENCIAIS DAS NEOPLASIAS ADRENAIS

O achado de uma neoformação em adrenal leva a duas questões importantes a serem abordadas nas investigações diagnósticas. A primeira questão é se a neoplasia é produtora de hormônios, o que requer a exclusão da síndrome de Cushing, feocromocitoma e hiperaldosteronismo primário, ou se é uma neoplasia não produtora de hormônios, que em geral é um achado em exames e não apresenta manifestações clínicas. A segunda importante questão é se a neoformação encontrada tem características malignas, o que impacta na urgência de decisão cirúrgica e prognóstico do paciente (BEHREND, 2015).

As manifestações clínicas do paciente frequentemente dão subsídio para a solicitação de exames de rotina e exames hormonais específicos direcionados à principal suspeita clínica. A SC tem manifestações clínicas que frequentemente são notadas pelo tutor ou pelo médico veterinário que acompanha o cão. Os principais sinais que levam o médico veterinário a suspeitar da doença são polifagia, polidipsia, poliúria, taquipneia, distensão abdominal associada à hepatomegalia e acúmulo de gordura, alterações dermatológicas e fraqueza muscular (BEHREND, 2015). O feocromocitoma é um tumor produtor de catecolaminas, adrenalina e noradrenalina, originado das células cromafins da medula adrenal. O feocromocitoma não pode ser distinto ultrassonograficamente dos tumores do córtex adrenal, e existem vários sinais clínicos de feocromocitoma e SC que se sobrepõem, como poliúria, polidipsia, taquipneia e fraqueza muscular; o que torna ambas as doenças importantes diagnósticos diferenciais de neoplasias adrenais (SALESOV et al., 2015). O hiperaldosteronismo primário ocorre devido a um adenoma ou carcinoma uni ou bilateral oriundo da zona glomerulosa do córtex adrenal. O excesso de aldosterona leva a retenção de sódio e água, e excreção do potássio. A hipocalemia causa fraqueza muscular, que é a manifestação clínica mais frequente no hiperaldosteronismo primário. Já a hipernatremia e reabsorção de água, pode gerar hipertensão arterial, cujo principal resultado são anormalidades oftalmológicas. Embora rara em cães, e mais comum em gatos, o hiperaldosteronismo primário já foi relatado em cães e deve ser considerado no diagnóstico diferencial de neoplasias adrenais (JOHNSON et al., 2006).

De acordo com a Rede Europeia de Estudos de Tumores Adrenais (ENSAT, do inglês *European Network for the Study of Adrenal Tumours*) e a Sociedade Europeia de Endocrinologia da medicina humana, os incidentalomas adrenais constituem massas adrenais de 1 cm ou mais de diâmetro observadas ao acaso, ou seja, de forma incidental, durante exames de imagem para investigação de manifestações clínicas não relacionadas com doenças adrenais ou em exames de rotina (FASSNACHT et al., 2016). Em dois levantamentos foi observado que a incidência do achado incidental de uma massa em adrenal de cães foi estimada em 4 a 9%, sendo maior a incidência em cães com mais de 9 anos. Em um dos estudos a avaliação histopatológica das adrenais foi realizada após adrenalectomia ou necropsia, e revelou que 30% dos incidentalomas são neoplasias malignas, cujas dimensões variavam entre 2 e 4,6 cm. Enquanto as lesões benignas tinham dimensões menores que 2 cm, valores de corte confirmado também por outro estudo (COOK; SPAULDING; EDWARDS, 2014; BAUM; BOSTON; CASE, 2016; PAGANI et al., 2016). Um trabalho brasileiro recente mostrou que no Brasil 59% dos incidentalomas são carcinomas e 41% adenomas, e as dimensões dos tumores variaram entre 1,1 a 5,6 cm de espessura do polo adrenal (DE MARCO et al., 2019).

Na etapa de diagnóstico diferencial da causa de uma massa em adrenal de achado incidental, os testes hormonais devem ser realizados, ainda que os pacientes sejam assintomáticos (BEHREND et al., 2013). Além dos já mencionados adenoma, carcinoma e feocromocitoma, outras possíveis causas de incidentalomas já identificadas em cães foram o mielolipoma, neuroblastoma, linfoma primário adrenal, cistos, metástases e granulomas (MORANDI et al., 2007; KOOK et al., 2010; BEHREND, 2015; MESTRINHO et al., 2019). Não há consenso sobre a indicação imediata de cirurgia para massas em adrenal, por isso, recomenda-se repetir a ultrassonografia abdominal mensalmente nos casos de alteração de tamanho e aparência do nódulo adrenal. A suspeita de malignidade ocorre quando há perda do formato típico das glândulas adrenais, independentemente do tamanho, nos casos de assimetria de forma e tamanho entre as glândulas, ou nos casos em que a massa se infiltrou na veia frenicoabdominal, veia cava caudal, tecidos moles circundantes ou fez metástase à distância (BEHREND, 2015). Formações de menos de 2 cm devem ser acompanhadas mensalmente para determinar a taxa de crescimento, e se não houver mudança após 3 meses, o intervalo de avaliação ultrassonográfica pode ser aumentado. No entanto, nos

casos em que na formação adrenal seja observada evolução no tamanho, ocorra mudança de características, comprima ou invada vasos e órgãos adjacentes, ou pacientes que passem a apresentar manifestações clínicas devido tumores produtores de hormônio, a adrenalectomia deve ser indicada (MASSARI et al., 2011; ARENAS; PÉREZ-ALENZA; MELIÁN, 2013; BEHREND, 2015).

Os adenomas e carcinomas primários de adrenal que produzem o cortisol de forma autônoma são as principais causas histológicas descritas em cães com SC ACTH-independente, porém o defeito genético envolvido no seu automatismo é pouco conhecido (BEHREND, 2015). Entretanto, outras causas de SC ACTH-independente podem ocorrer, como nos casos de expressão ectópica de receptores ou aumento na expressão de receptores eutópicos no córtex adrenal, amplamente estudada na tumorigênese adrenal em humanos (STEWART; KRONE, 2011; VILAR et al., 2021). Já foi relatado no tumor adrenal de um cão a expressão ectópica de receptores do peptídeo insulínico dependente de glicose, também conhecido como receptor do peptídeo inibidor gástrico (GIPR), que passou a controlar a esteroidogênese adrenal. Desta forma, a estimulação e maior secreção de cortisol se dava após ingestão de alimentos, levando ao aparecimento das manifestações clínicas da SC. O diagnóstico da SC ACTH-independente devido à expressão ectópica de GIPR, também conhecida por SC dependente de alimento, foi estabelecido a partir dos dados em anamnese, avaliação clínica, ACTH plasmático abaixo dos valores de normalidade, hipercortisolemia refletida na relação cortisol:creatinina urinária, aumento bilateral de adrenais sem presença de nodulações e prevenção da elevação do cortisol durante teste hormonal pela administração da octreotida, padrão ouro para estabelecer o diagnóstico definitivo (GALAC et al., 2008). Recentemente foi descrito que a castração pode interferir na esteroidogênese adrenal, levando a um aumento na expressão de receptores eutópicos, como o receptor do hormônio luteinizante (LHR) (GALAC et al., 2010b; CAROTENUTO et al., 2019). Cães com SC após a castração aumentaram a secreção de cortisol durante o teste de estimulação com gonadotrofina coriônica humana (hCG) quando comparados com o grupo controle. Desta forma, o autor sugere a ocorrência da SC dependente de LH em cães (ESPIÑEIRA et al., 2021). Outro estudo recente demonstrou por meio da imuno-histoquímica aglomerados de nódulos adrenais que sintetizavam ACTH, cuja ação autócrina e parácrina estimulava a esteroidogênese local

e elevava os níveis de cortisol circulante, e como resultado o cão apresentava manifestações clínicas de SC (SOLER ARIAS et al., 2022). Esta condição foi o primeiro relato na medicina veterinária de hiperplasia adrenal macronodular primária (HAMP), e em conjunto com as demais condições moleculares descritas de expressão de receptores ectópicos e superexpressão de receptores eutópicos, fazem com que haja uma readequação da chave de classificação da SC em cães (quadro 1). A HAMP é caracterizada por presença de macronódulos adrenais funcionais com secreção de cortisol, independente da estimulação hipofisária de ACTH (CHARCHAR; FRAGOSO, 2022). Em humanos a HAMP representa cerca de 2% dos casos de SC, caracteriza-se por macronódulos bilaterais que podem ter desenvolvimento assimétrico e assincrônico. Diversos fenômenos vêm sendo estudados na caracterização da heterogeneidade da HAMP, em alguns casos há a síntese local de ACTH isolada, ou em conjunto com a expressão de receptores ectópicos e/ou eutópicos, como o GIPR, receptores a arginina vasopressina, receptor b1 adrenérgico, receptor da leptina, receptores da serotonina (HTR) e LHR; que por sua vez maximizam a estimulação esteroidogênica (LOUISET et al., 2013; CHARCHAR; FRAGOSO, 2022). A maior causa genética relatada na HAMP em humanos é a mutação no gene *Armadillo Repeat Containing 5* (ARMC5), considerado um gene supressor tumoral, importante regulador da apoptose celular e esteroidogênese (ESPIARD et al., 2015; CAVALCANTE et al., 2018). Não há relatos em cães de mutação no gene AMRC5 até o momento.

---

Quadro 1 - Etiologias relatadas da Síndrome de Cushing em cães até o ano de 2022

---

**Etiologia**

---

**SC ACTH-dependente**

Doença de Cushing

ACTH ectópico

**SC ACTH-independente**

Adenoma adrenal

Carcinoma adrenal

Hiperplasia adrenal macronodular primária

SC dependente de LH

Expressão ectópica de receptores na adrenal

SC por expressão ectópica de GIPR

---

Fonte: elaborada pela autora baseada nas referências apresentadas no texto.

## 2.6 INVESTIGAÇÕES MOLECULARES DOS ADENOMAS E CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS EM CÃES COM SC ACTH-INDEPENDENTE

A investigação genética da tumorigênese adrenal tem sido alvo de muitos estudos ao longo dos últimos anos. Devido à alta incidência de neoplasias adrenais em cães, quando comparados aos humanos, esta espécie é de importante interesse científico para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos com a tumorigênese adrenal, pela diferenciação dos adenomas de carcinomas, que é uma das maiores problemáticas na evolução clínica do paciente, e pela possibilidade de novos alvos terapêuticos (GALAC; WILSON, 2015). Nos primeiros estudos genéticos em cães foi proposto que o aumento na expressão de enzimas esteroidogênicas estivessem



relacionadas ao hipercortisolismo autônomo, entretanto, nenhuma diferença foi demonstrada na expressão do RNAm das enzimas STAR, CYP11A1, HSD3B, CYP21A2, CYP17A1 e CYP11B em tecidos tumorais e normais da adrenal de cães (GALAC et al., 2010a). Já o receptor MC2R foi significativamente menos expresso nos carcinomas adrenais, do que nos adenomas e tecidos normais (GALAC et al., 2010a). A relação da menor expressão do receptor MC2R e o desenvolvimento de malignidade tumoral, ainda não foi elucidada, porém, justifica o motivo pelo qual carcinomas adrenais podem ser menos responsivos ao teste de estimulação com ACTH no diagnóstico e monitoramento do tratamento (GILOR; GRAVES, 2011). As expressões relativas de RNAm do fator de crescimento semelhante à insulina 2 (IGF-2), proteína 2 de ligação ao IGF (IGFBP2), e receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGFR1) foram avaliadas em um estudo em cães, pois frequentemente estes genes tem aumento na expressão gênica em carcinomas adrenal de humanos; porém, quando avaliada a expressão no tecido adrenal normal e o tecido neoplásico de cães, não houve diferença na expressão (KOOL et al., 2015). Não foram detectadas mutações de alteração de aminoácidos na fosfatase homóloga à tensina (PTEN) ou na subunidade catalítica da PI3K (PI3KCA), mas houve uma maior expressão no receptor do fator de crescimento epidérmico membro da família do homólogo 2 do oncogene viral da leucemia eritroblástica (ERBB2) em carcinomas (KOOL et al., 2015).

Mutações ativadoras do gene GNAS que codifica a subunidade alfa da proteína G estimulatória (Gs) foram relatadas em 5 a 17% dos adenomas secretores de cortisol em humanos. Essas mutações resultam na ativação constitutiva da proteína Gs, simulando um estímulo constante do ACTH na adrenal (VILAR et al., 2021). Um estudo mostrou que aproximadamente um terço dos cães (14/44) com SC ACTH-independente apresentam mutação no gene GNAS, o que explica a base da secreção autônoma de alguns tumores (KOOL et al., 2013). Mutações somáticas no gene da subunidade reguladora da proteína quinase A tipo 1A (PRKAR1A) foram observadas em 20% dos adenomas secretores de cortisol em humanos (VILAR et al., 2021). Nenhuma mutação do PRKAR1A foi identificada nos tumores adrenais de cães (KOOL et al., 2013).

A angiogênese é fundamental para o desenvolvimento tumoral e metástase, neste contexto, foi investigada a expressão do fator de crescimento endotelial vascular A

(VEGFA), fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), receptores 1 e 2 do VEGF (VEGFR1 e VEGFR2), angiopoetina 1 (Ang1) e angiopoetina 2 (Ang2) em carcinomas, adenomas e tecido adrenal normal de cães. Angiopoetina-2 atua em conjunto com o VEGFA para facilitar a proliferação celular e a migração de células endoteliais, entretanto, tanto nos adenomas, quanto nos carcinomas, houve expressão aumentada apenas da Ang2 quando comparada ao tecido normal. Em especial a isoforma Ang2-443 tinha maior expressão do RNAm em carcinomas, quando comparada aos adenomas e tecidos normais (KOOL et al., 2014).

Na embriogênese o SF-1 desempenha um papel fundamental no desenvolvimento adrenal (VAL; MARTINEZ-BARBERA; SWAIN, 2007). Na fase pós nascimento, o SF-1 é importante na modulação da esteroidogênese por aumentar a expressão da maioria das hidroxilases e proteína STAR (SCHIMMER; WHITE, 2010). A análise da expressão proteica do SF-1 por imuno-histoquímica em humanos é importante para confirmação da origem da neoplasia no córtex adrenal e tem elevado valor prognóstico, visto que os carcinomas apresentam forte expressão do SF-1 e tem prognóstico reservado (SBIERA et al., 2010). Em cães, a expressão gênica e proteica do SF-1 não diferiu entre adrenais normais, adenomas e carcinomas. Entretanto, os cães que tiveram recorrência da neoplasia adrenal, tinham aumento na expressão de RNAm do SF-1 em relação ao padrão de expressão na primeira cirurgia (GALAC et al., 2014). Na busca por marcadores moleculares que se correlacionem com malignidade e prognóstico, foram selecionados 40 genes frequentemente superexpressos em neoplasias adrenais malignas em humanos e que tenham um potencial terapêutico (SANDERS et al., 2019b). Os autores relatam que 50 neoplasias adrenais de cães após adrenalectomia foram avaliadas por patologistas, quanto às características de 20 parâmetros histológicos do escore Utrecht. As neoplasias foram separadas em dois grupos, escore Utrecht com baixo e com alto risco de recorrência do tumor. Entre 40 genes, três genes mostraram-se promissores como marcadores moleculares de prognóstico, sendo o SF-1, o *Pituitary Tumour-transforming Gene-1* (PTTG1), Topoisomerase II alfa (TOP2A) relacionados a menor sobrevida quando elevada expressão gênica (SANDERS et al., 2019b).

Os tumores podem liberar para o meio extracelular material genético, como microRNAs, RNAm e DNA, o que pode ser detectado na circulação. Muitos estudos vêm sendo realizados com biomarcadores que possam ser utilizados no diagnóstico de

tumores (CONLEY et al., 2017). Foi demonstrado que o RNAm do gene CDC6, relacionado ao ciclo celular, está significativamente aumentado em cães com tumor adrenal em comparação com os cães saudáveis (ANDRIESSEN et al., 2021). Um estudo recente de pesquisa de microRNAs circulantes em cães com tumor adrenal demonstrou que o miR-483p, envolvido com a supressão de gene pró-apoptótico para sobrevivência do tumor, é mais expresso em pacientes com tumor adrenal do que em cães saudáveis, podendo ser um marcador em potencial no diagnóstico de tumores adrenais (SANDERS et al., 2021).

## 2.7 MECANISMOS MOLECULARES DE ADENOMAS E CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS EM HUMANOS

Recentemente diversos estudos moleculares têm sido realizados para maior compreensão da tumorigênese adrenal em humanos. Foi descoberto que em adenoma de córtex adrenal de humanos são frequentes as mutações somáticas nos fatores de sinalização intracelular de AMPc-PKA, mutação em enzimas de degradação do AMPc, e no GNAS, que aumenta a função do receptor MC2R (CHARCHAR; FRAGOSO, 2022). Os genes PRKACA e PRKACB codificam as subunidades catalíticas da PKA, e mutações nesses genes inibem o recrutamento de subunidades reguladoras desta enzima, o que aumenta sua atividade quinase, e conseqüentemente maior expressão de CYP11B1 e síntese de cortisol (THIEL et al., 2015; ESPIARD et al., 2018). Os genes PRKAR1A e PRKAR1B, por sua vez, codificam as subunidades regulatórias da PKA, mutações nesses genes promovem perda de função reguladora, com conseqüente ganho em atividade enzimática da PKA, maior expressão de CYP11B1 e síntese de cortisol (LIBÉ et al., 2005; DROUGAT et al., 2021). Outra mutação frequentemente descrita em adenomas corticais são as mutações nos genes que codificam as proteínas da família fosfodiesterase (PDE), envolvidas com a degradação de AMPc (HORVATH et al., 2008). Logo, mutações nos genes da família de enzimas PDE promovem aumento da disponibilidade de AMPc intracelular, maior atividade PKA, o que também é um mecanismo que resulta em maior expressão de CYP11B1 e síntese de cortisol.

Os carcinomas de córtex adrenal em humanos são menos frequentes, porém de rápido crescimento e progressão (VILAR et al., 2021). Mutações nos genes supressores tumorais foram descritas em carcinomas. O gene TP53 codifica a proteína p53 e o gene RB1 codifica a proteína RB, estas proteínas aumentam se há dano no DNA e suprimem o crescimento celular (KAMILARIS; HANNAH-SHMOUNI; STRATAKIS, 2020). A mutação genética nesses genes parece estar envolvida com o surgimento de carcinomas na glândula adrenal de humanos.

A via de sinalização Wnt-beta-catenina é importante para o desenvolvimento em muitos órgãos, incluindo o as glândulas adrenais. Mutações no sistema Wnt-b-catenina, também são importantes na carcinogênese adrenal, pois este sistema participa da sinalização intracelular de proliferação das células do córtex adrenal. A catenina beta 1 é um fator de transcrição e é codificada pelo gene CTNNB1, que pode sofrer diversas mutações somáticas ativadoras, já reconhecidas, em cerca de 40% dos carcinomas adrenais (SHANG; HUA; HU, 2017).

Os tumores sintetizam diversas proteínas aberrantes relacionadas com sua expansão e sobrevivência. O *splicing* alternativo de RNA é uma etapa fundamental na regulação da expressão gênica pós-transcricional e é um evento frequente nos tumores (CLIMENTE-GONZÁLEZ et al., 2017). Dois estudos recentes demonstraram que o evento de *splicing* alternativo gera transcritos relacionados com a ativação de via oncogênica em melanomas, câncer de pulmão, cabeça e pescoço (CLAPS et al., 2016; GOLDSTEIN et al., 2016). Em alguns estudos com carcinomas de córtex adrenal em humanos os transcritos oriundos de *splicing* alternativo tem sido utilizados como biomarcadores de progressão da doença e possíveis alvos terapêuticos vem sendo apontados (LV et al., 2020; XU et al., 2020; LIANG; SUN, 2021). As análises de eventos de *splicing* tem sugerido que o prognóstico esteja associado com genes da via de sinalização Wnt (LIANG; SUN, 2021).

## 2.8 SEQUENCIADORES DE NOVA GERAÇÃO

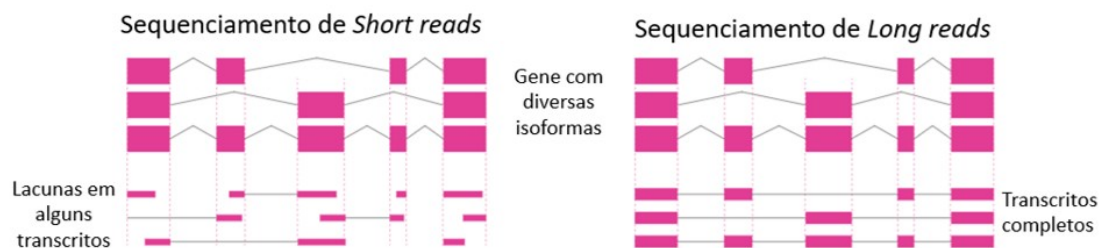
Desde 2005, novas tecnologias de sequenciamento em larga escala foram desenvolvidas, as chamadas *Next Generation Sequencing* ou sequenciamento de nova

geração (NGS). Inicialmente esta tecnologia foi desenvolvida para a determinação do genoma das espécies, porém, rapidamente foi utilizado para a transcriptômica. A análise do transcriptoma é o estudo da expressão de genes, trata-se da avaliação dos transcritos, o mapeamento do RNA e suas funções. Ao longo dos anos diversas metodologias foram desenvolvidas, tais como, o pirosequenciamento com detecção de pirofosfato (Roche), sequenciamento por ligação e detecção de oligonucleotídeo (SOLiD), metodologias de semicondutores (Ion), sequenciamento por síntese (Illumina) e sequenciamento de moléculas únicas (Pacific Biosciences e a Oxford Nanopore). Entre as diferentes plataformas moleculares, o sequenciamento convencional de RNA de leitura curta (*short reads*), o chamado RNA-seq, cuja principal plataforma utilizada é a da Illumina, tem sido amplamente utilizado para identificar transcrições e alterações de expressão gênica em diversos tecidos normais e alterados. Embora este método tenha sido eficaz na quantificação da expressão de transcritos, os *shorts reads* (geralmente 100 a 250 pares de bases) raramente abrangem transcritos completos, que muitas vezes podem ser de várias quilobases de comprimento, tornando difícil inferir todas as sequências completas oriundas dos processos de transcrições. No protocolo do RNAseq, o material genético é fragmentado em milhares de pequenas sequências, que são sequenciadas e geram leituras, também chamadas de *reads*. A correta montagem dos genes é dada por sobreposição das sequências em sistema computacional e leituras contíguas mais longas são geradas, chamadas de *contigs*. Algumas lacunas aparecem nesta metodologia e são preenchidas pelo caractere 'N'. Neste processo de montagem do genoma é possível realizar uma abordagem comparativa, em que um genoma de referência é utilizado como base, e lacunas podem ser preenchidas para ampliar o conhecimento sobre o genoma de determinada espécie; ou a abordagem de novo, em que nenhum genoma de referência é utilizado, muitas vezes por ainda não ser conhecido (ZAHA; PASSAGLIA, 2014; GIRARDI; SUBTIL; RANGEL, 2018).

Desde 2014 o sequenciamento de terceira geração, o sequenciamento de isoformas de leitura longa (Iso-Seq) da *Pacific Biosciences* (PacBio), vem ganhando destaque na caracterização do transcriptoma de diversos tecidos sob diferentes condições. O Iso-Seq tem uma tecnologia conhecida como sequenciamento em tempo real de moléculas únicas (*Single Molecule Real Time*, SMRT), em que é capaz de realizar o sequenciamento de leituras longas (*long reads*) de até 60.000 pares de bases,

muito eficaz para reduzir as lacunas nos sequenciamentos de *short reads*, resolver ambiguidades e superar desafios no processo de montagem de genomas complexos (figura 4). O Iso-Seq oferece uma caracterização completa de transcriptomas, devido à capacidade desta tecnologia em sequenciar UTRs 5' e 3' e as caudas poliA de moléculas de cDNA. No entanto, o sequenciamento de *long reads* tem suas próprias limitações, como a incapacidade de quantificar a expressão gênica adequadamente, devido ao rendimento relativamente menor de plataformas de *long reads* quando comparadas aos métodos de *short reads*. Entretanto, grandes vantagens do uso do sequenciamento de *long reads*, além de reduzir lacunas no mapeamento, são a determinação de isoformas, conseguir identificar sequências repetitivas e manter uma alta cobertura de leitura mesmo com alto conteúdo de bases CG (OIKONOMOPOULOS et al., 2020).

Figura 4 - Sequenciamento de RNA pelo método RNA-seq versus Iso-Seq.



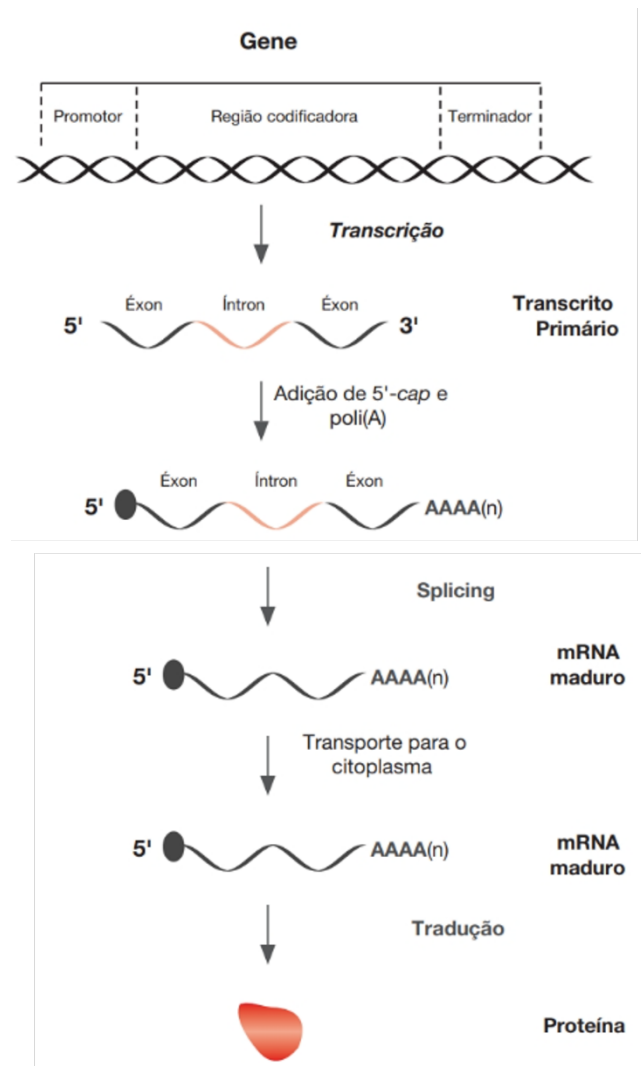
Fonte: (PACBIO, 2022)

## 2.9 SPLICING E SPLICING ALTERNATIVO

O processo de transcrição de um gene gera moléculas precursoras de RNA, denominadas de pré-RNAs. Para que cada RNA tenha sua função específica, o pré-RNA deve passar por uma série de processamentos. As três principais classes de RNA são o RNA total (RNAt), RNA ribossômico (RNAr) e RNA mensageiro (RNAm ou mRNA, que após processamento resultam em RNAs funcionantes). O mecanismo de processamento do RNAm deve acontecer para que seja possível se associar a um ribossomo e ocorrer a tradução de uma proteína funcional. Para que isso ocorra é necessário a (I) formação do 5'-cap, que é a adição de um nucleotídeo na extremidade 5' do RNA; (II) a formação da cauda de poli(A) pela adição de uma cauda de adenilatos na

porção 3'; e (III) um processamento denominado *Splicing*, no qual ocorre a remoção dos íntrons e o transporte para o citoplasma (figura 5) (STAATS, 2014).

Figura 5 - Processo de *splicing* do RNAm em organismos eucariotos

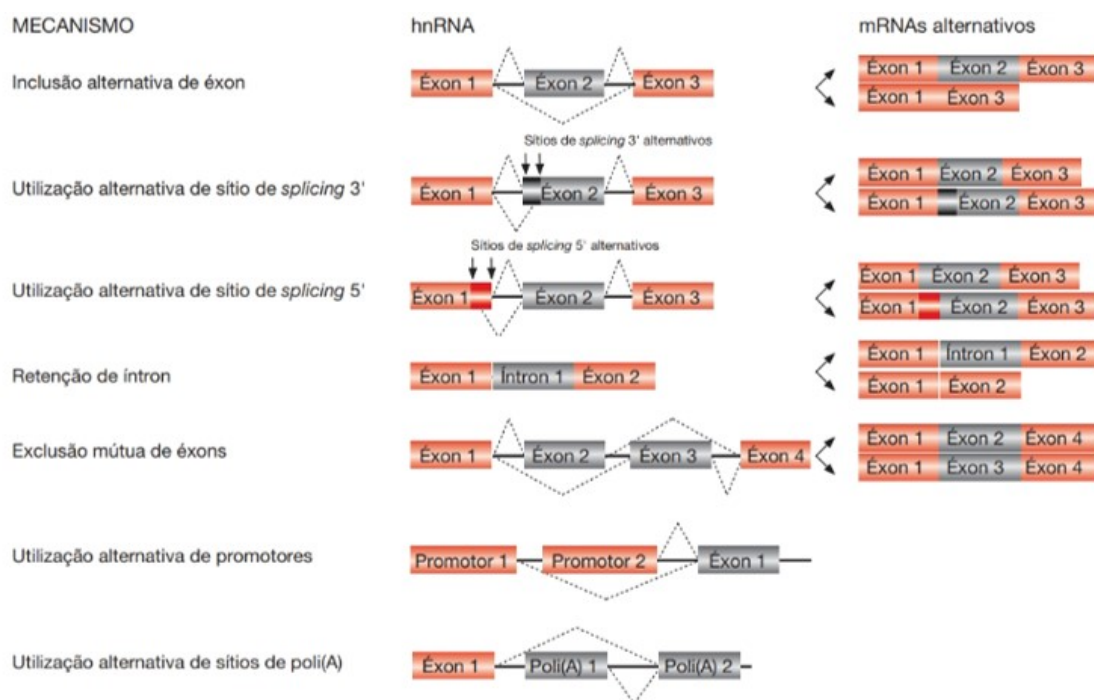


Fonte: Staats, 2014.

Em organismos eucarióticos, as reações de excisão de íntrons são realizadas pelos spliceossomos, que são um grande complexo de ribonucleoproteínas. Os RNAs nucleares pequenos (*small nuclear RNAs*, snRNAs) se associam com proteínas e dão origem aos pequenos complexos ribonucleoprotéicos nucleares (snRNPs), denominados U1, U2, U4, U5, U6, U11 e U12. O spliceossomo estrutura-se sobre um íntron para que o *splicing* constitutivo ocorra; reconhece os sítios de *splicing* 5' e 3' (nas sequências GU

na extremidade 5' e AG na extremidade 3') e recruta as snRNPs e *fatores de splicing* de acordo com a sequência deste íntron. No *splicing* alternativo, contrário do que ocorre no *splicing* constitutivo em que a sequência de RNAm é fiel ao gene, os íntrons do pré-RNAm podem sofrer processamento, dando origem a uma ou mais isoformas. O *splicing* alternativo gera diversas formas de RNAm através de vários mecanismos distintos (figura 6), tais como, inclusão alternativa de éxon, utilização alternativa de sítio de *splicing* 3' ou 5', retenção de íntron, exclusão de éxon, utilização alternativa de promotores ou de sítios de poli(A) (BARALLE; GIUDICE, 2017; MURPHY et al., 2022).

Figura 6 - Diversos mecanismos de *splicing* alternativo em precursores de RNAm



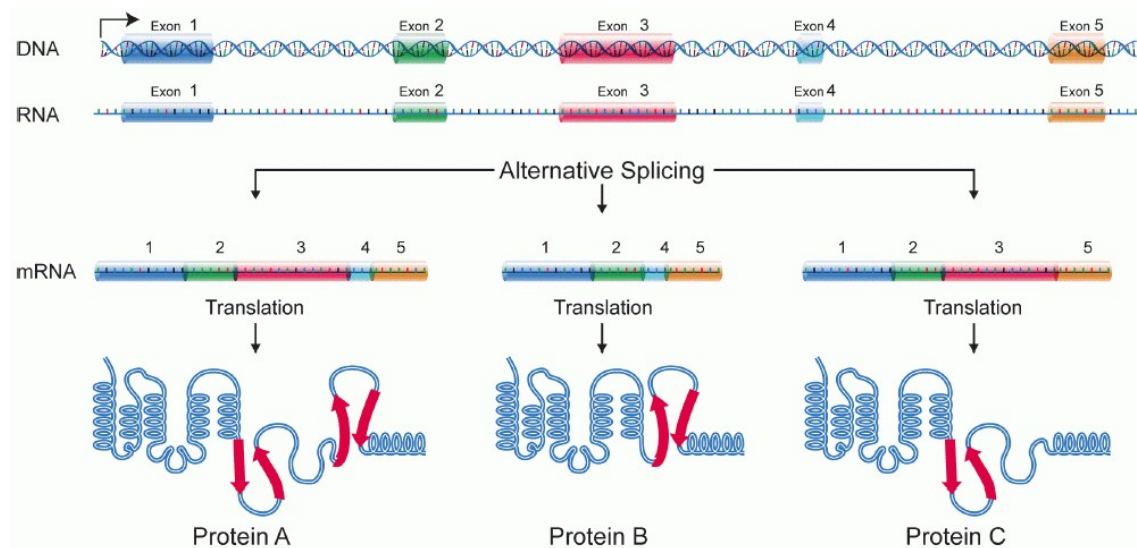
Fonte: Staats, 2014 e GENOME, 2022).

A importância do *splicing* alternativo é tão grande que os estudos referem que em aproximadamente 95% dos genes de mamíferos possa ocorrer *splicing* alternativo, sendo fundamental na homeostase celular, juntamente com a diferenciação de tecidos e órgãos. Variantes de *splicing* podem diversificar o proteoma, e cada gene pode originar diversas proteínas distintas, modificando a dinâmica celular (figura 7). Entretanto, a desregulação no *splicing* alternativo vem sendo documentada no câncer com impacto



importante nos oncogenes e genes supressores de tumor. Uma análise abrangente de 8705 pacientes em 32 tipos de câncer revelou que os tumores exibem até 30% mais eventos de *splicing* alternativo em comparação com tecidos normais, e consequentemente mais proteínas aberrantes (KAHLES et al., 2018). Atualmente inibidores que têm como alvo o spliceossomo ou suas proteínas auxiliares estão sendo investigados como novas abordagens terapêuticas para o tratamento do câncer (MURPHY et al., 2022).

Figura 7 - Variedade proteica originada de eventos de *splicing* alternativo



Fonte: Site Genome, 2022.

## **3 *Objetivos***

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivos

Este projeto teve como objetivo principal caracterizar as isoformas das enzimas esteroidogênicas e de genes tumorigênicos no córtex adrenal de cães sem endocrinopatias e com endocrinopatia adrenal diagnosticada como Síndrome de Cushing ACTH-independente.

Para atingir este objetivo foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

- a) Identificar se há diferentes *loci* do gene HSD3B na adrenal de cães;
- b) Identificar se há diferentes *loci* dos genes CYP11B1 e CYP11B2 na adrenal de cães;
- c) Identificar as isoformas dos genes STAR, CYP11A1, HSD3B, CYP17A1, CYP21A2 e CYP11B, que codificam as enzimas da cascata esteroidogênica no córtex adrenal de cães;
- d) Identificar as isoformas dos genes HSD3B e CYP11B nas zonas glomerulosa e fasciculada separadamente, e
- e) Identificar e avaliar o potencial codificante das isoformas dos genes SF-1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53, MC2R, SOAT1 e CTNNB1.

## ***4 Material e métodos***

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ISOFORMAS DAS ENZIMAS DA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA NA GLÂNDULA ADRENAL DE CÃES**

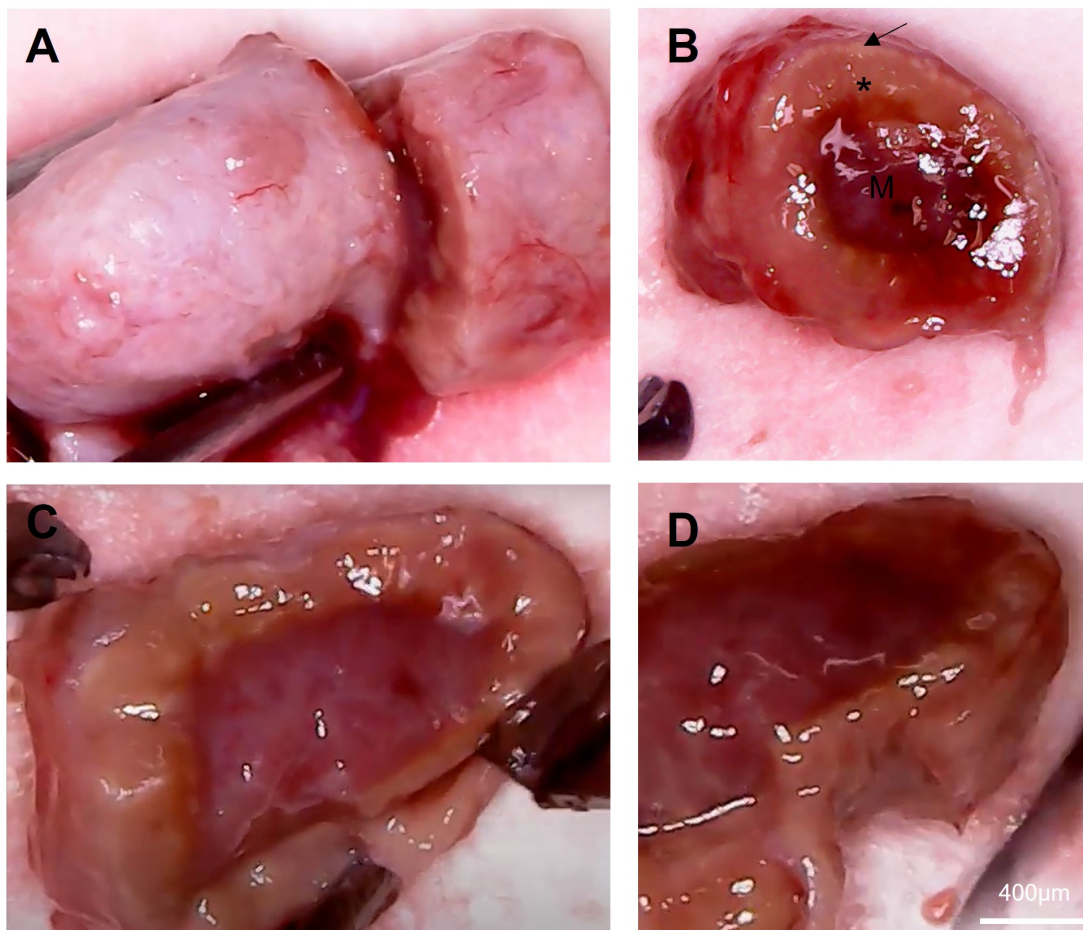
As técnicas descritas nos itens de 4.1.1 a 4.1.6 descreveram a coleta e processamento de glândulas adrenais não tumorais de cães sem endocrinopatias.

#### **4.1.1 Coleta e armazenamento das amostras**

Para o desenvolvimento desta parte do projeto foram utilizadas glândulas adrenais de cães que foram a óbito ou eutanasiados no hospital veterinário da FMVZ/USP. Nenhum cão foi eutanasiado para este estudo, sendo utilizado apenas material sob concessão dos tutores e/ou diretoria do HOVET/FMVZ/USP (aprovado pela Comissão de Ética Hospitalar). Os experimentos aconteceram de acordo com as normativas da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FMVZ, nº 4521290317).

As adrenais foram obtidas durante a necropsia desses animais, em seguida foi retirado o tecido adiposo circundante, realizada uma incisão transversal para obtenção de um fragmento que contenha todas as camadas para posterior análise histológica. Outro fragmento foi dissecado sob microscópio óptico digital em aumento de 50X para a separação do córtex e medula, em seguida o fragmento cortical foi imerso e armazenado em nitrogênio até processamento para preparo do sequenciamento (figura 8).

Figura 8 - Glândula adrenal de cão (A) secção transversal, (B) com o córtex contendo a zona glomerulosa (seta), zona fasciculada e reticular (asterisco), e a camada medular (M). Separação da camada cortical e medular com uso de bisturi (C e D). Aumento 50x. Barra: 400  $\mu$ m.



#### 4.1.2 Coloração com Hematoxilina-Eosina (HE)

A coloração com HE e avaliação histológica foi realizada para validação do grupo controle, em que as adrenais que compuseram esse grupo não continham lesões tumorais. Para que fossem realizadas as análises histológicas das glândulas adrenais, os fragmentos obtidos da incisão transversal foram fixados em solução de formol 4% tamponado em PBS por 24 horas. Em seguida iniciou-se a fase de inclusão, onde os tecidos foram mantidos em álcool 70% durante 1 hora, seguidos de fases de desidratação, onde foram utilizados álcool 80%, 90%, 100% (I) e 100% (II), por 1 hora cada. Após desidratação as amostras foram clareadas em Xilol (I e II), por uma hora cada; e embebidos em parafina pura (I e II) *overnight* e parafina de inclusão (III). Para a

confeção de lâminas foram realizados cortes de 5 µm de espessura nos blocos de parafina em micrótomo (Leica Microsystems RM2235). Os cortes foram imersos em banho maria 37°C e em seguida colocados em lâmina de vidro.

As lâminas contendo os cortes foram desparafinizadas em Xilol (I e II), reidratadas na sequência de etanol absoluto I e II, 90% e 70%. As lâminas foram imersas em solução de hematoxilina por 1 a 3 minutos, seguida de lavagem em água corrente durante 5 minutos. Em seguida, os cortes foram imersos em coloração de eosina durante 5 a 7 minutos, seguida pela desidratação dos cortes em ordem crescente de etanol e fechamento das lâminas com lamínula e solução Entellan (Merck, Alemanha).

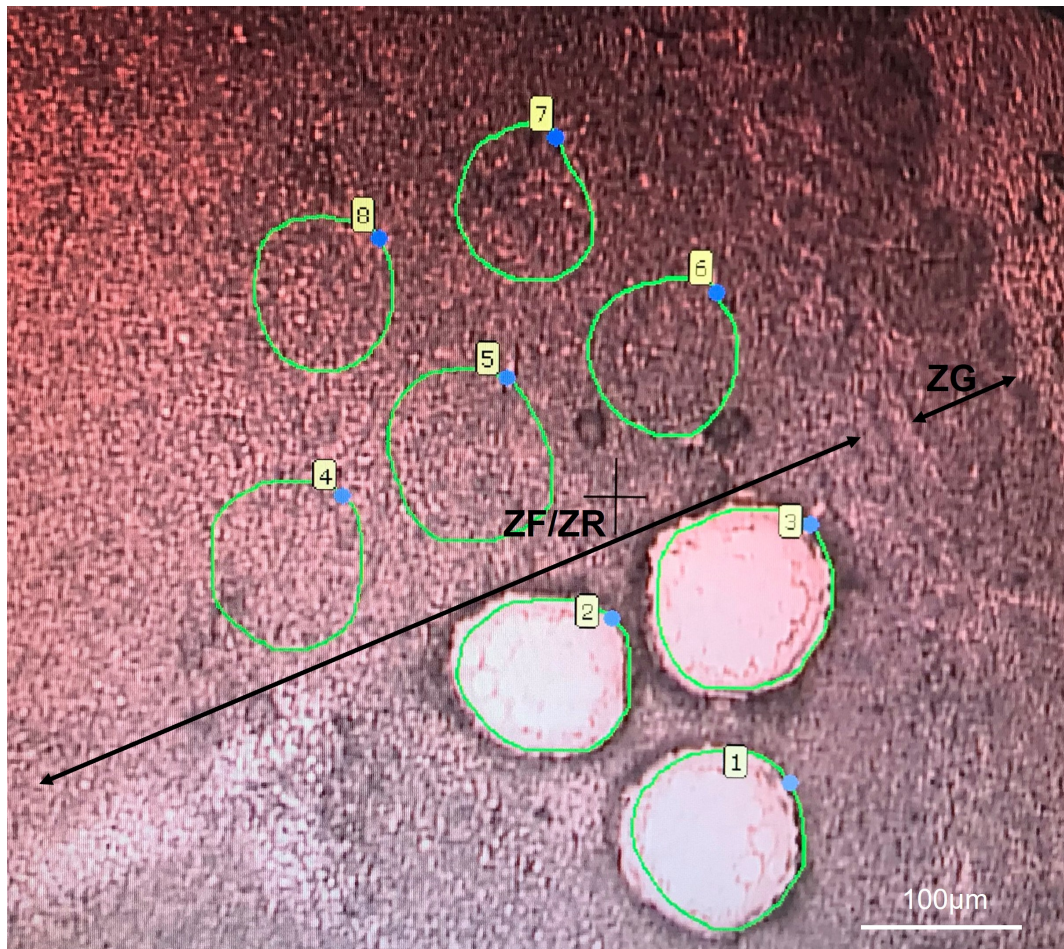
#### **4.1.3 Processamento das amostras pré e pós microdissecção de captura a laser**

As glândulas adrenais congeladas e mantidas em nitrogênio líquido foram colocadas em um suporte do criostato e incluídas em solução de glicóis (*Optimal Cutting Temperature*, O.C.T, Fisher HealthCare, Houston, EUA) solúvel em água, que em temperatura inferior a -10°C se solidifica, tornando possível a confecção das seções. O criostato foi refrigerado previamente a -25°C para realização dos cortes de 10 a 15µm (Leica CM1850). Foram colocados 3 cortes sobre cada lâmina contendo membranas de 2µm livres de RNase e DNase (*Pen-membrane slides*, Leica Microsystems #11505189), seguido da coloração com azul de toluidina para que fosse possível a identificação das zonas do córtex adrenal. Para a coloração, as lâminas foram imersas em etanol 95% diluído em água DEPC e refrigerado a -20°C por 30 segundos, e então 10 gotas de azul de toluidina 1% diluída em água DEPC filtrada em filtro de seringa 0,22 µm foram adicionadas por 30 segundos. Retirado o excesso de corante por inversão das lâminas, estas foram imersas repetidas vezes em etanol 75% em água DEPC por 20 segundos para retirar o excesso de corante. O mesmo procedimento de imersão foi realizado em etanol 95% em água DEPC e etanol 100%. As lâminas foram mantidas sem lamínula, em gelo seco, até o transporte para o laboratório de microdissecção de captura a laser.

A técnica de microdissecção foi realizada no laboratório de Patologia Molecular LIM 22 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob coordenação do Professor Dr. Chin Jia Lin. No microscópio de microdissecção a laser PALM Microbeam (Carl Zeiss, Alemanha) um feixe de laser foi programado com foco 80 e energia 80 para ablação fria do tecido, sem causar dano ou prejuízo do tecido e seu material genético. A zona glomerulosa, e posteriormente a zona fasciculada em conjunto com a zona reticular, foi delimitada e cortada pelo laser (figura 9). Em seguida um único tiro de laser foi utilizado para retirar o fragmento de tecido dissecado e lançar para a tampa de tubo de 1,5 mL invertido, contendo 10  $\mu$ L de solução de lise.



Figura 9 - Secção transversal obtida de amostra de adrenal de cão criopreservada.



Nota: Demonstração da área de demarcação para microdissecção (região superior da imagem) da zona fasciculada em conjunto com a zona reticular (ZF/ZR) e após captura do material (região inferior da imagem). Na fotomicrografia a zona glomerulosa (ZG) permanecia intacta para aplicação da técnica na sequência. Aumento 200x. Barra: 100 µm.

Das glândulas adrenais que foram submetidas à microdissecção a laser, obtivemos amostras da zona glomerulosa e amostras das zonas fasciculada e reticular. O micro kit de extração de RNA total Ambion® RNAqueous® (Thermofisher, AM 1931, EUA) foi projetado para isolar RNA de amostras em microescala e recuperar o material genético de amostras obtidas de tecido microdissecado. O procedimento começa lisando a amostra em 100 µL (adicionados 90 µL para somar aos 10 µL adicionados previamente na tampa, no processo de captura) de uma solução de lise contendo

tiocianato de guanidínio, um forte agente que rompe rapidamente as membranas e inativa rapidamente as ribonucleases. O material foi homogeneizado no vórtex brevemente e centrifugado brevemente a 10000 x g, a amostra foi incubada por 30 minutos à 42°C. A solução contendo o lisado foi acrescida de 3 µL do aditivo denominado LCM e passado vigorosamente no vórtex e centrifugada brevemente a 10000 x g. Na sequência, 129 µL foram adicionados à mistura para recuperar espécies de RNA grandes e pequenas, seguida de homogeneização por pipetagem suave. O tubo contendo o microfiltro de sílica foi umedecido com solução de lise e centrifugado conforme descrito pelo fabricante, antes de colocar a mistura contendo a amostra. A solução contendo o lisado foi adicionada no microfiltro, fechada a tampa e centrifugada por 1 minuto a 10000 x g para ligar o RNA no filtro. Foi adicionado 180 µL da solução de lavagem 1 ao filtro e novamente submetida a amostra à centrifugação por 1 minuto a 10000 x g. A lavagem foi repetida outras duas vezes com a solução 2/3. O tubo coletor destas soluções foi dispensado e o microfiltro contendo o RNA de interesse passado para um tubo de 1,5 mL. O material foi eluído em 14 µL da solução de eluição pré-aquecida à 95°C aplicado no centro do microfiltro. Após 5 minutos à temperatura ambiente, o conjunto foi centrifugado por 1 minuto a 10000 x g. O RNA total obtido de cada amostra foi armazenado à -80°C.

#### **4.1.4 Extração de RNA total tecidual, quantificação e controle de qualidade do RNA**

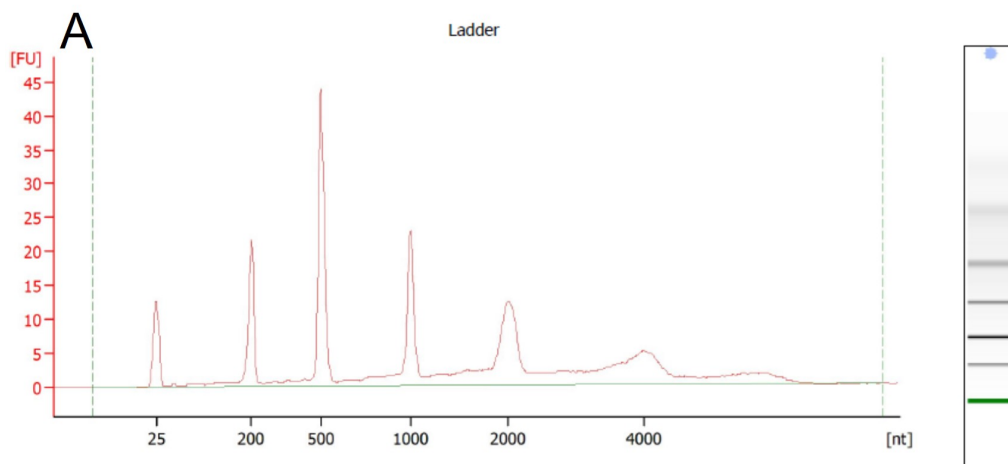
O córtex adrenal dissecado e mantido em nitrogênio líquido como descrito no item 4.1.1 foi processado para extração de RNA total com o RNeasy Micro kit (Qiagen, EUA). Foram adicionados a cada tubo 350 µL do tampão de lise RLT contendo guanidina, em seguida com auxílio de uma tesoura fina o tecido foi cortado em minúsculos pedaços para facilitar a liberação do material genético de dentro das células. O lisado foi centrifugado durante 3 minutos a 12000 x g. Cuidadosamente o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Foi adicionado 350 µL de etanol 70% ao lisado e homogeneizado por pipetagem. A amostra foi transferida para a coluna com membrana de sílica acopladas a tubos coletores de 2 ml e centrifugadas durante 15 segundos à 8000 x g. O RNA foi ligado à membrana da coluna e o líquido

no tubo coletor contendo possíveis proteínas foi dispensado. Em seguida foram adicionados à coluna 350  $\mu\text{L}$  de tampão de lavagem da membrana RW1 que foi submetida a nova centrifugação durante 15 segundos à 8000 x g. Na sequência foi trocado o tubo coletor e adicionado 500  $\mu\text{L}$  de tampão RPE acrescido de etanol para concentração do ácido nucleico na membrana e novamente ocorreu centrifugação durante 15 segundos à 8000 x g. O líquido no tubo coletor foi desprezado e 500  $\mu\text{L}$  de etanol 100% foram adicionados à coluna, que foi novamente submetida à centrifugação durante 2 minutos à 8000 x g. A coluna foi sobreposta em novo tubo de 1,5 mL, adicionados 30  $\mu\text{L}$  de água deionizada livre de RNases e submetida à centrifugação durante 1 minuto à 12000 x g para eluição do RNA ligado à membrana.

Para quantificar e analisar a qualidade do RNA total extraído das amostras microdissecadas no item 4.1.2 e neste item a partir do córtex adrenal, foi utilizado o kit Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, EUA). A técnica utiliza chips para separação dos ácidos nucleicos e se baseia no método de eletroforese, a fluorescência emitida pelas bandas de RNA são registradas, os resultados são plotados em gráfico do software. Antes de colocar as amostras na placa, é necessário preparar o gel de leitura das bandas (RNA 6000 pico gel matrix), aplica-se em cada reservatório do chip, 9  $\mu\text{L}$  do gel de poliacrilamida com o intercalador fluorescente (RNA 6000 pico dye concentrate). No chip foi aplicado 1  $\mu\text{L}$  da amostra homogeneizada com marcador de corrida 5  $\mu\text{L}$  nos poços correspondentes a amostras, em 1 poço 1  $\mu\text{L}$  do ladder fornecido no kit e 1 poço 1  $\mu\text{L}$  do controle negativo. O resultado desta eletroforese capilar em gel com detecção de fluorescência induzida a laser no aparelho de leitura Agilent 2100 Bioanalyzer Instrument utiliza um software (2100 Expert Software) que quantifica e calcula a concentração em  $\text{pg}/\mu\text{L}$  e analisa a integridade do RNA. O software fornece um gráfico obtido do calibrador que apresenta sete picos das bandas de RNA controle (gráfico 1A). E gráficos de resultados das quantificações das amostras com dois picos referentes às bandas 18S e 28S do RNA, sendo fundamental para determinação da integridade do RNA e cálculo do RIN (*RNA integrity number*) como demonstrado no gráfico 1B. O RIN é um valor de qualidade do RNA que varia de 1 (completamente degradado) a 10 (RNA altamente intacto).

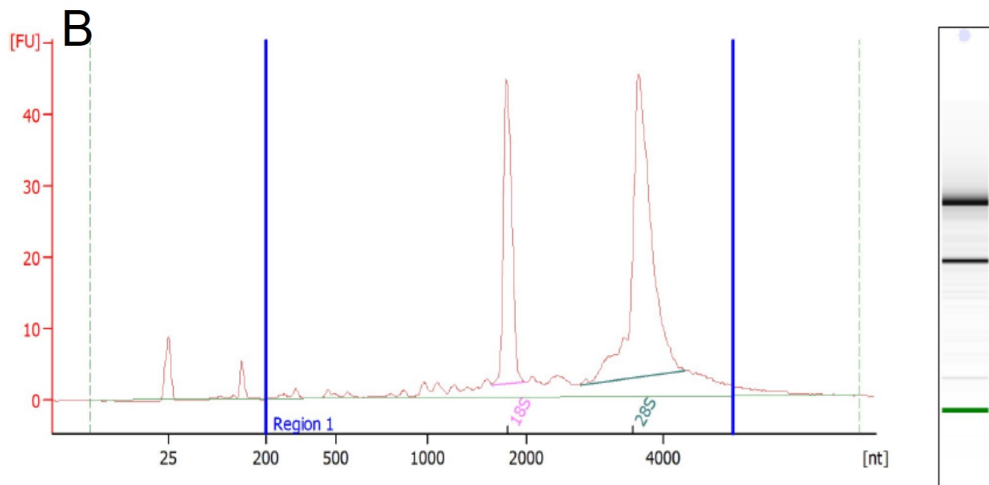
Nas amostras de extração de RNA total a partir do córtex adrenal a qualidade também foi checada pela corrida em gel de agarose 2% corado com SyberSafe Gold (S11494, ThermoFischer, EUA).

Gráfico 1 - Resultado de análise do software 2100 Expert do Agilent 2100 Bioanalyzer, demonstrando o ladder utilizado como calibrador (A), e gráfico representativo evidenciando alta qualidade do RNA total, com identificação dos picos referentes às bandas 18S e 28S.



**Overall Results for Ladder**

RNA Area:	253.8	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #add8e6; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
RNA Concentration:	1,000 pg/μl	Result Flagging Label:	All Other Samples



**Overall Results for sample 4 :**

RNA Area:	282.7	Result Flagging Color:	<span style="background-color: #add8e6; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 20px; height: 10px;"></span>
RNA Concentration:	1,114 pg/μl	Result Flagging Label:	RIN: 9.50
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.0	Corr. Area 1:	269.0
RNA Integrity Number (RIN):	9.5 (B.02.10, Anomaly Threshold(s) manually adapted)		

#### 4.1.5 Preparo de biblioteca e sequenciamento em sistema PacBio

O preparo das bibliotecas Iso-Seq SMRTbell foram realizadas conforme recomendado pelo fabricante (*Pacific Biosciences*, EUA). A recomendação do fabricante é utilizar RNA total, cujo RIN seja superior a 7 e tenha concentração superior a 300ng/ $\mu$ L. A partir das amostras de RNA foi sintetizado o cDNA utilizando o módulo de síntese e amplificação do cDNA NEBNext Single Cell/Low Input cDNA (NEB#E6421L, EUA) que usa um primer oligodT modificado e tecnologia para produzir transcritos reversos de comprimento total poliadenilados. Para a transcrição reversa o protocolo iniciou-se pela adição de 200ng de RNA total e água deionizada livre de RNases para um volume final de 7  $\mu$ L em microtubo estéril. Em seguida para cada amostra adicionou-se 2  $\mu$ L de NEBNext Single Cell RT Primer Mix para anelamento dos primers ao RNA, homogeneizado por pipetagem suave dez vezes, e centrifugado brevemente. A mistura foi incubada por 5 minutos à 70°C em termociclador com a tampa do aparelho aquecida à 105°C. Após a última incubação adicionou-se à solução 5  $\mu$ L de NEBNext Single Cell RT Buffer, 1  $\mu$ L NEBNext Template Switching Oligo, 2  $\mu$ L de NEBNext Single Cell RT Enzyme Mix e 3  $\mu$ L de água deionizada livre de RNases. A mistura foi homogeneizada por pipetagem suave e centrifugada brevemente. As reações foram incubadas no termociclador à 42°C durante 90 minutos, em seguida à 70°C durante 10 minutos e então mantido à 4°C. Para a amplificação do cDNA pelo termociclador foram adicionados 50  $\mu$ L de NEBNext Single Cell cDNA PCR Master Mix, 2  $\mu$ L de NEBNext Single Cell cDNA Primer, 0,5  $\mu$ L de tampão NEBNext Cell lysis e 27,5  $\mu$ L de água deionizada livre de RNases. A mistura foi incubada no termociclador com uma programação de denaturação à 98°C por 45 segundos, seguido de 10 ciclos de denaturação à 98°C por 10 segundos, anelamento à 62°C por 15 segundos, extensão à 65°C por 3 minutos, e um ciclo de extensão final à 65°C por 5 minutos, depois manutenção à 4°C. Na sequência uma etapa de remoção das impurezas foi seguida de acordo com instruções do fabricante, sendo adicionado 60  $\mu$ L das *beads* magnéticas em cada amostra, passado no vórtex 5 segundos e centrifugado brevemente, e então, incubada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram posicionados na rack magnética e mantidos em repouso

para promover a captura das beads no imã da rack por 5 minutos. O líquido com as amostras foi removido com auxílio de pipetas.

O sequenciamento foi realizado em colaboração com o Instituto Icahn de Ciência de Dados e Tecnologia Genômica da Escola de Medicina Icahn no Monte Sinai (NY, EUA) sob a coordenação da Dra Nancy Francoeur. Para o preparo das bibliotecas foi utilizado o kit SMRTbell Express Template preparation v2.0 (*Pacific Biosciences*, 101-685-400), onde o cDNA de cada amostra foi tratado com uma mistura de enzimas para reparação de danos de DNA, seguido de uma reação de reparação final. Em seguida os *barcodes* ligados aos adaptadores SMRTbell foram ligados em cada amostra. Esta estratégia objetiva otimizar o uso das SMRTcells, sendo realizado um *pool* de 3 amostras para cada SMRTcell, de forma que na etapa de análise bioinformática fosse possível identificar os diferentes animais. Na sequência, as amostras foram purificadas utilizando o 0,6 AMPure PB beads para remover os pequenos fragmentos e o excesso de reagentes. As bibliotecas SMRTbell foram tratadas com o kit SMRTbell Enzyme Clean UP para remover as fitas molde não ligadas. Em seguida as bibliotecas foram aneladas aos primers sequenciadores denominados v4 e ligados a polimerase 3.0 antes de serem sequenciados em duas SMRTcells 8M no sistema Sequel II com vídeo de 30 horas.

#### **4.1.6 Bioinformática dos dados de Iso-Seq dos córtex de adrenais de cães**

As montagens do transcriptoma foram realizadas pelo Laboratório Central de Tecnologias de Alto Desempenho (LaCTAD) da Unicamp. Os arquivos resultantes do sequenciamento de *long reads* no sistema PacBio (Iso-Seq) foram pré-processados no software Iso-Seq v3 disponibilizado pela empresa *Pacific Biosciences* (<https://github.com/PacificBiosciences/IsoSeq>). O Iso-Seq v3 contém ferramentas mais recentes para identificar transcritos em dados de sequenciamento de molécula única da PacBio, nela cada sequência circular consenso (ccs) foi processada para gerar uma sequência representativa linear. Com a ferramenta ‘Lima’ na etapa de remoção dos primers e demultiplex foram retiradas as sequências de primers e os *barcodes* que identificavam cada amostra. Nesta etapa foi possível identificar as sequências de transcritos completos (*full-length*) por possuírem a cauda poliA. Com a ferramenta ‘Trimming’ e ‘Identification’ foi realizado o refinamento no qual a cauda poliA das

sequências é removida e são descartados os concatâmeros (repetições em tandem que podem ser geradas durante a preparação das bibliotecas).

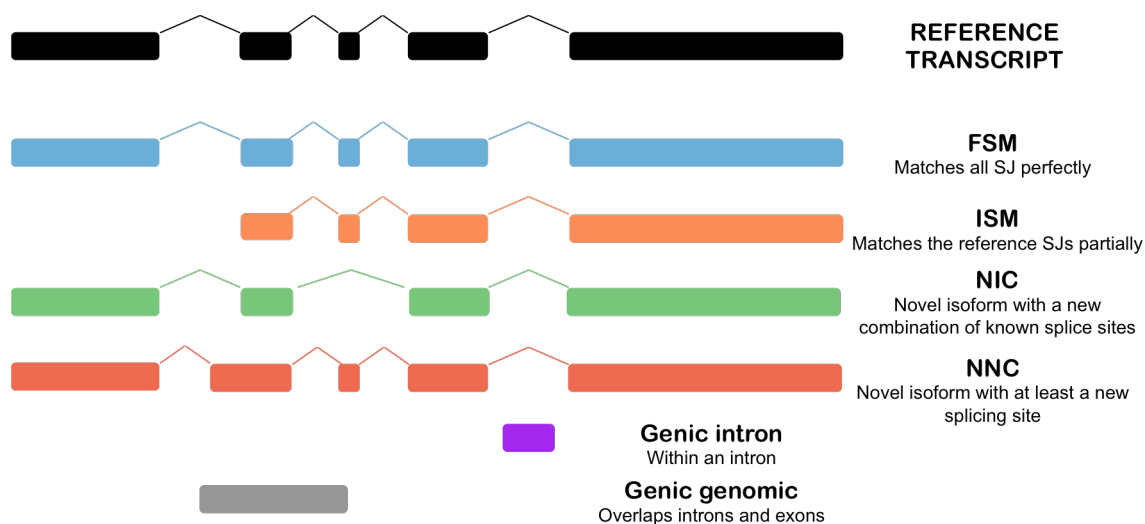
Com as ferramentas ‘Alignment’ e ‘Cluster’ as sequências resultados foram agrupadas para gerar um consenso por transcrito e avaliada a qualidade do consenso. Com auxílio do software Minimap2 (LI, 2018) os transcritos de cada amostra foram mapeados no genoma de referência ROS\_Cfam\_1.0 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_014441545.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_014441545.1/)), último genoma sequenciado em 2020 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_014441545.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_014441545.1/)).

Os arquivos de mapeamento foram ordenados no software SAMtools (DANECEK et al., 2021), inicialmente foram convertidos de formato “sam” para “bam” e ordenação das sequências mapeadas. Utilizando as sequências mapeadas e os arquivos agrupados de alta qualidade, foi utilizado o script ‘collapse\_isoforms\_by\_sam.py’ do pacote Cupcake ([https://github.com/Magdoll/cDNA\\_Cupcake/wiki](https://github.com/Magdoll/cDNA_Cupcake/wiki)) para colapsar isoformas idênticas e agrupar isoformas pertencentes ao mesmo locus. A partir deste arquivo foi possível obter a abundância de cada isoforma, e para isso foi utilizado o script ‘get\_abundance\_post\_collapse.py’ do pacote Cupcake. Como o kit SMARTer cDNA utilizado para criar o cDNA *full-length* não faz o 5’ cap trap, é possível que a degradação do RNA produza transcritos com um 5’ que não é verdadeiro. Observando a estrutura de algumas isoformas de um mesmo locus constatou-se que foram geradas isoformas curtas que têm a mesma estrutura de éxons da versão completa, porém sem alguns éxons do 5’. Como esses casos têm mais chance de ser produto da degradação do que algo com significado biológico, foi realizado um filtro para retirar essas isoformas utilizando o script ‘filter\_away\_subset.py’ do pacote Cupcake. As isoformas identificadas foram comparadas com a anotação do genoma de referência utilizando o software SQANTI3 (TARDAGUILA et al., 2018).

O software SQANTI3 categoriza cada isoformas de acordo com a transcrição de referência (figura 10), classificando em 1) *Full Splice Match* (FSM) significa que as isoformas encontradas e a de referência tem o mesmo número de exons e há concordância em cada junção entre exons, 2) *Incomplete Splice Match* (ISM) são as isoformas que faltam exons na extremidade 5’ quando comparadas ao gene de referência, mas há concordância em cada junção entre exons, 3) *Novel In Catalog* (NIC) são novas isoformas com novas combinações de sítios de splice conhecidos, 4)

*Novel Not in Catalog (NNC)* quando as isoformas de consulta não tem uma correspondência com outros anteriores, como FSM e ISM, mas tem um sítio *splice* não anotado, 5) *Antisense* é a isoforma que não tem sobreposição de um gene de referência da mesma fita, mas é antisense para um gene anotado, 6) *Genic Intron* é quando a isoforma está completamente contida em um íntron anotado, 7) *Genic Genomic* quando a isoforma se sobrepõe com íntrons e exons, e 8) *Intergenic* quando a isoforma está na região intergênica.

Figura 10 - Disposição esquemática dos exons de um exemplo de gene de referência e a classificação de diferentes isoformas



Fonte: SQANTI3, 2022.

#### 4.1.7 Bioinformática dos dados de RNA-seq obtidos do repositório público *Sequence Read Archive*

Uma avaliação complementar foi realizada para a análise de possíveis variantes de *splicing alternativo* da CYP11B a partir de dados de RNAseq de córtex das glândulas adrenais de cães depositados em repositório público denominado *Sequence Read Archive* (SRA, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/>). Foram utilizados 6 sequenciamentos de adrenais SRR2157171, SRR2157170, SRR2157166, SRR2157167, SRR3727705 e SRR5889312. Os dados brutos obtidos foram submetidos à avaliação com o *software* FASTQC para análise de qualidade, com a ferramenta fastp os



adaptadores e *reads* de baixa qualidade foram removidos. O mapeador STAR foi utilizado para alinhar os *reads* com o genoma canino de referência, na sequência a reconstrução dos transcritos foi realizado com a ferramenta Scallop (DOBIN et al., 2013; SHAO; KINGSFORD, 2017). Além da procura por isoenzimas e isoformas dos genes em estudo a partir da recuperação das sequências utilizando dados de RNA-seq submetidos no SRA, também buscamos por estas informações nos dados de sequenciamento de 26 tecidos de cães anotados (BÉGUEC et al., 2018). No final das reconstruções as isoformas encontradas foram analisadas pelo CPC2 quanto às suas *Open Reading Frames* (ORFs) para determinar o potencial codificante das sequências obtidas (KANG et al., 2017).

## 4.2 PESQUISA DE VARIANTES DE *SPLICING* EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS DE CÃES

A técnica descrita no item 4.2.1 descreve a coleta e processamento de glândulas adrenais tumorais de cães com SC ACTH-independente.

### 4.2.1 Caracterização dos pacientes e bioinformática dos dados de Iso-Seq

Foram coletados fragmentos dos tumores adrenais de pacientes com Síndrome de Cushing ACTH-independente e imediatamente congelados em nitrogênio líquido até a extração de RNA total de acordo com o protocolo descrito no item 4.1.3 Dados de resenha, anamnese e diagnóstico compatíveis com Síndrome de Cushing ACTH-independente foram apresentados nos resultados. O diagnóstico definitivo anátomo-patológico de carcinoma adrenocortical foi dado pela avaliação histológica e complementada pela imuno-histoquímica. A construção de bibliotecas, sequenciamento e análise bioinformática seguiram os mesmos protocolos da parte 1 do projeto, descritos no item 4.1.4 e 4.1.5.

# ***5 Resultados***

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DAS ISOFORMAS DAS ENZIMAS DA CASCATA ESTEROIDOGÊNICA ADRENAL**

#### **5.1.1 Coleta de glândulas adrenais e controle de qualidade**

Para o desenvolvimento desta fase do estudo foram coletadas glândulas adrenais de 8 cães. As informações relacionadas ao tempo entre o óbito e liberação para coleta das amostras, informações de identificação dos pacientes, bem como a causa do óbito foram apresentadas no quadro 2.

Quadro 2 - Dados de resenha dos cães, causa do óbito e tempo entre o óbito e coleta das amostras (n=8).

<b>Identificação</b>	<b>Sexo</b>	<b>Raça</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Óbito</b>	<b>Tempo de liberação para coleta</b>
#1	M	Teckel	16	Eutanásia (doença de base desconhecida)	3 horas
#2	M	Lhasa Apso	15	Doença renal crônica	4 horas
#3	F	SRD	7	Convulsões	40 minutos
#4	F	Collie	11	Eutanásia (doença de base desconhecida)	2 horas
#5	M	Poodle	14	Doença renal crônica	30 minutos
#6	F	Shih Tzu	15	Neoplasia cerebral/Convulsões	4 horas
#7	M	SRD	8	Atropelamento	45 minutos
#8	M	Cocker	10	Eutanásia (doença de base desconhecida)	1 hora

Legenda: sem raça definida (SRD).

A coleta das glândulas adrenais foi realizada por incisão paracostal. As glândulas foram retiradas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e um fragmento colocado em formol tamponado 4% para posterior análise microscópica. A avaliação das amostras #1, #2, #4 e #6 evidenciaram que o tempo entre o óbito e a

liberação para coleta interfiram na qualidade da amostra, visto que no gel de agarose 2% o RNA apresentava um padrão conhecido como “arraste”, mostrando moderado grau de degradação, embora a determinação das relações à densidade óptica de 260/280nm estivessem excelentes entre 1,8 a 2,0. Portanto, estas amostras foram excluídas da avaliação molecular e não foram enviadas para sequenciamento. A qualidade da integridade do RNA (RIN) e as concentrações (pg/ $\mu$ L) das amostras #3, #5, #7 e #8 que foram enviadas para sequenciamento, foram determinadas pelo Bioanalyzer e estão apresentadas na tabela 1. As amostras #5, #7 e #8 foram processadas no criostato e posteriormente microdissecadas, entretanto, pela concentração e qualidade do RNA extraído a partir desta técnica, apenas a amostra #8 microdissecada seguiu para sequenciamento. A amostra #8 após microdissecção gerou 2 amostras para sequenciamento, uma denominada zona glomerulosa (ZG) e outra denominada zona fasciculada e zona reticular (ZF/R).

Tabela 1- Concentrações e qualidade do RNAt do córtex adrenal utilizado no sequenciamento Iso-Seq.

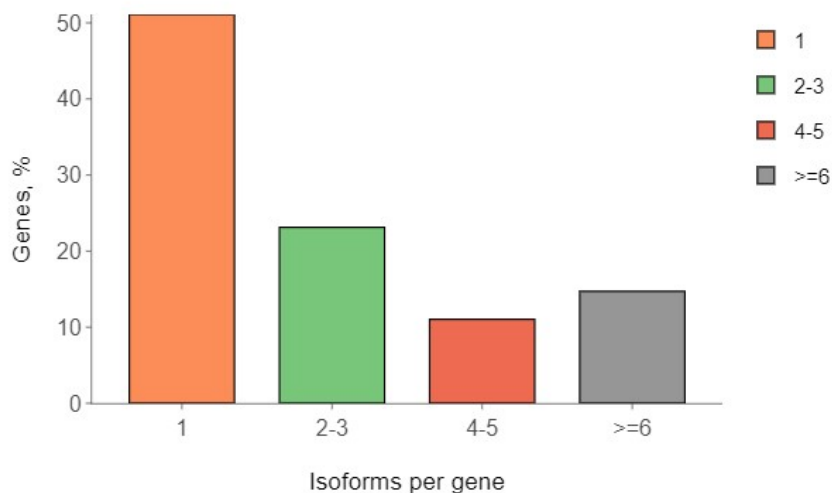
Amostra	Concentração (pg/ $\mu$ L)	RIN
ZG	421	6,5
ZF/R	887	6,7
#3	1501	7,7
#5	1114	9,5
#7	1155	8,8
#8	1298	9,6

Legenda: RNA *Integrity Number* (RIN)

### 5.1.2 Dados de Iso-Seq das enzimas da cascata esteroidogênica

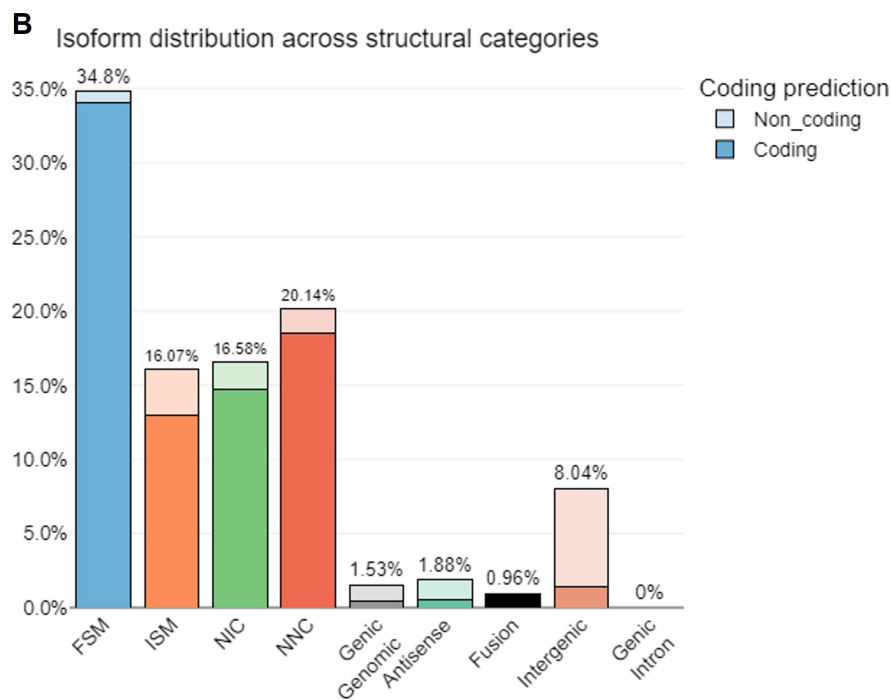
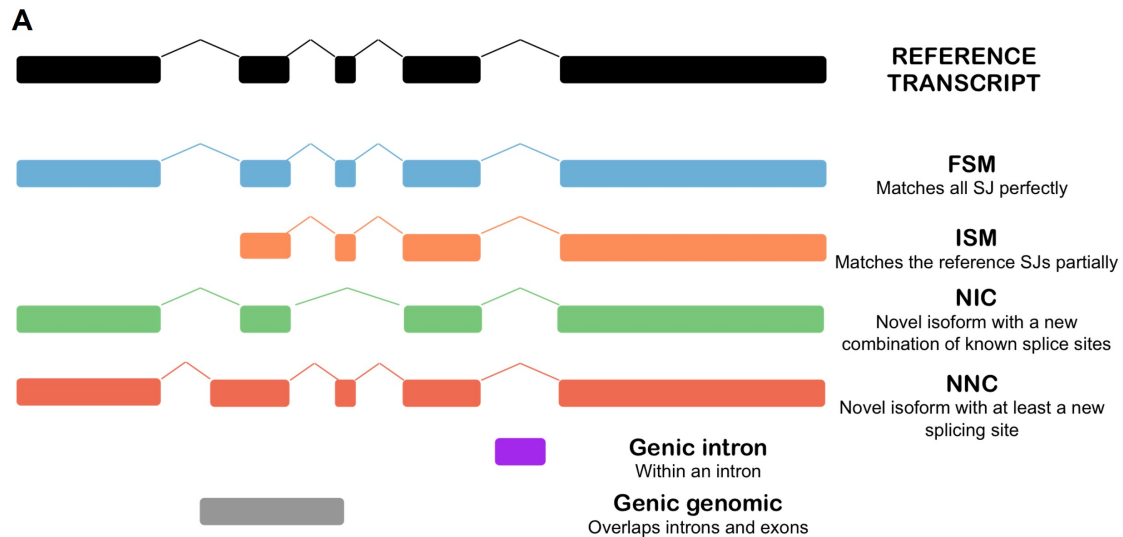
Os transcriptomas das 6 amostras do córtex de adrenais sem endocrinopatias foram sequenciados e analisados na plataforma Sequel II da PacBio para capturar com precisão as sequências completas e variantes de *splicing*. Com o SMRT obteve-se um total de 66.733 transcritos de alta qualidade. Pela análise de bioinformática foram identificados 16.668 genes e 50.065 isoformas nas amostras #3, #5, #7 e #8. Dentre os 16.668 genes, 11.881 já foram anotados no genoma canino e 4.787 são novos genes. Aproximadamente 51% dos genes produzem uma única isoforma, 23% 2 a 3 isoformas, 11% de 4 a 5 isoformas e 14% fazem *splicing* alternativo e produzem 6 ou mais isoformas por gene (gráfico 2).

Gráfico 2 - Número de isoformas do córtex adrenal de cães por gene.



As 50.065 isoformas identificadas nesta etapa do estudo foram mapeadas com genoma canino ROS\_Cfam\_1.0 de 2020. De acordo com as categorias das isoformas tivemos um total de 34,8% de isoformas do tipo *Full Splice Match* (FSM, combina perfeitamente com transcritos conhecidos), 16,07% *Incomplete Splice Match* (ISM, combina parcialmente com transcritos conhecidos: falta exon), 16,58% de *Novel In Catalog* (NIC, são novas isoformas com novas combinações de sítios de *splice* conhecidos), 20,14% de *Novel Not in Catalog* (NNC, tem um sítio *splice* não anotado), 1,53 % de *Genic Genomic*, 1,88 % de *Antisense*, 0,96% *Fusion*, 8,04% de *Intergenic* e nenhuma *Genic Intron*. No gráfico 3 podemos observar a estrutura das isoformas, a distribuição das isoformas de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante, sendo que as isoformas da categoria FSM, ISM, NIC, NNC e genes de fusão tem alto potencial codificante.

Gráfico 3 - Ilustração da estrutura das isoformas (A). Distribuição das isoformas das adrenais de cães de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante (B) (cores claras representam isoformas não codificantes e cores escuras isoformas codificantes).

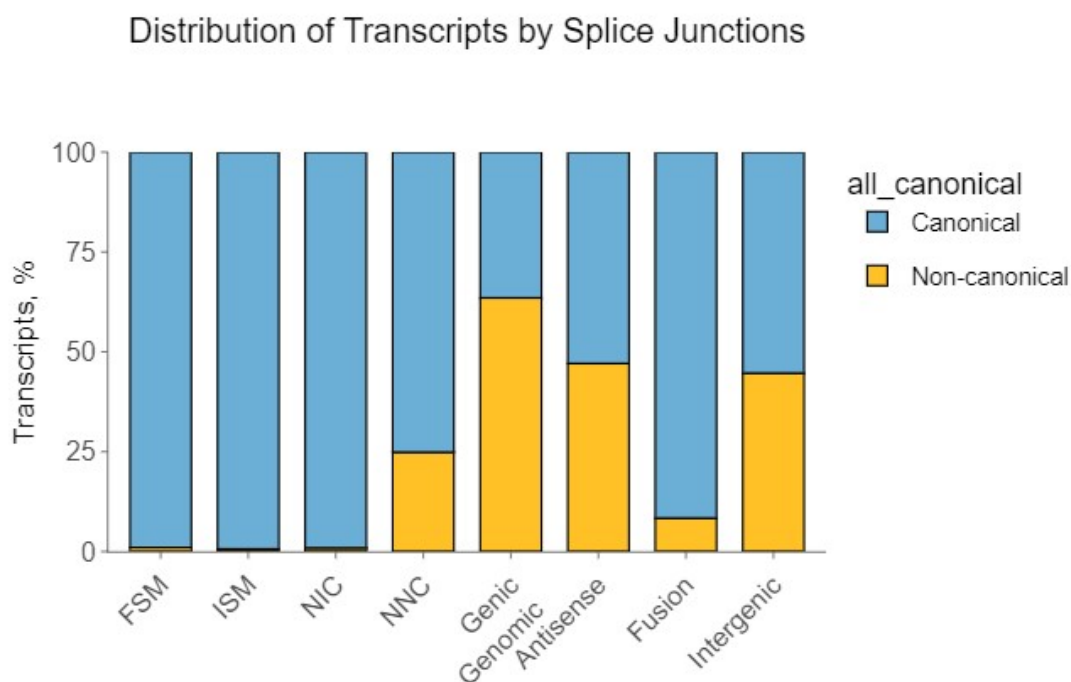


No gráfico 4 foram plotadas a distribuição de todas as isoformas obtidas por Iso-Seq de acordo com seus sítios de *splicing* conhecidos (canonical) e não conhecidos (non-canonical). Desta forma, temos 1%, 0,6%, 0,8%, 24,8% de sítios de *splicing* não canônicos nas categorias, FSM, ISM, NIC e NNC, respectivamente. Nas demais



categorias temos 63,5%, 47,0%, 8,2% e 44,6% nas categorias *Genic Genomic*, *Antisense*, *Fusion* e *Intergenic*, respectivamente.

Gráfico 4 - Distribuição das isoformas das glândulas adrenais de cães pelos sítios de *splicing* canônicos e não canônicos.



Os resultados do sequenciamento Iso-Seq das isoformas das enzimas da cascata esteroidogênica são apresentados nas figuras de 13 a 18. Neste estudo foi observado que a enzima STAR tem 178 variantes de *splicing*, a CYP11A1 tem 33, a HSD3B tem 22, a CYP17A1 tem 74 e a CYP21A2 tem 48 (quadro 3).

Quadro 3 - Loci dos genes que codificam enzimas da cascata esteroidogênica da adrenal de cães e número de isoformas de cada um.

<b>Gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Localização</b>	<b>nº de isoformas</b>
STAR	16	NC_051820.1 (29225542..29230211)	178
CYP11A1	30	NC_051834.1 (37680903..37692929)	33
HSD3B	17	NC_051821.1 (57425539..57433679)	22
CYP17A1	28	NC_051832.1 (15766953..15772955)	74
CYP21A2	12	NC_051816.1 (1592467..1595553)	48

Nas figuras de 11 a 16 foram apresentadas as sequências gênicas e possíveis isoformas das enzimas da cascata esteroidogênica de humanos, de acordo com o último sequenciamento GRCh38.p14 publicado em fevereiro de 2022 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_000001405.40/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_000001405.40/)). Em humanos há inúmeros genes com isoformas, entretanto, especificamente as enzimas da cascata esteroidogênica possuem poucas ou nenhuma isoforma. Já no genoma de cães nenhuma isoforma foi anotada até o momento. Há isoformas preditas automaticamente pelo sistema Gnomon do NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/core/assets/genome/files/Gnomon-description.pdf>), mas nenhuma gerada a partir de estudos de sequenciamento ou validadas, por este motivo, não foram apresentadas nas figuras de 11 a 18.

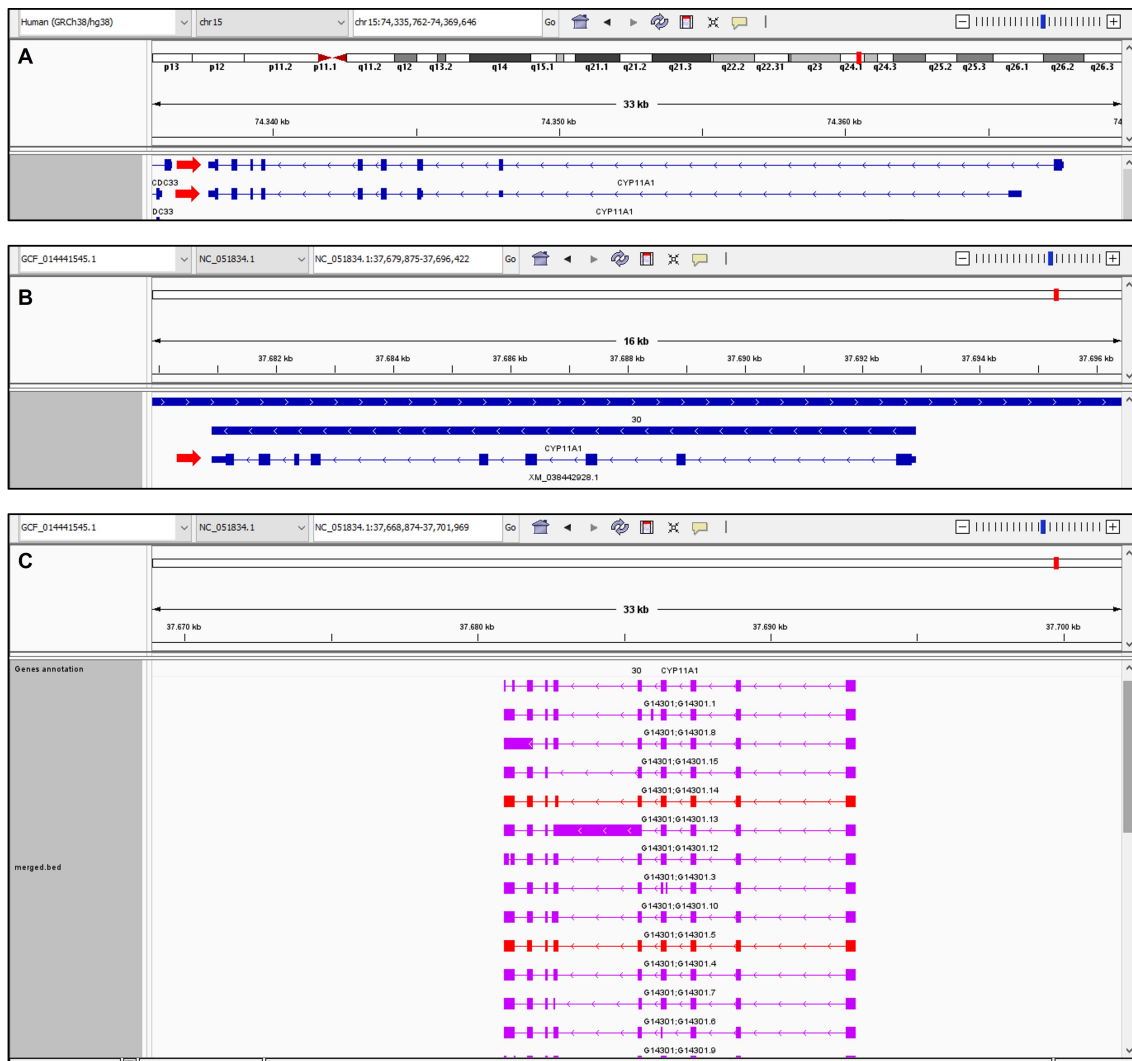
Na figura 11 foi demonstrado que no genoma humano e de cães não foi anotada nenhuma isoforma para o gene STAR (figura 13A e 13B). Os resultados obtidos do sequenciamento Iso-Seq mostraram 178 isoformas do gene STAR, sendo 8 da categoria FSM, 1 gênica, 22 NIC e 147 NNC (figura 11C).

Figura 11 - Locus do gene STAR em humanos com apenas 1 transcrito (A, seta vermelha). Locus do gene STAR em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 178 variantes do gene STAR a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).



Na figura 12 está demonstrado que no genoma humano há 1 isoforma do gene CYP11A1 (figura 12A). Em cães não foi anotada nenhuma isoforma para o gene CYP11A1 (figura 12B). Os resultados obtidos do sequenciamento Iso-Seq mostraram 33 isoformas do gene CYP11A1, sendo 1 da categoria FSM, 1 ISM, 5 NIC e 26 NNC (figura 12C).

Figura 12 - Locus do gene CYP11A1 em humanos com 2 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP11A1 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 33 variantes de *splicing* do gene CYP11A1 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).



Na figura 13A estão representados os loci do gene HSD3B1 e do gene HSD3B2 em humanos, evidenciando que há dois genes que produzem isoenzimas. Há 1 isoforma prevista para cada gene. Já na figura 13B foi demonstrado que há apenas 1 gene que codifica a enzima 3 $\beta$ -hidroesteroide desidrogenase em cães, até então denominado de HSD3B2, entretanto, não há o gene HSD3B1 nesta espécie. No presente estudo foi possível identificar 22 isoformas do gene HSD3B, sendo 1 FSM, 1 isoforma de fusão, 3 ISM, 4 NIC e 13 NNC (figura 13C).

Figura 13 - Loci dos genes HSD3B1 e HSD3B2 em humanos com 2 transcritos cada (A, setas vermelhas). Locus do gene HSD3B em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Identificação das 22 variantes de *splicing* do gene HSD3B a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).



Na figura 14 está demonstrado que no genoma humano há 1 isoforma do gene CYP17A1 (figura 14A). Em cães não foi anotada nenhuma isoforma para o gene CYP17A1 (figura 14B). Os resultados obtidos do sequenciamento Iso-Seq mostraram

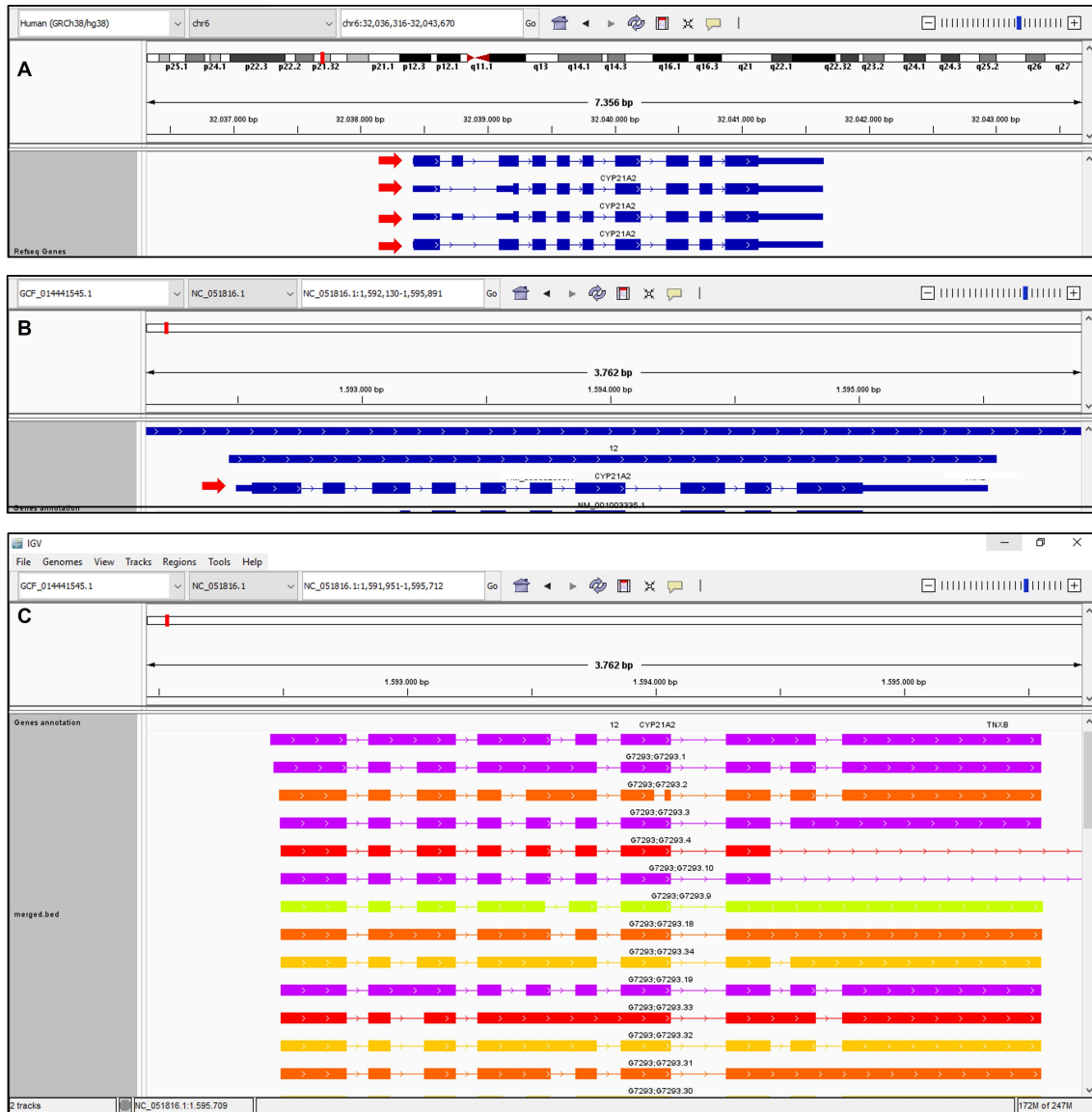
74 isoformas do gene CYP17A1, sendo 4 da categoria FSM, 16 NIC e 54 NNC (figura 14C).

Figura 14 - Locus do gene CYP17A1 em humanos com 2 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP17A1 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 74 variantes de *splicing* do gene CYP17A1 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).



Na figura 15 está demonstrado que no genoma humano há 3 isoformas do gene CYP21A2 (figura 15A). Em cães não foi anotada nenhuma isoforma para o gene CYP21A2 (figura 15B). Os resultados obtidos do sequenciamento Iso-Seq mostraram 48 isoformas do gene CYP21A2, sendo 3 da categoria FSM, 4 ISM, 2 gênico, 1 intergênico, 31 NIC e 8 NNC (figura 15C).

Figura 15 - Locus do gene CYP21A2 em humanos com 4 transcritos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP21A2 em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Representação parcial das 48 variantes de *splicing* do gene CYP21A2 a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães (C).



Não foi possível pelo método Iso-Seq identificar isoformas representativas para o gene CYP11B como demonstrado na figura 16.

Figura 16 - Locus do gene CYP11B demonstrando falha na identificação das isoformas a partir do Iso-Seq de glândulas adrenais de cães.



Baseado no relatório gerado pela análise realizada pelo software SQANTI3 foi possível determinar quais eram as sequências potencialmente codificantes e não codificantes pela análise de suas *Open Reading Frames* (ORFs), ou seja, as sequências compreendidas entre um códon de início da tradução e um códon de terminação. Outra avaliação importante de qualidade é o mecanismo denominado *nonsense mediated decay* (NMD) que rapidamente retira transcritos anômalos que poderiam danificar a célula. Este mecanismo funciona como um controle de qualidade genética e representa uma importante via de regulação de transcritos. Desta forma, os resultados foram filtrados pelo controle de qualidade NMD e infere-se alta probabilidade de serem verdadeiras 96 isoformas dentre as 178 descritas do gene STAR, 11 isoformas verdadeiras de 33 descritas do gene CYP11A1, 1 isoforma verdadeira de 22 descritas do gene HSD3B, 14 isoformas verdadeiras de 74 descritas do gene CYP17A1, e 14 isoformas verdadeiras de 48 descritas do gene CYP21A2 (quadro 4).



Quadro 4 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas da cascata esteroidogênica adrenal de cães.

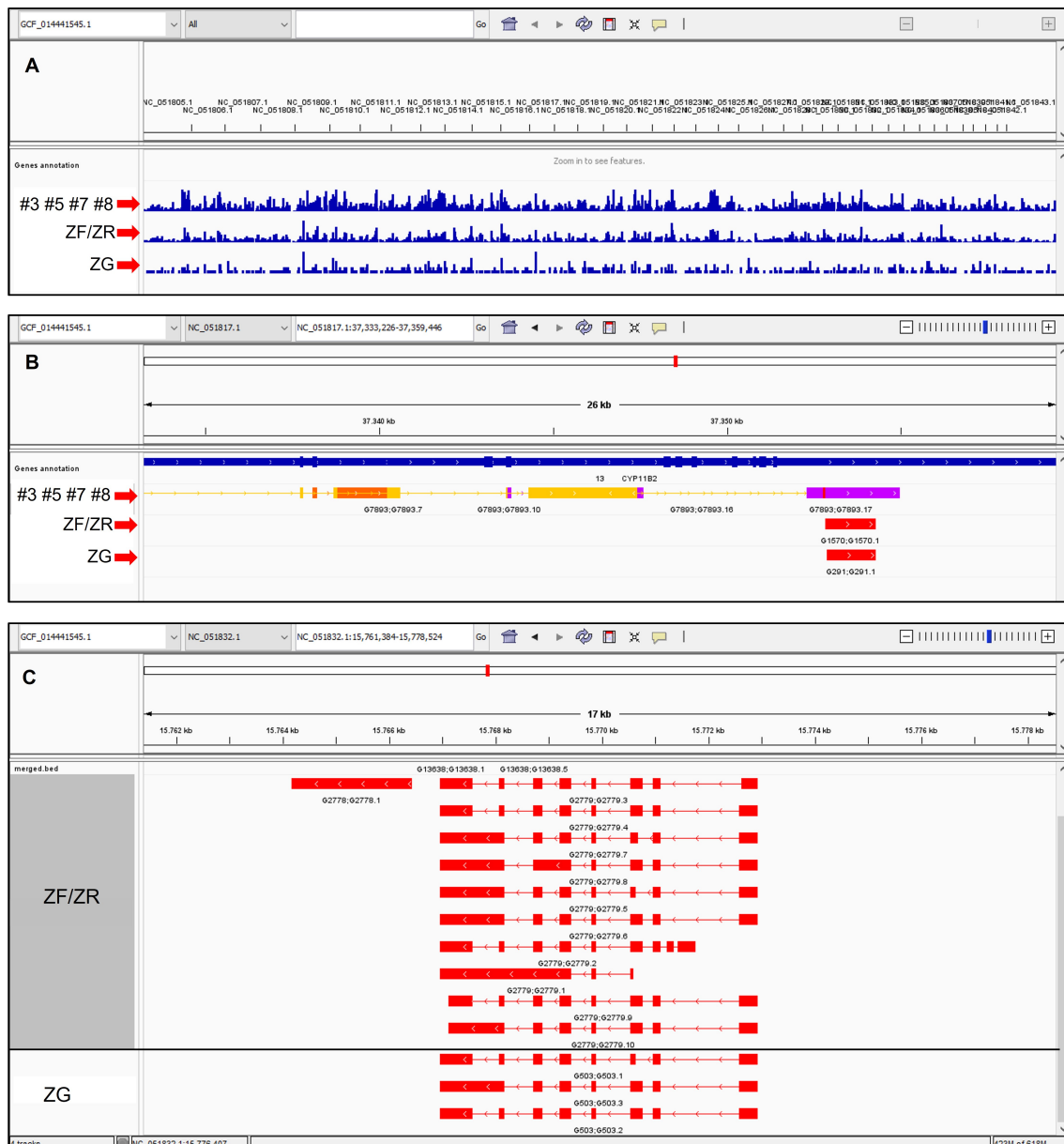
<b>Gene</b>	<b>Categoria da isoforma</b>	<b>n° de isoformas/categoria</b>	<b>Codificante/não codificante</b>	<b>NMD (isoformas verdadeira/falsa)</b>
<b>STAR</b>	FSM	8	8 codificantes	8 falsas
	Gênica	1	1 codificante	1 falsa
	NIC	22	22 codificantes	12 verdadeiras/10 falsas
	NNC	147	143 codificantes/4 não codificantes	84 verdadeiras/63 falsas
<b>CYP11A1</b>	FSM	1	1 codificante	1 falsa
	ISM	1	1 codificante	1 falsa
	NIC	5	5 codificantes	4 verdadeiras/ 1 falsa
	NNC	26	25 codificantes/1 não codificante	7 verdadeiras/19 falsas
<b>HSD3B</b>	FSM	1	1 codificante	1 falsa
	ISM	3	3 codificantes	3 falsas
	Fusão	1	1 codificante	1 falsa
	NIC	4	4 codificantes	4 falsas
	NNC	13	13 codificantes	1 verdadeira/12 falsas
<b>CYP17A1</b>	FSM	4	4 codificantes	4 falsas
	NIC	16	16 codificantes	4 verdadeiras/12 falsas

				falsas
	NNC	54	54 codificantes	10 verdadeiras/44 falsas
<b>CYP21A2</b>	FSM	3	3 codificantes	3 falsas
	ISM	4	4 codificantes	4 falsas
	NIC	31	31 codificantes	11 verdadeiras/20 falsas
	Intergênico	1	1 não codificante	1 falsa
	NNC	8	8 codificantes	3 verdadeiras/5 falsas

Legenda: FSM: *Full Splice Match*. ISM: *Incomplete Splice Match*. NIC: *Novel In Catalog*. NNC: *Novel Not in Catalog*. NMD: *nonsense mediated decay*.

O resultado da microdissecção da zona glomerulosa e zona fasciculada/zona reticular da amostra #8 está apresentado na figura 17 e tabela 2. Na figura 17A observa-se que a abrangência total do sequenciamento da ZG e ZF/ZR após microdissecção foi inferior ao sequenciamento de córtex total. Como esperado pela menor abrangência e resultado já demonstrado na figura 16, não houve sequenciamento da isoformas CYP11B por esta técnica na ZG e ZF/ZR. Na figura 17C foi demonstrado que houve alguma contaminação por células da ZF/ZR na microdissecção da ZG, interferindo nos resultados.

Figura 17 - Abrangência do sequenciamento de córtex total de 4 amostras de glândulas adrenais de cães (A). Locus do gene CYP11B demonstrando falha na identificação das isoformas a partir do Iso-Seq nas amostras de córtex total, ZG e ZF/ZR (B). Locus do gene CYP17A1 mostrando contaminação das células da ZF/ZR na microdisseção da ZG (C).



### 5.1.3 Dados de RNA-seq da CYP11B obtidos do repositório público *Sequence Read Archive*

Após aplicar a *pipeline* de bioinformática que envolve o download das bibliotecas, controle de qualidade de *reads*, mapeamento no genoma de *Canis lupus familiaris* e reconstrução de transcritos, fomos capazes de identificar 103.448 transcritos. A partir dos dados de RNA-seq foi possível identificar as isoformas da CYP11B. Não foi encontrado outro locus da CYP11B (figura 18B), previamente chamada de CYP11B2 em cães, além da previamente descrita no cromossomo 13 (NC\_051817.1 (37342302..37352691)). Em humanos há a CYP11B1 com 1 isoforma descrita e a CYP11B2 (figura 18A). A reconstrução realizada por nós identificou 14 diferentes isoformas da CYP11B. Entretanto, apenas 7 isoformas com potencial codificante (figura 18C), sendo 2 potencialmente verdadeiras pela avaliação de qualidade NMD (quadro 5).

Figura 18 - Loci dos genes CYP11B1 e CYP11B2 em humanos (A, setas vermelhas). Locus do gene CYP11B em cães com apenas 1 transcrito (B, seta vermelha). Identificação das 7 variantes de *splicing* do gene CYP11B a partir do RNA-se de glândulas adrenais de cães (C).



Quadro 5 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD da CYP11B da adrenal de cães.

Gene	Categoria da isoforma	n° de isoformas/categoria	Codificante/não codificante	NMD (isoformas verdadeira/falsa)
CYP11B	Fusão	5	5 codificantes	1 verdadeira/4 falsas
	NIC	1	1 codificante	1 verdadeira
	NNC	1	1 codificante	1 falsa

Legenda: NIC: *Novel In Catalog*. NNC: *Novel Not in Catalog*. NMD: *nonsense mediated decay*.

## 5.2 VARIANTES DE *SPLICING* EM CARCINOMAS ADRENOCORTICAIS DE CÃES

### 5.2.1 Caracterização dos pacientes com síndrome de Cushing ACTH-independente

O sequenciamento de três carcinomas adrenocorticais de paciente com hipercortisolismo ACTH-independente foram realizados na busca de isoformas de genes frequentemente estudados na tumorigênese adrenal. A paciente 1 era da espécie canina, fêmea, Lhasa Apso, 8 anos de idade, 11kg, não castrada, apresentava como queixas principais poliúria, polidipsia e polifagia com início nos 3 últimos meses. As principais alterações laboratoriais iniciais eram trombocitose, hipercolesterolemia discreta, aumento na atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina. No teste de supressão com baixa dose de dexametasona não houve supressão dos níveis séricos de cortisol após 8 horas, em conjunto com os níveis supressos da concentração plasmática basal do ACTH endógeno e a imagem ultrassonográfica, corroboraram para o diagnóstico de Síndrome de Cushing ACTH-independente (tabela

2 e quadro 6). A paciente foi tratada com trilostano para controle da hipercortisolemia e encaminhada para adrenalectomia direita. A tomografia pré cirúrgica foi apresentada nas figuras 19 e 20. A paciente 2 era da espécie canina, fêmea, Shih Tzu, 8 anos, 7kg, castrada, foi ao atendimento veterinário devido episódios eméticos esporádicos, sem outras alterações relatadas em anamnese. Nos exames complementares identificado aumento bilateral de adrenais em ultrassonografia abdominal (figura 21) e aumento na atividade de enzimas hepáticas fosfatase alcalina e alanina aminotransferase. No teste de supressão com baixa dose de dexametasona não houve supressão dos níveis séricos de cortisol após 8 horas, em conjunto com os níveis supressos da concentração plasmática basal do ACTH endógeno e a imagem ultrassonográfica, corroboraram para que a principal suspeita fosse Síndrome de Cushing (tabela 2 e quadro 6). Inicialmente a classificação etiológica não ficou esclarecida e a indicação cirúrgica não foi realizada, entretanto, ao longo dos anos em tratamento com o trilostano e bom controle hormonal, a evolução das glândulas adrenais no acompanhamento ultrassonográfico sugeriram que a paciente tinha Síndrome de Cushing ACTH-independente devido a neoplasia bilateral. A paciente foi encaminhada para adrenalectomia bilateral em duas etapas, com reposição de hormônios mineralo e glicocorticoides após a segunda adrenalectomia. A paciente 3 era uma da espécie, poodle, 8 anos, 10kg, castrada, com queixa de polifagia, em dados de anamnese tutora relatava poliúria, polidipsia, letargia e ganho de peso progressivo. As principais alterações laboratoriais iniciais eram hipertrigliceridemia, aumento na atividade das enzimas hepáticas alanina aminotransferase e fosfatase alcalina, isostenúria, proteinúria e hipertensão arterial sistêmica. No teste de supressão com baixa dose de dexametasona não houve supressão dos níveis séricos de cortisol após 8 horas, e em conjunto com a imagem ultrassonográfica, corroboraram para o diagnóstico de Síndrome de Cushing ACTH-independente (tabela 2 e quadro 6). Nesta paciente não foi realizada a dosagem do ACTH endógeno. A paciente foi estabilizada com o trilostano e encaminhada para adrenalectomia. Um fragmento de cada adrenal tumoral foi coletado e congelado em nitrogênio líquido para posterior análise molecular. O restante do tecido foi enviado para avaliação histológica e posterior imunohistoquímica.

Tabela 2 - Resultados hormonais de diagnóstico da Síndrome de Cushing ACTH-independente.

	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Cortisol basal (VR: 1,0-4,6 µg/dL)	3,73	4,51	7,65
Cortisol pós 8 horas da dexametasona (VR: <0,9 µg/dL)	3,24	2,34	4,56
ACTH plasmático (VR:10-45 pg/mL)	8	6	-

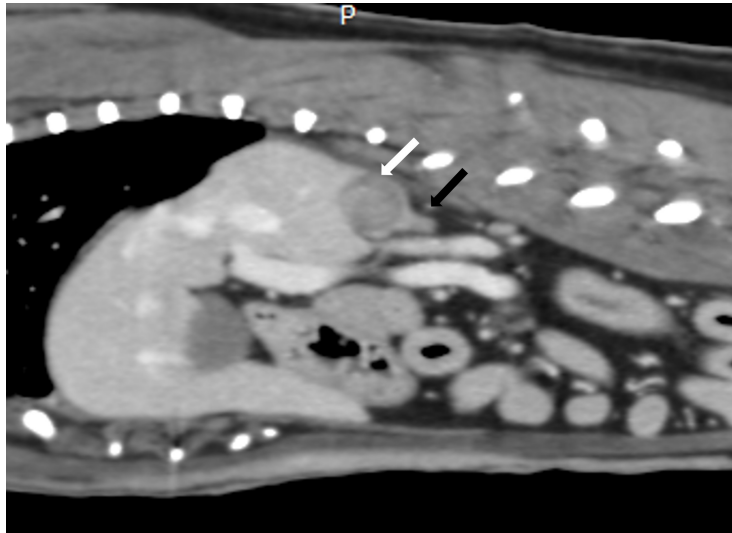
Legenda: VR: valor de referência.

Quadro 6. Descrição ultrassonográfica das alterações em adrenais.

Identificação	Descrição ultrassonográfica
Paciente 1	AD: 2,74cm (cp) x 1,3cm (cr) x 0,4cm (cd). Formação heterogênea em polo cranial medindo 1,58cm x 1,23cm.  AE: 1,78cm (cp) x 0,35cm (cr) x 0,34cm (cd). Polos caudais e craniais com dimensões reduzidas.
Paciente 2	AD: 3,11cm (cp) x 2,01cm (cr) x 0,50cm (cd). Formação heterogênea em polo cranial medindo 2,01cm x 2,76cm.  AE: 3,44cm (cp) x 2,44cm (cr) e 0,72cm (cd). Formação heterogênea em polo cranial medindo 2,44cm x 2,96cm.
Paciente 3	AD: 3,72cm (cp) x 1,8cm (cr) x 0,37cm (cd). Formação heterogênea em polo cranial medindo 1,77cm x 1,2cm.  AE: 1,8cm (cp) x 0,34cm (cr) x 0,30cm (cd). Polos caudais e craniais com dimensões reduzidas.

Legenda: AE: adrenal esquerda. AD: adrenal direita. CP: comprimento. CR: polo cranial. CD: polo caudal.

Figura 19 - Imagem de tomografia computadorizada segmento abdominal da paciente 1 pelo corte sagital evidenciando a formação em polo cranial da adrenal direita (seta branca) e polo caudal sem alterações (seta preta).



Fonte: Hospital Cães e Gatos, 2021.

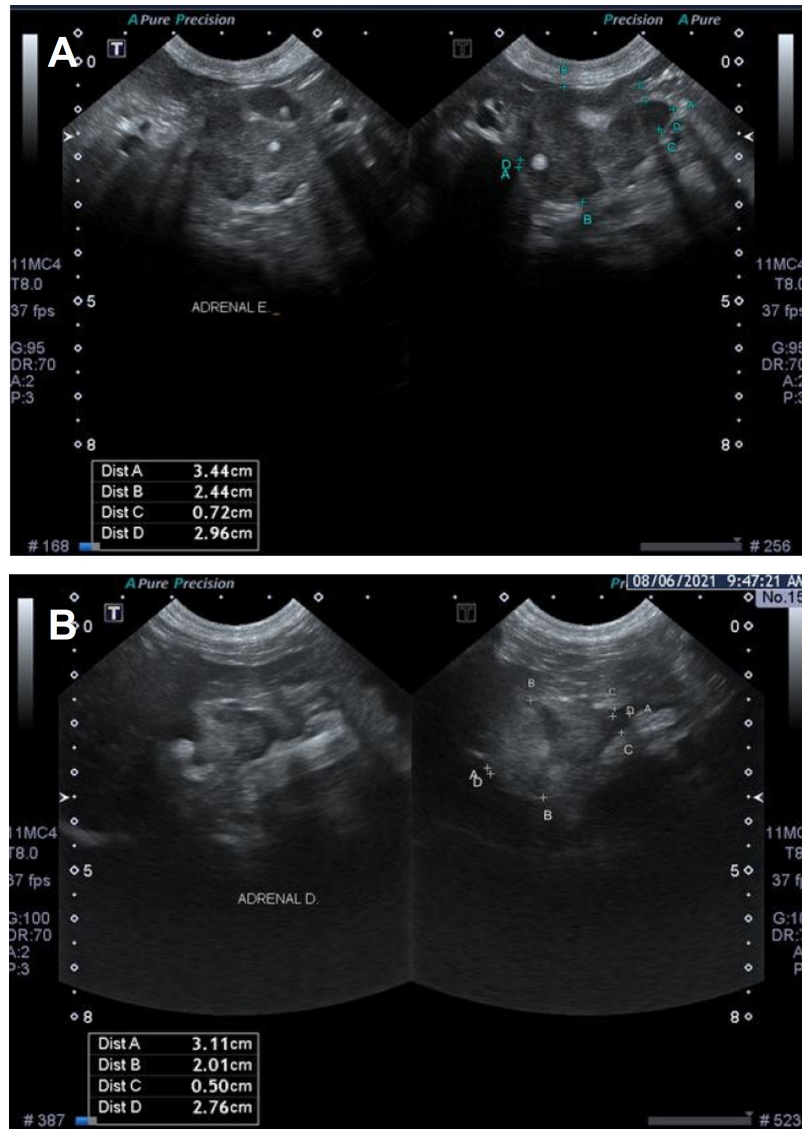
Figura 20 - Imagem de tomografia computadorizada segmento abdominal da paciente 1 pelo corte coronal evidenciando a formação em polo cranial da adrenal direita (seta branca) e polo caudal sem alterações (seta preta).



Fonte: Hospital Cães e Gatos, 2021.



Figura 21 - Imagem ultrassonográfica da adrenal direita (A) e esquerda (B) da paciente 2 portadora de Síndrome de Cushing ACTH-independente devido a neoplasia bilateral.



Fonte: RK diagnóstico, 2021.

As amostras das adrenais das 3 pacientes foram enviadas para avaliação histopatológica no Centro Veterinário de Anatomia Patológica (CVAP), sendo o resultado compatível com carcinoma adrenocortical. Na sequência os blocos foram enviados para imuno-histoquímica para os marcadores inibina, sinaptofisina, cromogranina, GATA-4 e Ki-67 no VetPat. Os resultados confirmaram que as 3 neoplasias são de origem cortical por imunoexpressarem inibina, por não expressarem

cromogranina e sinaptofisina comprova-se que não há envolvimento medular, e todos tiveram resultado de ki-67 acima do valor de corte de 2,5% (quadro 7).

Quadro 7 - Imuno-histoquímica dos carcinomas adrenocorticais de glândula adrenal de cães.

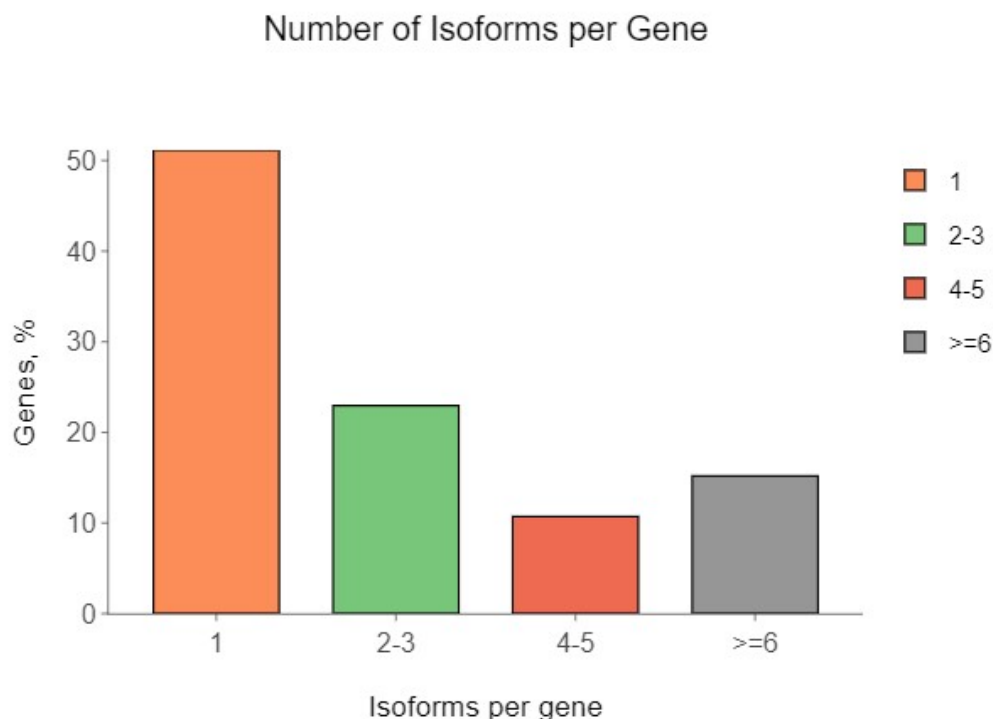
	Paciente 1	Paciente 2	Paciente 3
Inibina	positivo	positivo	positivo
Sinaptofisina	negativo	negativo	negativo
Cromogranina	negativo	negativo	negativo
GATA-4	negativo	negativo	negativo
Ki-67	2,8%	4%	3%

Fonte: Vet Pat, 2021.

### 5.2.2 Dados de Iso-Seq dos carcinomas adrenocorticais de cães

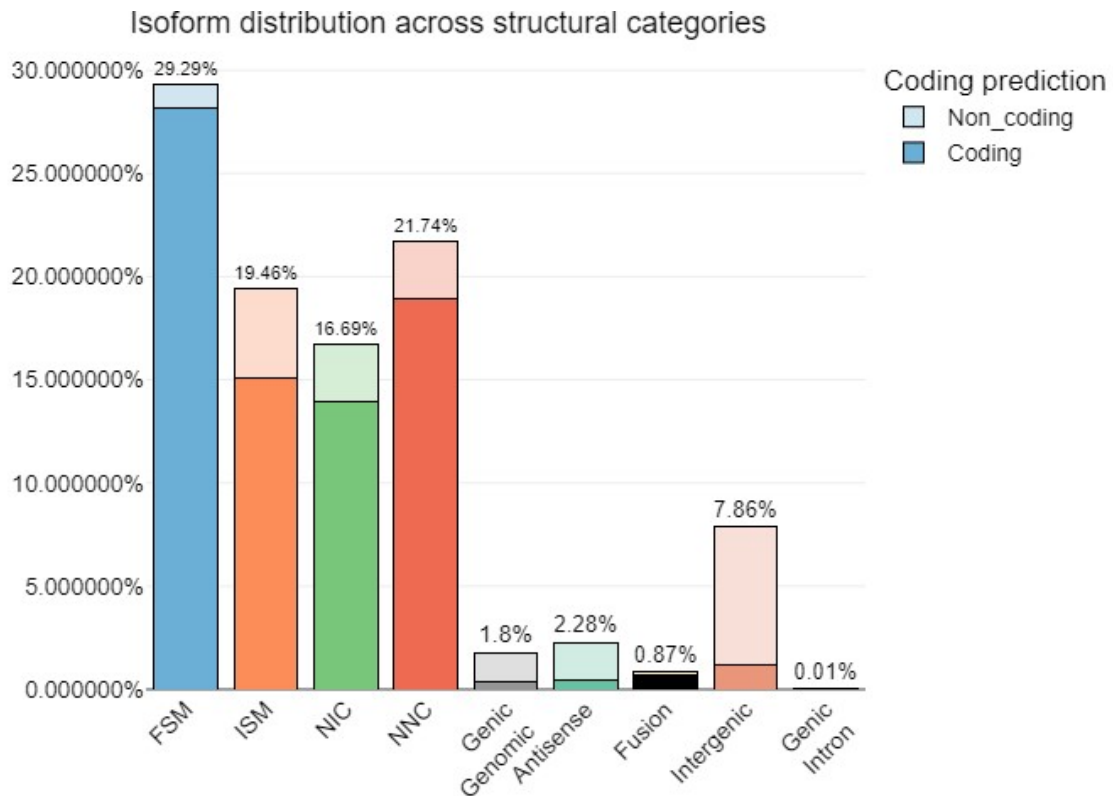
Os transcriptomas das 3 amostras de carcinomas adrenocorticais foram sequenciados e analisados na plataforma Sequel II da PacBio para capturar com precisão as sequências completas e variantes de *splicing*. Com o SMRT obteve-se um total de 70.107 transcritos de alta qualidade. Após análise de bioinformática foram identificados 17.130 genes e 52.977 isoformas nas amostras tumorais. Dentre os 17.130 genes, 12.014 já foram anotados no genoma canino e 5.116 são novos genes. Aproximadamente 51,1% dos genes produzem uma única isoforma, 22,9% 2 a 3 isoformas, 10,7% de 4 a 5 isoformas e 15,2% fazem *splicing* alternativo e produzem 6 ou mais isoformas por gene (gráfico 5). Em comparação com as adrenais normais sem acometimento de endocrinopatia, não foram observadas diferenças relevantes quanto ao número de isoformas obtidas nos carcinomas adrenocorticais.

Gráfico 5 - Número de isoformas por gene oriundas de carcinomas adrenocorticais de cães.



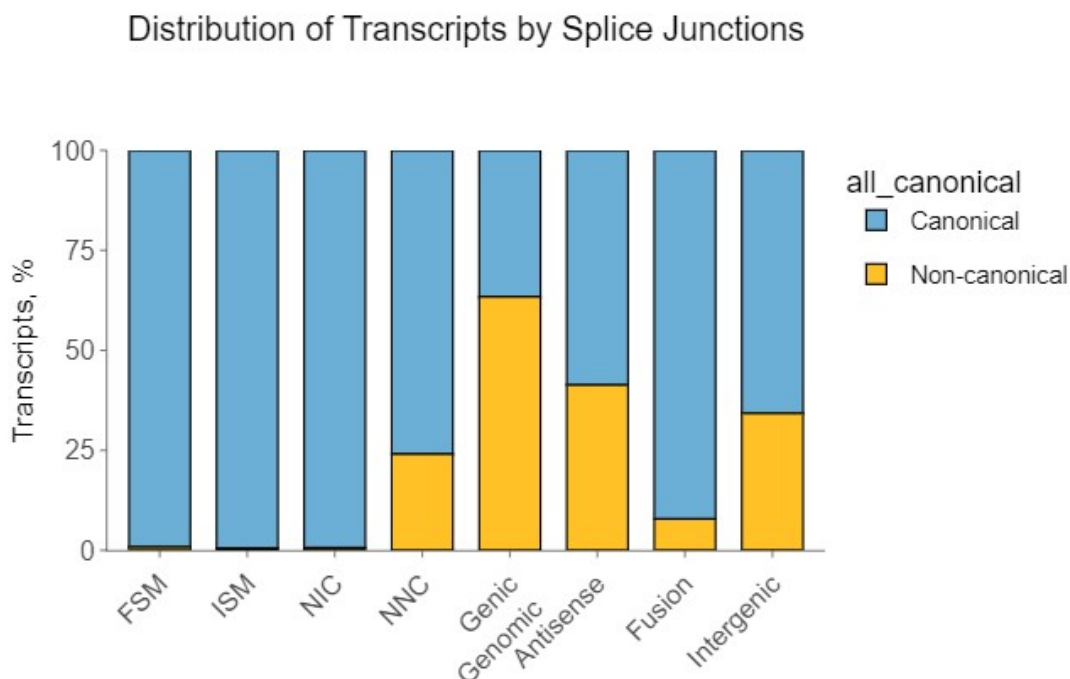
As 52.977 isoformas identificadas nesta segunda etapa do estudo foram mapeadas com genoma canino ROS\_Cfam\_1.0 de 2020. De acordo com as categorias das isoformas tivemos um total de 29,3% de isoformas do tipo *Full Splice Match* (FSM, combina perfeitamente com transcritos conhecidos), 19,5% *Incomplete Splice Match* (ISM, combina parcialmente com transcritos conhecidos, mas falta exon), 16,7% de *Novel In Catalog* (NIC, são novas isoformas com novas combinações de sítios de *splice* conhecidos), 21,7% de *Novel Not in Catalog* (NNC, tem um sítio *splice* não anotado), 1,8 % de *Genic Genomic*, 2,28 % de *Antisense*, 0,87 *Fusion*, 7,86% de *Intergenic* e 0,01% *Genic Intron*. No gráfico 3 a distribuição das isoformas de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante, sendo que as isoformas da categoria FSM, ISM, NIC, NNC e genes de fusão tem alto potencial codificante. Em comparação com as adrenais normais sem acometimento de endocrinopatia, as isoformas obtidas nos carcinomas adrenocorticais tem distribuição semelhante dentro das categorias de variação de *splicing*, sendo a maioria com potencial codificante como descrito nas adrenais normais (gráfico 6).

Gráfico 6 - Distribuição das isoformas de carcinomas adrenocorticais de cães de acordo com as categorias descritas e a predição do potencial codificante (cores claras representam isoformas não codificantes e cores escuras isoformas codificantes).



No gráfico 7 está plotada a distribuição de todas as isoformas obtidas por Iso-Seq de acordo com seus sítios de *splicing* canônicos e não canônicos. Desta forma, temos 0,8%, 0,5%, 0,6%, 24,0% de sítios de *splicing* não canônicos nas categorias, FSM, ISM, NIC e NNC, respectivamente. Nas demais categorias temos 63,4%, 41,3%, 7,8% e 34,2% nas categorias *Genic Genomic*, *Antisense*, *Fusion* e *Intergenic*, respectivamente.

Gráfico 7 - Distribuição das isoformas de carcinomas adrenocorticais de cães pelos sítios de *splicing* canônicos e não canônicos.



Foram selecionados 10 genes frequentemente estudados na tumorigênese adrenal e os resultados de suas isoformas foi apresentado no quadro 8. Com o sequenciamento Iso-Seq foi observado que o *gene steroidogenic fator 1* (SF-1) ou também conhecido como *nuclear receptor subfamily 5 group A member 1* (NR5A1) tem 4 variantes de *splicing*, o *melanocortin 2 receptor* (MC2R) tem 10, o *sterol O-acyltransferase 1* (SOAT1) tem 14, o tem gene que codifica a subunidade a da proteína G estimulatória (Gs), denominado GNAS tem 9, a *protein kinase cAMP-activated catalytic subunit alpha* (PRKACA) tem 4, a *protein kinase cAMP-activated catalytic subunit beta* (PRKACB) tem 7, a *protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha* (PRKAR1A) tem 12, na *protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit beta* (PRKAR1B) não foram identificadas isoformas, o *tumor protein p53* (TP53) tem 1 e a *catenin beta 1* (CTNNB1) tem 6 isoformas (quadro 8).

Quadro 8 - Loci de genes frequentemente envolvidos na tumorigênese adrenal e números de isoformas encontradas pelo sequenciamento Iso-Seq de carcinomas adrenocorticais de cães.

<b>Gene</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Localização</b>	<b>n° de isoformas</b>
SF-1	9	NC_051813.1:59379513-59404555	4
MC2R	1	NC_051805.1:24250353-24289508	10
SOAT1	7	NC_051811.1:20217662-20292968	14
GNAS	24	NC_051828.1:44469667-44524884	9
PRKACA	20	NC_051824.1:48926811-48944065	4
PRKACB	6	NC_051810.1:64155572-64269668	7
PRKAR1A	9	NC_051813.1:16843167-16864963	12
PRKAR1B	6	NC_051810.1:16264735-16377921	0
TP53	5	NC_051809.1:32665395-32678721	1
CTNNB1	23	NC_051827.1:10821172-10860317	6

Baseado no relatório gerado pela análise realizada pelo software SQANTI3 foi possível determinar quais eram as sequências potencialmente codificantes e não codificantes pela análise de suas *Open Reading Frames* (ORFs), ou seja, as sequências compreendidas entre um códon de início da tradução e um códon de terminação. Outra avaliação importante de qualidade é o mecanismo denominado *nonsense mediated decay* (NMD) que rapidamente retira transcritos anômalos que poderiam danificar a célula. Desta forma, filtrando pelo controle de qualidade NMD as isoformas da SF-1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, TP53 e CTNNB1 nos carcinomas adrenocorticais de cães, provavelmente nenhuma codifique uma proteína funcional. Dentre as 10 isoformas encontradas do MC2R e as 14 do gene SOAT1 apenas uma isoforma de cada gene deve codificar uma proteína funcional (quadro 9).

Quadro 9 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas obtidas de carcinoma adrenocorticais de cães.

<b>. Gene</b>	<b>Categoria da isoforma</b>	<b>n° de isoformas/categoria</b>	<b>Codificante/não codificante</b>	<b>NMD (isoformas verdadeira/falsa)</b>
<b>SF-1</b>	FSM	1	1 codificante	1 falsa
	Gênica	1	1 não codificante	1 falsa
	NNC	2	2 codificantes	2 falsas
<b>MC2R</b>	FSM	7	7 codificante	7 falsas
	NNC	3	3 codificantes	1 verdadeira/2 falsas
<b>SOAT1</b>	ISM	10	7 codificantes/3 não codificantes	10 falsas
	NIC	1	1 codificante	1 verdadeira
	NNC	3	2 codificantes/1 não codificante	3 falsas
<b>GNAS</b>	FSM	3	3 codificantes	3 falsas
	ISM	1	1 codificante	1 falsa
	NIC	2	2 não codificantes	2 falsas
	NNC	3	3 codificantes	3 falsas
<b>PRKACA</b>	NNC	4	3 codificantes/1 não codificante	4 falsas
<b>PRKACB</b>	FSM	6	6 codificantes	6 falsas
	NIC	1	1 codificantes	1 falsa

<b>PRKAR1A</b>	FSM	11	11 codificantes	11 falsas
	NIC	1	1 não codificante	1 falsa
<b>TP53</b>	FSM	1	1 codificante	1 falsa
<b>CTNNB1</b>	FSM	2	2 codificantes	2 falsas
	ISM	1	1 codificante	1 falsa
	NNC	3	3 codificante	3 falsas

Legenda: FSM: *Full Splice Match*. ISM: *Incomplete Splice Match*. NIC: *Novel In Catalog*. NNC: *Novel Not in Catalog*. NMD: *nonsense mediated decay*.

De forma comparativa foram incluídos no quadro 10 os dados das isoformas obtidas dos genes frequentemente estudados na tumorigênese adrenal, porém utilizando as quatro amostras de adrenais normais. Das 67 isoformas em carcinomas adrenocorticais encontradas nos 9 genes descritos no quadro 9, tem-se 58 isoformas com potencial codificante, porém pelo controle de qualidade NMD, apenas 2 teriam potencial de serem proteínas funcionais. Enquanto na análise das isoformas obtidas do sequenciamento de adrenais não neoplásicas, foram observadas 81 isoformas nos 9 genes descritos no quadro 10, com 74 com potencial codificante, porém pelo controle de qualidade NMD, apenas 3 teriam potencial de serem proteínas funcionais. Desta forma, em uma análise qualitativa não foi expressiva a diferença no número de isoformas obtidas nestes genes estudados, número de isoformas codificantes e com potencial de gerarem proteínas funcionais, quando comparado o tecido não tumoral com o tumoral.

A análise das 50.066 isoformas obtidas do sequenciamento de adrenais não tumorais obteve-se 3.503 (7%) isoformas classificadas como verdadeiras, ou sejam com potencial de gerarem uma proteína funcional; 9.939 (19,85%) isoformas não foram classificadas, e 36.624 (73,15%) foram classificadas como falsas pelo controle NMD, ou seja, não possuem potencial de gerarem uma proteína funcional. A análise das 52.978 isoformas obtidas do sequenciamento de adrenais tumorais obteve-se 3.624 (6,84%) isoformas classificadas como verdadeiras, 12.864 (24,28%) isoformas não



foram classificadas, e 36.490 (68,88%) foram classificadas como falsas pelo controle NMD. Desta forma, o número de isoformas com potencial codificante de gerar uma proteína verdadeira não diferiu qualitativamente entre o tecido não tumoral e o tumoral.

Quadro 10 - Potencial codificante e controle de qualidade NMD das isoformas obtidas de adrenais não neoplásicas de cães.

<b>. Gene</b>	<b>Categoria da isoforma</b>	<b>nº de isoformas/categoria</b>	<b>Codificante/não codificante</b>	<b>NMD (isoformas verdadeira/falsa)</b>
<b>SF-1</b>	FSM	3	3 codificantes	3 falsas
	ISM	2	2 codificantes	2 falsas
	NNC	6	6 codificantes	1 verdadeira/5 falsas
<b>MC2R</b>	FSM	9	9 codificantes	9 falsas
<b>SOAT1</b>	FSM	2	2 codificantes	2 falsas
	ISM	9	8 codificantes/1 não codificante	9 falsas
	NIC	2	1 codificante	2 falsas
	NNC	4	3 codificantes/1 não codificante	1 verdadeira/3 falsas
<b>GNAS</b>	FSM	3	3 codificantes	3 falsas
	ISM	1	1 codificante	1 falso
	NIC	2	2 não codificantes	2 falsas
	NNC	3	3 codificantes	3 falsas
<b>PRKACA</b>	NNC	2	2 codificantes	2 falsas

<b>PRKACB</b>	FSM	7	7 codificantes	7 falsas
	NIC	1	1 codificantes	1 falsa
	NNC	1	1 não codificante	1 falsa
<b>PRKAR1A</b>	FSM	12	12 codificantes	12 falsas
	NIC	3	1 codificante/ 2 não codificante	3 falsas
<b>TP53</b>	FSM	1	1 codificante	1 falsa
	NNC	2	2 codificantes	1 verdadeira/1 falsa
<b>CTNNB1</b>	FSM	4	4 codificantes	4 falsas
	NNC	2	2 codificante	2 falsas

Legenda: FSM: *Full Splice Match*. ISM: *Incomplete Splice Match*. NIC: *Novel In Catalog*. NNC: *Novel Not in Catalog*. NMD: *nonsense mediated decay*.

### 5.3 HISTOLOGIA DAS GLÂNDULAS ADRENAIS DE CÃES SEM ENDOCRINOPATIA

#### 5.3.1 Análise microscópica das glândulas adrenais

As glândulas adrenais estavam contidas em uma cápsula de tecido conjuntivo. Foi possível evidenciar um estroma de suporte do parênquima, evidenciado por finas fibras colágenas. Duas camadas foram identificadas na glândula adrenal, o córtex mais externo e a medula interna, esta última de coloração amarronzada (figura 22). O córtex possui uma divisão em 4 zonas: a zona produtora de mineralocorticoides mais externa com predominância de seu formato em cordões curvados ou de arcos, poucos formatos de roseta foram encontrados, desta forma, mais bem descrita como zona arcada ou zona arciforme, ao invés de zona glomerulosa (figura 23). As células da zona arciforme têm o citoplasma acidófilo e com poucas inclusões lipídicas. Abaixo da zona arciforme

visualizou-se de forma intermitente, sem continuidade em todo o parênquima, a zona intermediária, com células sem inclusões lipídicas (figura 24). Na sequência, mais internamente e abaixo da zona intermediária, e em alguns trechos abaixo da zona arciforme, tem-se uma extensa zona, denominada de fasciculada, composta por cordões bem-organizados e compostos por células com citoplasma muito vacuolizado, por isso, chamadas de espongiócitos. Entre os cordões da zona fasciculada foi possível ver a riqueza de vênulas, em alguns trechos é possível visualizar as hemácias dentro desses vasos. Abaixo da zona fasciculada encontramos a zona reticular, a quarta zona do córtex e composta por cordões menos organizados e com menos células vacuolizadas, como evidenciado na zona fasciculada. Entretanto, em diversos trechos foi difícil a diferenciação da zona fasciculada da zona reticular (figura 22).

Figura 22 - Fotomicrografia da glândula adrenal do cão identificando a cápsula (CP), a camada cortical com a zona arciforme (ZA), zona fasciculada (ZF), zona reticular (ZR), e a camada medular (M). HE, Aumento 40X. Barras: 500µm.

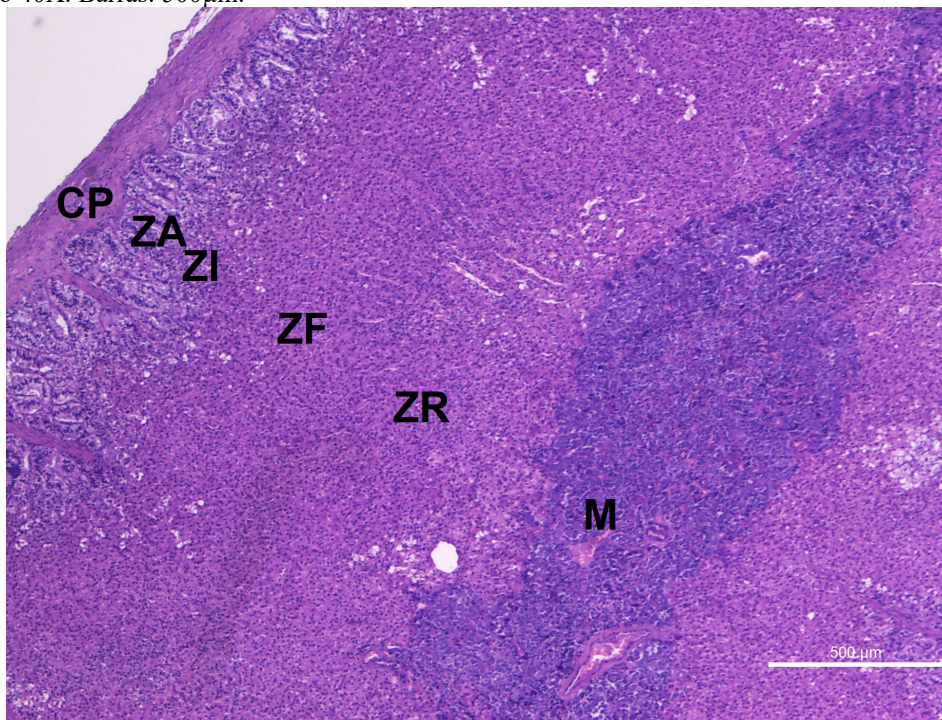




Figura 23 - Fotomicrografia do córtex adrenal do cão evidenciando a cápsula (CP) zona arciforme (ZA) e zona fasciculada (ZF). HE, Aumento 200X. Barra: 100µm.

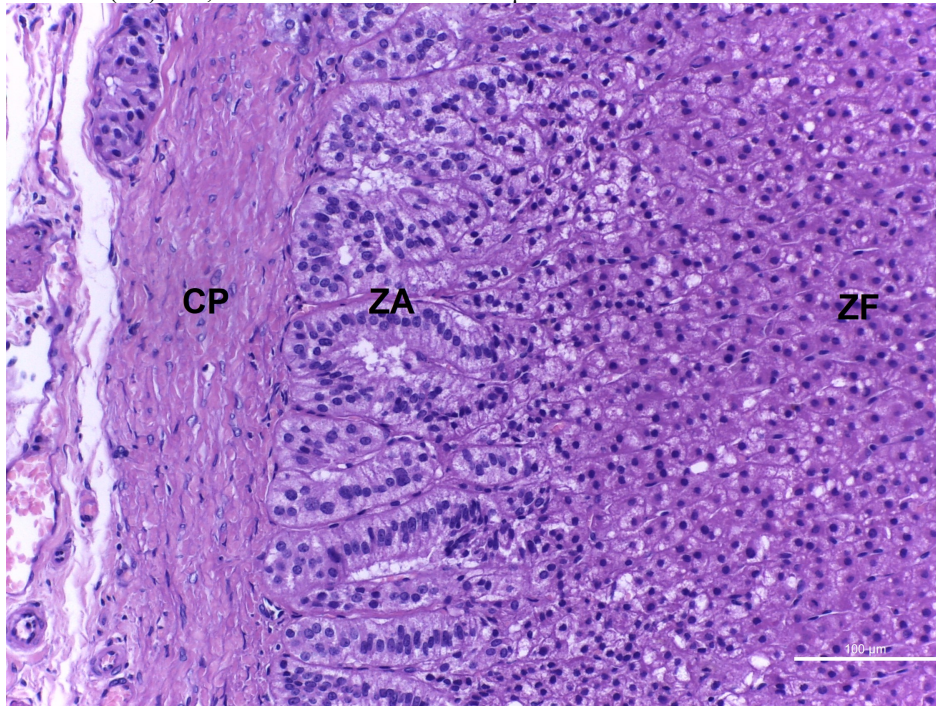
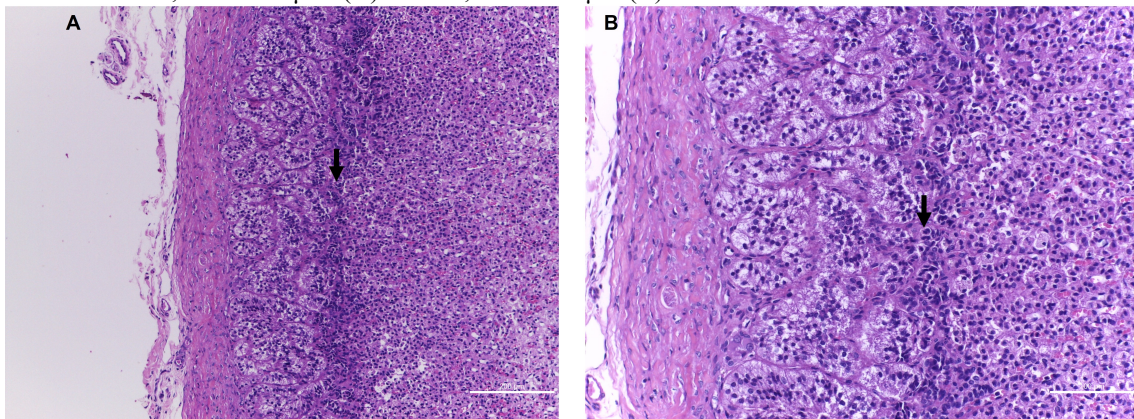


Figura 24 - Fotomicrografia do córtex adrenal do cão evidenciando a zona intermediária (seta). HE, Aumento 100X, barra 200 µm. (A) e 200X, barra 100 µm (B).



## **6** *Discussão*

## 6 DISCUSSÃO

O presente estudo foi o primeiro sequenciamento de larga escala para transcritos completos e determinação de isoformas no córtex adrenal de cães. Após a aplicação de filtros de qualidade no processamento de dados pela bioinformática, para que fosse possível obter apenas transcritos completos de alta qualidade e confiabilidade, foi possível obter grande parte da sequência dos genes caninos: 16.668 genes na primeira parte do sequenciamento com amostras de córtex de adrenais sem endocrinopatias e 17.130 genes no segundo sequenciamento utilizando carcinomas adrenocorticais. O mapeamento e classificação dos genes usando como referência o último sequenciamento do genoma canino de 2020 (ROS\_Cfam\_1.0, [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_014441545.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_014441545.1/)) evidenciou que aproximadamente 5.000 genes não têm ainda suas funções conhecidas, o que reflete o quanto ainda a compreensão da genética tem para avançar.

Na nova era da genética, o mundo das “ômicas” revela novas informações para compreensão desde o código genético até a função de proteínas no organismo. As principais técnicas moleculares são a genômica, transcriptômica, proteômica e metabolômica. A genômica estuda o genoma, o conjunto de todos os genes de um determinado organismo. A complementação da genômica é a transcriptômica que estuda as moléculas de RNA. A proteômica estuda as proteínas e a metabolômica estuda os metabólitos, ou seja, as moléculas produzidas pelo metabolismo celular. O transcriptoma, resultado da transcriptômica, é definido como um conjunto de todas as moléculas de RNA expressas em uma determinada célula ou tecido (BLENCOWE; AHMAD; LEE, 2009). Durante os últimos anos, o sequenciamento de RNA, em particular o sistema Illumina baseado no sequenciamento de *short reads* (RNA-seq), tem surgido como uma ferramenta importante na análise dos transcriptomas para identificar genes que tem diferentes expressões nas mais diferentes condições, fisiológicas ou patológicas. Embora este método tenha sido eficaz na quantificação da expressão de transcritos, os *shorts reads* (geralmente 100 a 250 pares de bases)

raramente abrangem transcritos completos, que muitas vezes podem ser de várias quilobases de comprimento, tornando difícil inferir todas as sequências completas oriundas dos processos de transcrições (ZAHA; PASSAGLIA, 2014; GIRARDI; SUBTIL; RANGEL, 2018). Como algumas informações podem ser perdidas pelo RNA-seq durante a montagem dos transcritos, menos isoformas e sítios de *splice* podem ser obtidas pelas *short reads*. Sendo assim optou-se neste projeto pela técnica de obtenção de transcritos completos (*full-length*), para maximizar a recuperação de isoformas e compreensão da atividade das enzimas da cascata esteroidogênica. O sequenciamento de isoformas (Iso-Seq) baseado na tecnologia de Sequenciamento de Molécula Única em Tempo Real (SMRT) da *Pacific Biosciences* (PacBio) foi a escolha no presente estudo, pois oferece capacidade de sequenciar grandes *amplicons* e transcrições inteiras. O Iso-Seq gera fitas de cDNA de comprimento total da UTR 5' até cauda poli-A 3', e as moléculas que não estejam completas são eliminadas, por isso, para melhor qualidade do sequenciamento o ideal são amostras com RIN > 7. Neste projeto, as 4 amostras de adrenais do grupo controle e os 3 carcinomas adrenocorticais tinham RIN acima de 7, o que pode ser comprovado pela alta qualidade das informações obtidas; porém, a qualidade das amostras obtidas a partir da microdissecção, não atingiram esta qualidade, o que se refletiu nos resultados obtidos das isoformas a partir deste material.

Desde o início dos anos 2000 com os projetos de sequenciamento do genoma humano, foi descoberto que o genoma humano possui 3,2 bilhões de pares de base (Gb), com isso descobriu-se que apenas 3% do genoma corresponde a genes codificadores de proteínas, ou seja, 30 mil genes, estes interrompidos por longas sequências de íntrons, distribuídos em 46 cromossomos (VENTER et al., 2001). O cão foi a quarta espécie a ter seu genoma sequenciado, depois dos humanos, camundongos e ratos. O sequenciamento do genoma canino mostrou maior similaridade com o genoma humano, do que os camundongos tem com humanos, embora seja conhecido que na escala evolutiva os cães divergiram há 95 milhões de anos e os camundongos há cerca de 87 milhões de anos. Estes dados mostraram que os cães e humanos tiveram uma evolução mais lenta e maior conservação genética. O alinhamento dos genomas mostrou quase o dobro de equivalências das sequências codificantes entre cães e humanos quando comparados aos camundongos. Estima-se que o genoma canino tenha 2,4Gb, com aproximadamente 22 mil genes, distribuídos em 78 cromossomos (KIRKNESS et al.,

2003). A similaridade do genoma canino com o genoma humano faz do cão um excelente modelo para estudo das mais diferentes patologias e em especial aquelas que acometem as glândulas adrenais (KIRKNESS et al., 2003; GALAC; WILSON, 2015). No início do sequenciamento das diferentes espécies imaginava-se que o genoma tivesse entre 50 e 100 mil genes, e que grande parte do genoma fosse composto por genes codificantes. A complexidade dos organismos está relacionada com mecanismos que expandem a capacidade codificadora do genoma, neste contexto, o *splicing* alternativo é um dos mecanismos moleculares capazes de aumentar significativamente o repertório proteico de um organismo, e sua descoberta propôs uma mudança do dogma central da biologia molecular, onde cada gene transcrito é capaz de gerar uma proteína após ser traduzido (TAVARES et al., 2015). E esta amplificação da capacidade do genoma do cão pôde ser comprovada neste estudo com a obtenção de 50.065 isoformas no primeiro sequenciamento e 52.977 isoformas no segundo sequenciamento, o que representa uma média de 3 isoformas por gene.

Foi surpreendente o número de isoformas que as enzimas da cascata esteroidogênica da adrenal de cães produzem, sendo observado que a enzima STAR tem 178 variantes de *splicing*, a CYP11A1 tem 33, a HSD3B tem 22, a CYP17A1 tem 74 e a CYP21A2 tem 48. Embora quase todas essas isoformas sejam codificantes, pelo controle de qualidade NMD tem-se uma alta probabilidade que dessas 355 isoformas das enzimas da cascata esteroidogênica, apenas 136 (38%) sejam traduzidas para uma proteína verdadeira. A via *nonsense-mediated decay* (NMD) degrada seletivamente RNAs mensageiros que possuem códons de terminação prematura, mas também regula a abundância de um grande número de RNAs celulares. O mecanismo NMD atua no citoplasma e está intimamente ligado à terminação da tradução (HUG; LONGMAN; CÁCERES, 2016). Inicialmente, o NMD foi descrito como um mecanismo de controle de qualidade pós-transcricional do RNAm responsável pela remoção de RNAm contendo códons de terminação prematura que, se deixados intactos, levariam à produção de proteínas truncadas com efeitos deletérios previstos para o organismo. Do ponto de vista médico, isso sugere que a via NMD tem um papel na modulação do resultado fenotípico de distúrbios genéticos causados pela presença de um códon de terminação prematura (MILLER; PEARCE, 2014). No entanto, tornou-se evidente nos últimos anos que esta via não é exclusivamente dedicada à destruição de transcritos



contendo códon de terminação prematura, mas que também tem um papel importante no controle da expressão de transcritos naturais (MILLER; PEARCE, 2014). Desta forma, é possível que mais destas isoformas encontradas no presente estudo sejam alvo da via NMD, e resulte em menor número de variedade de proteínas oriundas de um mesmo gene.

O trilostano é um esteroide sintético, que quando metabolizado pelo fígado produz o 17-cetotrilostano, principal metabólito do trilostano, amplamente utilizado para tratamento da SC em cães por ser um inibidor competitivo, seletivo e reversível da 3 $\beta$ -HSD. Embora o tratamento com o trilostano na SC cause redução tanto do cortisol quanto da aldosterona, foi relatado uma redução sérica de aldosterona menor quando comparada à proporção de redução do cortisol, mostrando que possivelmente há um bloqueio adicional nas enzimas 11 $\beta$ -hidroxilase e 11 $\beta$ -HSD, e/ou atuação distinta do medicamento entre as zonas do córtex da adrenal (WENGER et al., 2004; SIEBER-RUCKSTUHL et al., 2006; REUSCH, 2010). Embora esperada alta casuística de hipercalemia, foi demonstrado que não há hipercalemia significativa na maioria dos casos tratados, corroborando com o achado que não há significativo bloqueio da aldosterona pelo trilostano na zona arciforme (também chamada de glomerulosa) (WENGER et al., 2004; FONSECA; YAMATO, 2011). Estes achados na prática clínica de redução significativa do cortisol quando comparado com a aldosterona nos cães tratados com o trilostano foi extremamente intrigante, visto que, o trilostano bloqueia a 3 $\beta$ -HSD e esta enzima está presente nas três zonas do córtex adrenal. Neste estudo investigou-se primeiramente se haveria outro locus da HSD3B, no caso de haver apenas um locus, hipotetizou-se que este gerasse pelo menos duas isoformas codificantes, o que justificaria a diferença na atuação do trilostano nas zonas do córtex adrenal de cães. Nosso estudo confirmou que há apenas um locus do gene HSD3B, comumente chamado de HSD3B2 pela similaridade com a o gene humano, entretanto, cabe ressaltar com o presente resultado, que não há a HSD3B1 em cães, por este motivo, nos resultados e discussão nomeamos o gene apenas como HSD3B. Embora tenham sido encontradas 22 isoformas do gene HSD3B canino, sendo todas elas com potencial codificante, pelo controle de qualidade NMD foi demonstrado que provavelmente apenas uma isoforma siga para tradução. Desta forma, espera-se que tenhamos a mesma enzima nas 3 zonas produtoras de hormônios no córtex adrenal de cães. Cabe ressaltar que esta avaliação do

controle NMD é realizada por meio de softwares e necessita de validação em estudos futuros de análise proteica, confirmando desta forma, que há apenas uma proteína funcional. Possivelmente a explicação para a diferença na ação do trilostano quanto à redução hormonal da aldosterona e do cortisol, não esteja em diferentes isoformas e proteínas, podendo ser algo relacionado à distribuição do fármaco nas zonas. Por ser um esteroide sintético, as propriedades farmacológicas do trilostano são garantidas quando a absorção se dá na presença de alimentos e a dissolução do fármaco em meio oleoso (CROSBY; BROWN, 2017; LEMETAYER; BLOIS, 2018). Foi observado em estudos anteriores e neste estudo que as células da zona arciforme em cães têm poucas inclusões lipídicas, enquanto a zona fasciculada é composta por cordões bem-organizados e com células com citoplasma muito vacuolizado, repleto de inclusões lipídicas. Desta forma, sugerimos que a diferente ação do trilostano nas zonas do córtex adrenal, deva-se pela diferença na distribuição deste fármaco, tendo uma maior distribuição e ação na zona fasciculada, com consequente maior concentração, melhor atividade e bloqueio da síntese do cortisol.

É amplamente divulgado na medicina veterinária que assim como em humanos a diferença na produção de hormônios entre as zonas esteja relacionada à diferença em duas enzimas da família citocromo P450. A enzima mitocondrial citocromo P450 aldosterona sintase (P450aldo, produto do gene CYP11B2), que converte desoxicorticosterona (DOC) via corticosterona a aldosterona, só é encontrada na zona glomerulosa. E a enzima característica nas zonas fasciculada e reticular 17 $\alpha$ -hidroxilase (P450<sub>17 $\alpha$</sub> , produto do gene CYP17A1) que catalisa a 17  $\alpha$ -hidroxilação da pregnenolona e progesterona, bem como a clivagem da cadeia lateral em C17 de 17-  $\alpha$ -hidroxi C21 esteroides (ELIAS et al., 2008; BEHREND, 2015). Em humanos, a última etapa na produção da aldosterona e cortisol são catalisados respectivamente, por duas diferentes enzimas, aldosterona sintase específica da zona glomerulosa e a 11 $\beta$ -hidroxilase (produto do gene CYP11B1) na zona fasciculada (LISUREK; BERNHARDT, 2004; PAYNE; HALES, 2004; MILLER; AUCHUS, 2011; STEWART; KRONE, 2011). Em contraste, bovinos, suínos e ovelhas tem apenas uma CYP11B para síntese de cortisol e aldosterona (OGISHIMA; MITANI; ISHIMURA, 1989; BOON; COGHLAN; MCDOUGALL, 1998; ROBIC; FARAUT; PRUNIER, 2014). Um estudo recente utilizou a técnica de *Southern blot* e sugeriu que cães também tem apenas uma CYP11B

para as etapas finais de produção de mineralo- e glicocorticoides (SANDERS et al., 2016), como ilustrado na figura 3 nesta tese. Entretanto, o que intrigou nosso grupo de estudo e motivou a atual pesquisa, foi que se fosse o mesmo gene nas 3 zonas do córtex adrenal, não faria sentido que houvesse apenas 1 enzima, visto que é comprovado que o cão é capaz de produzir a aldosterona e cortisol de forma zona-específica. Como a técnica de *Southern blotting* pode falhar em identificar um novo gene, visto que a sonda construída deve ser específica para hibridizar com a região desconhecida a ser buscada no genoma, procuramos uma técnica mais moderna que pudesse complementar este achado. A expectativa do sequenciamento Iso-Seq neste projeto era obter todas as isoformas da CYP11B, confirmando os diferentes produtos deste gene por meio de *splicing* alternativo, e na sequência utilizar a técnica de microdissecção para extração específica de RNA da ZG e ZF/ZR e comprovar quais isoformas pertenceriam a cada zona. Entretanto, não foi possível identificar as isoformas da CYP11B nem no primeiro e nem no segundo sequenciamento Iso-Seq, possivelmente por não termos conseguido a cobertura de todos os genes. Por isso, com o intuito de ainda utilizar as técnicas de bioinformática mais modernas disponíveis nesta busca, e persistir no conhecimento sobre o gene CYP11B, utilizamos as bibliotecas de RNA-seq disponíveis em repositório público (SRA) a fim de comprovar a existência de apenas um locus do gene CYP11B e identificar novos transcritos deste gene. Este trabalho foi o primeiro a mostrar os diferentes transcritos da CYP11B na glândula adrenal de cães. Foi confirmado que há apenas um locus deste gene em cães, a reconstrução realizada por nós identificou 14 diferentes isoformas da CYP11B. Entretanto, apenas 7 isoformas com potencial codificante, sendo 2 potencialmente verdadeiras pela avaliação de qualidade NMD. Possivelmente, uma das isoformas seja expressa na zona glomerulosa e a outra na zona fasciculada e reticular, conferindo a produção hormonal específica de cada zona. No entanto, novos experimentos devem ser conduzidos para comprovar esta hipótese.

Na década de 90, com a descoberta de apenas uma CYP11B na adrenal de bovinos, uma série de experimentos foram realizados para melhor elucidar se havia um complexo enzimático responsável pela conversão de colesterol a aldosterona e de colesterol a cortisol. Neste contexto as enzimas esteroidogênicas foram purificadas e isoladas para que fossem reconstituídas em membranas e melhor compreendida a interação enzimática (TAKEMORI et al., 1995). O P450<sub>11b</sub> purificado de mitocôndrias

retiradas da ZF/R da adrenal de bovinos catalisou a conversão de desoxicorticosterona a aldosterona em um sistema de membrana reconstituído em conjunto com um sistema de transferência de elétrons. Este dado foi considerado inesperado, visto que originalmente a mitocôndria oriunda destas zonas não são capazes de produzir aldosterona. Este dado instigou ainda mais os estudos relacionados com os complexos enzimáticos que se formam dentro da mitocôndria (HALL; YANAGIBASHI; KOBAYASHI, 1991). Quando aumentada a concentração de P450<sub>scc</sub> purificada em quatro vezes, houve maior produção de pregnenolona, progesterona, desoxicorticosterona e corticosterona em 2 a 4 vezes, porém houve redução da síntese de aldosterona (KOMINAMI; HARADA; TAKEMORI, 1994; KOMINAMI; NISHIDA; TAKEMORI, 1996). Estes achados sugeriram que existisse interação dos complexos enzimáticos P450<sub>scc</sub> e P450<sub>11b</sub>, com consequente redução da conversão para a aldosterona, o que potencialmente poderia explicar a diferença da atividade da P450<sub>11b</sub> entre as zonas glomerulosa e fasciculada (KOMINAMI; NISHIDA; TAKEMORI, 1996). A transfecção com plasmídeo contendo um determinado transcrito prevalente da CYP11B em ovinos mostrou que há uma predileção da conversão de DOC para aldosterona (BOON et al., 1997). Como na época não era conhecida a possibilidade de *splicing* alternativo desse gene, após a análise dos resultados, os diferentes produtos eram sugeridos como potenciais transcritos de um CYP11B não descrito, pois acreditava-se ainda que existisse outro CYP11B, assim como em humanos. Com o presente estudo, acreditamos que assim como visto em cães, os bovinos, suínos, ovelhas e gatos, tenham apenas um gene, que ocorra *splicing* alternativo, resultando em 2 isoformas que sejam diferentemente expressas na zona glomerulosa e fasciculada.

Dentre as três pacientes deste estudo com carcinoma adrenocortical, apenas a paciente 2 não tinha manifestações clínicas clássicas resultantes do hipercortisolismo, entretanto, foi testada principalmente devido às dimensões e características de suas glândulas adrenais. Nas neoplasias adrenais secretoras de cortisol, a liberação hormonal independe do ACTH. Desta forma, a hipercortisolemia suprime a secreção do ACTH, e ao longo do tempo espera-se atrofia das células não neoplásicas do córtex adrenal. Por isso, no momento do diagnóstico é frequente algum grau de atrofia da glândula contralateral nos casos de neoplasia unilateral (BENCHEKROUN et al., 2010; BEHREND, 2015). Nos casos de assimetria adrenal equívoca, um valor de corte de  $\leq$

0,5 cm para a espessura da glândula contralateral é apropriado para o diagnóstico ultrassonográfico de neoplasia adrenal unilateral (BENCHEKROUN et al., 2010). A paciente 1 e 3 tinham aumento das adrenais direitas com atrofia contralateral da esquerda, sendo ambas as adrenais esquerdas abaixo de 0,5 cm, não restando dúvida no momento do diagnóstico de que eram SC ACTH-independente. Embora a paciente 2 tivesse ACTH suprimido, o aumento bilateral das adrenais gerou dúvida se de fato era uma SC ACTH-independente. Entretanto, a evolução das glândulas pelo acompanhamento ultrassonográfico não gerou dúvidas, tendo a indicação cirúrgica posteriormente.

Um estudo amplo envolvendo 119 cães com lesões em adrenal foi conduzido pareando as informações ultrassonográficas com resultados histológicos. Foi demonstrado que a análise ultrassonográfica tem 100% de especificidade e 63,7% de sensibilidade para identificar lesões adrenais. Os carcinomas de córtex adrenal em geral têm ecotextura heterogênea, com diversas áreas de calcificação, com áreas de hipo e hiperecogenicidade quando comparado com o córtex renal, podem fazer invasão vascular, embora estas características não sejam patognomônicas, são frequentes achados de malignidade. A dimensão maior que 2 cm e identificações de massas irregulares obtiveram alto valor preditivo para carcinoma adrenal. Já os adenomas de córtex adrenal em geral apresentam-se como nódulos e dimensões menores que 2 cm (PAGANI et al., 2016). Nas ultrassonografias da paciente 1 e 3 as maiores dimensões da neoplasia eram respectivamente, 1,58 e 1,77 cm. Nestes casos, foram classificadas como carcinomas adrenais pelo estudo histopatológico, mas não seguiam o exposto na literatura quanto às dimensões e características de carcinomas no estudo ultrassonográfico, evidenciando o cuidado que devemos ter nas conversas com tutores quanto ao prognóstico dado a partir destes dados, podendo subestimar a o potencial de malignidade do tumor.

É possível que a paciente 2 fosse uma hiperplasia macronodular primária, pois como já bem descrito em humanos, estes pacientes têm macronódulos bilaterais e ACTH circulante suprimido (CHARCHAR; FRAGOSO, 2022). Entretanto, não foi possível realizar uma imuno-histoquímica anti-ACTH, como relatado recentemente (SOLER ARIAS et al., 2022). Em humanos foram descritos benefícios da adrenalectomia unilateral para estes casos de neoplasia bilateral. É recomendada a

remoção da maior lesão, e dependendo das dimensões a adrenalectomia bilateral pode ser indicada (DEBILLON et al., 2015). Na medicina veterinária tem-se como diretriz que a adrenalectomia é o tratamento de escolha para os tumores secretores de cortisol (BEHREND, 2015). A adrenalectomia é um procedimento delicado, que exige cirurgiões experientes, ainda assim, tumores de grande dimensões (> 5 cm), extensa invasão da veia cava caudal (especialmente trombos que se estendem além do hilo hepático), invasão renal, metástases, baixa antitrombina III e/ou paciente debilitado pela exposição crônica ao cortisol, tem maior chance de complicações cirúrgicas e menor tempo de sobrevivência (SCHWARTZ et al., 2008; LANG et al., 2011; BARRERA et al., 2013; BEHREND, 2015). Pela ultrassonografia e tomografia computadorizada do segmento abdominal, nenhuma das três pacientes com carcinoma adrenocortical tinham as condições de maior risco cirúrgico, anestésico e menor sobrevivência. A paciente 2 foi submetida à adrenalectomia unilateral, e diante do primeiro resultado evidenciando carcinoma adrenocortical, foi submetida à remoção da segunda glândula, com mesmo resultado histopatológico de malignidade.

Vários critérios histológicos têm sido usados para diagnosticar malignidade em tumores adrenocorticais, incluindo invasão vascular e capsular, índice mitótico, figuras mitóticas atípicas, padrão de crescimento, necrose, fibrose intratumoral, pleomorfismo, hemorragia, calcificação, núcleos anormais, entre outros (SANDERS et al., 2019a). Ki-67 é uma proteína nuclear expressa em células que estão nas fases de proliferação do ciclo celular. Dentre pacientes humanos com carcinoma adrenocortical, o índice de proliferação Ki-67 mais alto foi associado a uma menor expectativa de vida (BABÍŇSKA et al., 2017). O índice de proliferação Ki-67 foi significativamente maior em carcinomas em comparação com adenomas e glândulas adrenais normais de cães. Valores acima de 2,5% sugerem malignidade (LABELLE et al., 2004). Os três casos incluídos na segunda parte deste estudo tinham índice de Ki-67 > 2,5%, compatível com o resultado anátomo-patológico, e indicativo de seguimento oncológico para monitoramento.

Foram selecionados 10 genes frequentemente estudados na tumorigênese adrenal de cães e humanos, o SF-1, MC2R, SOAT1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53 e CTNNB1. A busca por variantes de *splicing* poderia indicar mecanismos complementares de funcionamento do tumor, além das mutações somáticas

e germinativas frequentemente estudadas. Embora o *splicing* alternativo forneça às células um meio para diversificar o proteoma, estudos recentes revelaram várias maneiras pelas quais o *splicing* é patologicamente alterado para promover o início e/ou manutenção do câncer (KARNI et al., 2007; LIU; CHENG, 2013; JUNG et al., 2015). Consistente com isso, as análises transcriptômicas em diversos tipos de câncer revelaram diversas alterações no *splicing* alternativo, o que vem promovendo estudos com foco na manipulação do *splicing* para benefícios terapêuticos na oncologia (MURPHY et al., 2022). No presente estudo os genes SF-1, MC2R, SOAT1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53 e CTNNB1 apresentaram um baixo número de isoformas tanto em tecidos tumorais quanto tecidos normais, sendo a maioria delas não codificantes e com baixo potencial de serem traduzidas para uma proteína funcional. Desta forma, não foram observadas isoformas para estes 10 genes no tecido tumoral que tenham diferenças significativas com o tecido normal, portanto, o *splicing* alternativo nestes genes não parece ser um mecanismo relacionado com o surgimento de proteínas aberrantes e funcionamento anormal desses tumores.

Outro dado importante deste estudo foi que a análise das 50.066 isoformas obtidas do sequenciamento de adrenais não tumorais. Dentre as 50.066 isoformas obtidas 3.503 (7%) foram classificadas como verdadeiras, ou seja, com potencial de gerarem uma proteína funcional; 9.939 (19,85%) isoformas não foram classificadas, e 36.624 (73,15%) foram classificadas como falsas pelo controle NMD, ou seja, não possuem potencial de gerarem uma proteína funcional. Enquanto, a análise das 52.978 isoformas obtidas do sequenciamento de adrenais tumorais obteve-se 3.624 (6,84%) isoformas classificadas como verdadeiras, 12.864 (24,28%) isoformas não foram classificadas, e 36.490 (68,88%) foram classificadas como falsas pelo controle NMD. Embora, o número de isoformas com potencial codificante de gerar uma proteína verdadeira não diferiu entre o tecido não tumoral e o tumoral, há uma porcentagem elevada de isoformas não classificadas ainda, o que pode diferir entre os tecidos estudados e mudar o resultado. O número de eventos de *splicing* alternativo em carcinomas adrenais e outros tumores em humanos vindo sendo descrito como superior aos que ocorrem em tecidos normais, e estes tipos de estudos vem surgindo também como ferramenta de prognóstico (XU et al., 2020; LIANG; SUN, 2021). Um fator limitante do nosso estudo foi o reduzido número de neoplasias incluídas nas análises

devido ao elevado custo do sequenciamento. Considerando a heterogeneidade dos tumores, sugere-se em estudos futuros a inclusão de uma amostra maior, composto não somente por carcinomas como também por adenomas adrenocorticais.

Na avaliação histológica das amostras de adrenais não tumorais, que compuseram a primeira parte do estudo, foi possível observar que a zona produtora de mineralocorticoides mais externa tem predominância de seu formato em cordões curvados ou arcos, e poucos formatos de roseta foram encontrados como descritos em humanos. Desta forma, ao invés de zona glomerulosa, tão difundida no meio da endocrinologia veterinária, sugerimos uma descrição mais acurada em cães como zona arcada ou zona arciforme. A zona glomerulosa ganha este nome por estar arranjada em tufos ou rosetas de células epiteliais, as células têm esta disposição em humanos e ruminantes. Já nos equinos, suínos e carnívoros, foi descrita como zona arciforme por apresentar as células colunares em forma de arcos (HULLINGER; ANDRISANI, 2012). Logo abaixo da zona arciforme, visualizou-se neste trabalho a zona intermediária de forma intermitente, sem continuidade em todo o parênquima, contendo células pequenas, com pouco citoplasma e sem inclusões lipídicas. Logo, nos cães pode-se falar que o córtex é composto por 4 zonas. Esta estreita faixa, a zona intermediária, foi estudada em cães apenas em 1978 por um extenso trabalho que identificou esta zona constituída por pequenas células indiferenciadas que correspondem às células-tronco, as quais geram parênquima de reposição para as demais zonas (HULLINGER, 1978). Classicamente, os tecidos altamente regenerativos mantêm a homeostase celular utilizando um compartimento ativo de células-tronco/progenitoras ou pela replicação de células diferenciadas pré-existentes. Embora a extensão total do potencial proliferativo de células da ZG e ZF diferenciadas não tenha sido completamente investigada em humanos, foi proposto que a adrenal adulta contém células-tronco residentes em tecido no córtex periférico capazes de auto renovação. Neste contexto, foi demonstrado que há células-tronco/progenitoras na cápsula adrenal e região subcapsular que podem se diferenciar para repovoar ou expandir zonas de acordo com a demanda fisiológica ou patológica. As células senescentes também podem ser reabastecidas por meio de conversão de linhagem; por exemplo, as células da ZG podem se transformar em células da ZF (PIHLAJOKI et al., 2015). O turnover adrenocortical é acompanhado pela migração centrípeta de células do córtex externo para o interno. Esse remodelamento foi



avaliado em ratos, e foi descoberto que o tempo para uma célula atravessar todo o córtex é de cerca de 104 dias (ZAJICEK; ARIEL; ARBER, 1986). O córtex adrenal de rato contém uma camada de células menos proeminente, a zona indiferenciada (zU), localizada entre o ZG e a ZF. É conhecido que a zU tem células tronco que atuam no remodelamento adrenocortical por reposição celular centrípeta e centrífuga (MITANI, 2014). De maneira análoga, em ferrets também foi descrita uma zona intermediária, cuja sugestão é ser composta de células tronco (BIELINSKA et al., 2006). Em cães, a caracterização dessas populações de células tronco ainda não foi descrita, nem como variam com a idade dos animais, nem o comportamento de diferenciação diante de situações fisiológicas e patológicas.

Como exposto, o core desta tese foi identificar variantes de *splicing*, pois acreditamos que este seja um mecanismo importante de ampliação da função dos genes envolvidos na cascata esteroidogênica, e a chave do entendimento de lacunas no conhecimento da fisiologia adrenal. Para o futuro deste estudo acreditamos que a integração da proteômica e da transcriptômica seja mais um ganho neste conhecimento, pois esta nova área atualmente denominada de proteogenômica, integra os dados obtidos do sequenciamento de isoformas com a obtenção de proteínas pela espectrometria de massas, confirmando o que é produzido e desempenha funções no tecido em estudo.

## ***7 Conclusões***

## 7 CONCLUSÕES

Com os resultados obtidos nesta tese foi possível concluir que:

- O transcriptoma completo pela técnica Iso-Seq pelo sistema PacBio forneceram informações novas para melhorar a anotação do genoma do cão,
- Pelo sequenciamento Iso-Seq foi possível identificar as isoformas das principais enzimas envolvidas com a esteroidogênese adrenal, mas não do gene CYP11B,
- Pelo RNA-seq foi possível comprovar a existência de isoformas da CYP11B no córtex adrenal do cão,
- Há apenas um locus do gene HSD3B e um do gene CYP11B no genoma canino,
- Não foi possível obter um material de microdissecção de qualidade da zona arciforme e zona fasciculada para identificar as isoformas dos genes HSD3B e CYP11B separadamente,
- Não há diferença significativa quanto a produção de isoformas dos genes SF-1, MC2R, SOAT1, GNAS, PRKACA, PRKACB, PRKAR1A, PRKAR1B, TP53 e CTNNB1 no tecido tumoral e não tumoral em cães.

# *Referências*

## REFERÊNCIAS

- ANDRIESSEN, A. et al. CDC6: A Novel Canine Tumour Biomarker Detected in Circulating Extracellular Vesicles. **Veterinary and comparative oncology**, nov. 2021.
- ARENAS, C.; PÉREZ-ALENZA, D.; MELIÁN, C. Clinical Features, Outcome and Prognostic Factors in Dogs Diagnosed with Non-Cortisol-Secreting Adrenal Tumours without Adrenalectomy: 20 Cases (1994-2009). **The Veterinary record**, v. 173, n. 20, p. 501, nov. 2013.
- AUCHUS, R. J. Overview of dehydroepiandrosterone biosynthesis. **Seminars in Reproductive Medicine**, v. 22, n. 4, p. 281–288, 2004.
- BABA, A. I.; CĂTOI, C. Endocrine tumors. In: BABA, A. I.; CĂTOI, C. (Ed.). **Comparative Oncology. Bucharest (RO): The Publishing House of the Romanian Academy**. 5. ed. Bucharest: The Romanian Journal of Technical Sciences, 2007. p. 100–105.
- BABIŃSKA, A. et al. Diagnostic and Prognostic Role of SF1, IGF2, Ki67, P53, Adiponectin, and Leptin Receptors in Human Adrenal Cortical Tumors. **Journal of surgical oncology**, v. 116, n. 3, p. 427–433, set. 2017.
- BANDIERA, R. et al. WT1 Maintains Adrenal-Gonadal Primordium Identity and Marks a Population of AGP-like Progenitors within the Adrenal Gland. **Developmental Cell**, v. 27, n. 1, p. 5–18, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2013.09.003>>.
- BARALLE, F. E.; GIUDICE, J. Alternative Splicing as a Regulator of Development and Tissue Identity. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 18, n. 7, p. 437–451, jul. 2017.
- BARGELLINI, P. et al. Use of Contrast-Enhanced Ultrasound in the Differential Diagnosis of Adrenal Tumors in Dogs. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 52, n. 3, p. 132–143, 2016.
- BARRERA, J. S. et al. Evaluation of Risk Factors for Outcome Associated with Adrenal Gland Tumors with or without Invasion of the Caudal Vena Cava and Treated via Adrenalectomy in Dogs: 86 Cases (1993-2009). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 242, n. 12, p. 1715–1721, jun. 2013.
- BASSETT, M. H.; WHITE, P. C.; RAINEY, W. E. The Regulation of Aldosterone Synthase Expression. **Molecular and cellular endocrinology**, v. 217, n. 1–2, p. 67–74, mar. 2004.
- BAUM, J. I.; BOSTON, S. E.; CASE, J. B. Prevalence of Adrenal Gland Masses as

Incidental Findings during Abdominal Computed Tomography in Dogs: 270 Cases (2013-2014). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 249, n. 10, p. 1165–1169, nov. 2016.

BEATRICE, L. et al. Concurrent Endocrine Neoplasias in Dogs and Cats: A Retrospective Study (2004-2014). **The Veterinary record**, v. 182, n. 11, p. 323, mar. 2018.

BÉGUEC, C. Le et al. Characterisation and functional predictions of canine long non-coding RNAs. **Nature Scientific Reports**, n. August, p. 1–12, 2018.

BEHREND, E. N. et al. Diagnosis of Spontaneous Canine Hyperadrenocorticism: 2012 ACVIM Consensus Statement (Small Animal). **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 6, p. 1292–1304, 2013.

BEHREND, E. N. Canine hyperadrenocorticism. In: FELDMAN, E.C., NELSON, R.W., REUSCH, C.E., SCOTT-MONCRIEFF, C.R., BEHREND, E. (Ed.). **Canine and Feline Endocrinology**. 4. ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. p. 377–451.

BELLUMORI, T. P. et al. Prevalence of inherited disorders among mixed-breed and purebred dogs : 27.254 cases (1995-2010). **Journal of American Veterinary Medical Association**, v. 242, p. 1549–1555, 2013.

BENCHEKROUN, G. et al. Ultrasonography Criteria for Differentiating ACTH Dependency from ACTH Independence in 47 Dogs with Hyperadrenocorticism and Equivocal Adrenal Asymmetry. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 24, n. 5, p. 1077–1085, 2010.

BENTO, P. L. et al. Associations between Sex, Body Weight, Age, and Ultrasonographically Determined Adrenal Gland Thickness in Dogs with Non-Adrenal Gland Illness. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 248, n. 6, p. 652–660, mar. 2016.

BEUSCHLEIN, F.; GALAC, S.; WILSON, D. B. Molecular and Cellular Endocrinology Animal models of adrenocortical tumorigenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 1, p. 78–86, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.09.045>>.

BIELINSKA, M. et al. Gonadectomy-induced Adrenocortical Neoplasia in the Domestic Ferret. v. 117, p. 97–117, 2006.

BLENCOWE, B. J.; AHMAD, S.; LEE, L. J. Current-Generation High-Throughput Sequencing: Deepening Insights into Mammalian Transcriptomes. **Genes & development**, v. 23, n. 12, p. 1379–1386, jun. 2009.

BOON, W. C. et al. Functional and Expression Analysis of Ovine Steroid 11 $\beta$  Hydroxylase (Cytochrome P45011 $\beta$ ). **Endocrine Research**, v. 23, n. 4, p. 325–347,

1997.

BOON, W. C.; COGHLAN, J. P.; MCDOUGALL, J. G. Late Steps of Aldosterone Biosynthesis: Sheep Are Not Rats. **Clinical and experimental pharmacology & physiology. Supplement**, v. 25, p. S21-7, nov. 1998.

BURGENER, I. A. et al. Empty Sella Syndrome, Hyperadrenocorticism and Megaesophagus in a Dachshund. **The Journal of small animal practice**, v. 48, n. 10, p. 584–587, out. 2007.

CAROTENUTO, G. et al. Cushing's Syndrome-an Epidemiological Study Based on a Canine Population of 21,281 Dogs. **Open veterinary journal**, v. 9, n. 1, p. 27–32, abr. 2019.

CASTILLO, V. et al. Retinoic Acid as a Novel Medical Therapy for Cushing's Disease in Dogs. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4438–4444, set. 2006.

CASTILLO, V. A. et al. Ectopic ACTH syndrome in a dog with a mesenteric neuroendocrine tumour: A case report. **Veterinarni Medicina**, v. 59, n. 7, p. 352–358, 2014.

CAVALCANTE, I. P. et al. The Role of ARMC5 in Human Cell Cultures from Nodules of Primary Macronodular Adrenocortical Hyperplasia (PMAH). **Molecular and cellular endocrinology**, v. 460, p. 36–46, jan. 2018.

CHARCHAR, H. L. S.; FRAGOSO, M. C. B. V. An Overview of the Heterogeneous Causes of Cushing Syndrome Resulting From Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia (PMAH). **Journal of the Endocrine Society**, v. 6, n. 5, p. bvac041, maio 2022.

CHURCHER, R. K. Hepatic Carcinoid, Hypercortisolism and Hypokalaemia in a Dog. **Australian veterinary journal**, v. 77, n. 10, p. 641–645, out. 1999.

CLAPS, G. et al. A Transcriptionally Inactive ATF2 Variant Drives Melanomagenesis. **Cell reports**, v. 15, n. 9, p. 1884–1892, maio 2016.

CLIMENTE-GONZÁLEZ, H. et al. The Functional Impact of Alternative Splicing in Cancer. **Cell reports**, v. 20, n. 9, p. 2215–2226, ago. 2017.

CONLEY, A. et al. High-Throughput Sequencing of Two Populations of Extracellular Vesicles Provides an mRNA Signature That Can Be Detected in the Circulation of Breast Cancer Patients. **RNA biology**, v. 14, n. 3, p. 305–316, mar. 2017.

COOK, A. K.; SPAULDING, K. A.; EDWARDS, J. F. Clinical Findings in Dogs with Incidental Adrenal Gland Lesions Determined by Ultrasonography: 151 Cases (2007-2010). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 244, n. 10, p. 1181–1185, maio 2014.

CROSBY, J.; BROWN, S. Stability of Compounded Trilostane Suspension in Cod Liver Oil. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 228, p. 15–17, out. 2017.  
DANECEK, P. et al. Twelve Years of SAMtools and BCFtools. **GigaScience**, v. 10, n. 2, fev. 2021.

DE BRUIN, C. et al. Cushing's Disease in Dogs and Humans. **Hormone research**, v. 71 Suppl 1, p. 140–143, jan. 2009.

DE CHALUS, T. et al. Ultrasonographic Adrenal Gland Measurements in Healthy Yorkshire Terriers and Labrador Retrievers. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 42, n. 1, p. 57–64, fev. 2013.

DE MARCO, V. et al. Adrenal Incidentaloma: Clinical and Histopathological Characteristics. In: ACVIM Forum Research Abstract Program, Phoenix, Arizona. **Anais...** Phoenix, Arizona: Journal of Veterinary Internal Medicine, 2019.

DEBILLON, E. et al. Unilateral Adrenalectomy as a First-Line Treatment of Cushing's Syndrome in Patients With Primary Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 12, p. 4417–4424, dez. 2015.

DOBIN, A. et al. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15–21, 2013.

DOI, M. et al. Salt-Sensitive Hypertension in Circadian Clock-Deficient Cry-Null Mice Involves Dysregulated Adrenal Hsd3b6. **Nature medicine**, v. 16, n. 1, p. 67–74, jan. 2010.

DROUGAT, L. et al. Genomic and Sequence Variants of Protein Kinase A Regulatory Subunit Type 1 $\beta$  (PRKAR1B) in Patients with Adrenocortical Disease and Cushing Syndrome. **Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 23, n. 1, p. 174–182, jan. 2021.

DUPONT, E. et al. Ontogenesis of 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase/A5-A4 Isomerase in the Rat Adrenal as Revealed by Immunocytochemistry and in Situ Hybridization. **Endocrinology**, v. 129, n. 5, p. 1–267, 1991.

DYCE, K. M.; SACK, W. O.; WENSING, C. J. G. As glândulas endócrinas. In: **Tratado de anatomia veterinária**. 4. ed. São Paulo: Elsevier, 2010. p. 444-445.

ELIAS, L. L. K. et al. Glândula supra-renal. In: AIRES, M. M. (Ed.). **Fisiologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2018. p. 1137–1154.

ESPIARD, S. et al. ARMC5 Mutations in a Large Cohort of Primary Macronodular Adrenal Hyperplasia: Clinical and Functional Consequences. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 6, p. E926-35, jun. 2015.



ESPIARD, S. et al. Activating PRKACB Somatic Mutation in Cortisol-Producing Adenomas. **JCI insight**, v. 3, n. 8, abr. 2018.

ESPIÑEIRA, I. M. et al. Adrenal Cortex Stimulation with HCG in Spayed Female Dogs with Cushing's Syndrome: Is the LH-Dependent Variant Possible? **Open veterinary journal**, v. 11, n. 2, p. 319–329, 2021.

FASSNACHT, M. et al. Management of Adrenal Incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in Collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **European journal of endocrinology**, v. 175, n. 2, p. G1–G34, ago. 2016.

FONSECA, V. U.; YAMATO, R. J. **Estudo da casuística de hipertensão arterial sistêmica secundária ao hiperadrenocorticismo canino e o efeito da associação de trilostano e cloridrato de benazepril sobre a pressão arterial e perfil eletrolítico.** . ed. São Paulo: Monografia apresentada como trabalho de conclusão do Curso de Especialização em Endocrinologia e Metabologia em Pequenos Animais pela Associação dos Clínicos Veterinários de Pequenos Animais (ANCLIVEPA-SP) e Universidade Cruzeiro do Sul - UNICSUL, 2011.

GALAC, S. et al. Hyperadrenocorticism in a Dog Due to Ectopic Secretion of Adrenocorticotrophic Hormone. **Domestic animal endocrinology**, v. 28, n. 3, p. 338–348, abr. 2005.

GALAC, S. et al. ACTH-Independent Hyperadrenocorticism Due to Food-Dependent Hypercortisolemia in a Dog: A Case Report. **Veterinary journal (London, England : 1997)**, v. 177, n. 1, p. 141–143, jul. 2008.

GALAC, S. et al. Expression of the ACTH receptor, steroidogenic acute regulatory protein, and steroidogenic enzymes in canine cortisol-secreting adrenocortical tumors. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, n. 4, p. 259–267, 2010a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.07.001>>.

GALAC, S. et al. Expression of receptors for luteinizing hormone, gastric-inhibitory polypeptide, and vasopressin in normal adrenal glands and cortisol-secreting adrenocortical tumors in dogs. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 39, n. 1, p. 63–75, 2010b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.domaniend.2010.02.003>>.

GALAC, S. et al. Expression of Steroidogenic Factor 1 in Canine Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumors and Normal Adrenals. **Domestic animal endocrinology**, v. 49, p. 1–5, out. 2014.

GALAC, S.; WILSON, D. B. Animal Models of Adrenocortical Tumorigenesis. **Endocrinology and metabolism clinics of North America**, v. 44, n. 2, p. 297–310, jun. 2015.

GENOME. **Genome research**. Disponível em:

<[https://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j\\_large.gif](https://www.genome.gov/Images/EdKit/bio2j_large.gif)>. Acesso em: 31 mar. 2022.

GILOR, C.; GRAVES, T. K. Interpretation of Laboratory Tests for Canine Cushing's Syndrome. **Topics in companion animal medicine**, v. 26, n. 2, p. 98–108, maio 2011.  
GIRARDI, C.; SUBTIL, F.; RANGEL, J. Sequenciamento de DNA. In: GIRARDI, C.; SUBTIL, F.; RANGEL, J. (Ed.). **Biologia molecular**. 1. ed. São Paulo: Grupo A, 2018. p. 99–126.

GOLDSTEIN, L. D. et al. Recurrent Loss of NFE2L2 Exon 2 Is a Mechanism for Nrf2 Pathway Activation in Human Cancers. **Cell reports**, v. 16, n. 10, p. 2605–2617, set. 2016.

GRECO, D. S. et al. Concurrent Pituitary and Adrenal Tumors in Dogs with Hyperadrenocorticism: 17 Cases (1978-1995). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 214, n. 9, p. 1349–1353, maio 1999.

HALL, P. F.; YANAGIBASHI, K.; KOBAYASHI, Y. Synthesis of Aldosterone by Mitochondria and Homogeneous 11  $\beta$  -Hydroxylase from Beef and Pig. **Endocrine Research**, v. 17, p. 135–149, 1991.

HAMRAHIAN, A. H. et al. Clinical Utility of Noncontrast Computed Tomography Attenuation Value (Hounsfield Units) to Differentiate Adrenal Adenomas/Hyperplasias from Nonadenomas: Cleveland Clinic Experience. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 2, p. 871–877, fev. 2005.

HANSON, J. M. et al. Expression and Mutation Analysis of Tpit in the Canine Pituitary Gland and Corticotroph Adenomas. **Domestic animal endocrinology**, v. 34, n. 3, p. 217–222, abr. 2008.

HANSON, J. M.; MOL, J. A.; MEIJ, B. P. Expression of Leukemia Inhibitory Factor and Leukemia Inhibitory Factor Receptor in the Canine Pituitary Gland and Corticotrope Adenomas. **Domestic animal endocrinology**, v. 38, n. 4, p. 260–271, maio 2010.

HORVATH, A. et al. A CAMP-Specific Phosphodiesterase (PDE8B) That Is Mutated in Adrenal Hyperplasia Is Expressed Widely in Human and Mouse Tissues: A Novel PDE8B Isoform in Human Adrenal Cortex. **European journal of human genetics : EJHG**, v. 16, n. 10, p. 1245–1253, out. 2008.

HUG, N.; LONGMAN, D.; CÁCERES, J. F. Mechanism and Regulation of the Nonsense-Mediated Decay Pathway. **Nucleic acids research**, v. 44, n. 4, p. 1483–1495, fev. 2016.

HULLINGER, R.; ANDRISANI, O. Sistema endócrino. In: EURELL, J. A.; FRAPPIER, B. (Ed.). **Histologia Veterinária de Dellman**. 6. ed. São Paulo: Manole, 2012. p. 311–315.

HULLINGER, R. L. Adrenal Cortex of the Dog (*Canis Familiaris*). I. Histomorphologic Changes during Growth, Maturity, and Aging. **Anatomia, histologia, embryologia**, v. 7, n. 1, p. 1–27, fev. 1978.

ISHINO, H. et al. Ki-67 and Minichromosome Maintenance-7 (MCM7) Expression in Canine Pituitary Corticotroph Adenomas. **Domestic animal endocrinology**, v. 41, n. 4, p. 207–213, nov. 2011.

ISHINO, H. et al. Hyperadrenocorticism Caused by a Pituitary Ganglioglioma in a Dog. **Veterinary pathology**, v. 56, n. 4, p. 609–613, jul. 2019.

JOHNSON, K. D. et al. Primary Hyperaldosteronism in a Dog with Concurrent Lymphoma. **Journal of veterinary medicine. A, Physiology, pathology, clinical medicine**, v. 53, n. 9, p. 467–470, nov. 2006.

JUNG, H. et al. Intron Retention Is a Widespread Mechanism of Tumor-Suppressor Inactivation. **Nature genetics**, v. 47, n. 11, p. 1242–1248, nov. 2015.

KAGEYAMA, K. et al. Ubiquitin-Specific Protease 8 Inhibitor Suppresses Adrenocorticotrophic Hormone Production and Corticotroph Tumor Cell Proliferation. **Endocrine journal**, v. 67, n. 2, p. 177–184, fev. 2020.

KAHLES, A. et al. Comprehensive Analysis of Alternative Splicing Across Tumors from 8,705 Patients. **Cancer cell**, v. 34, n. 2, p. 211–224.e6, ago. 2018.

KAMILARIS, C. D. C.; HANNAH-SHMOUNI, F.; STRATAKIS, C. A. Adrenocortical Tumorigenesis: Lessons from Genetics. **Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism**, v. 34, n. 3, p. 101428, maio 2020.

KANG, Y. et al. CPC2 : a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. May, p. 12–16, 2017.

KARNI, R. et al. The Gene Encoding the Splicing Factor SF2/ASF Is a Proto-Oncogene. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 185–193, mar. 2007.

KEENEY, D. S.; JENKINS, C. M.; WATERMAN, M. R. Developmentally Regulated Expression of Adrenal 17 Alpha-Hydroxylase Cytochrome P450 in the Mouse Embryo. **Endocrinology**, v. 136, n. 11, p. 4872–4879, nov. 1995.

KIRKNESS, E. F. et al. The Dog Genome: Survey Sequencing and Comparative Analysis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 301, n. 5641, p. 1898–1903, set. 2003.

KOMINAMI, S.; HARADA, D.; TAKEMORI, S. Regulation mechanism of the catalytic activity of bovine adrenal cytochrome P45011B. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1192, p. 234–240, 1994.

- KOMINAMI, S.; NISHIDA, N.; TAKEMORI, S. Reconstitution of the steroidogenic pathway from cholesterol to aldosterone in liposome membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1301, p. 199–206, 1996.
- KONOSU-FUKAYA, S. et al. 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isoforms in human aldosterone-producing adenoma. **Mol Cell Endocrinol.**, v. 15, n. 4, p. 942–953, 2015.
- KOOK, P. H. et al. Addison's Disease Due to Bilateral Adrenal Malignancy in a Dog. **The Journal of small animal practice**, v. 51, n. 6, p. 333–336, jun. 2010.
- KOOL, M. M. J. et al. Activating Mutations of GNAS in Canine Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 27, n. 6, p. 1486–1492, 2013.
- KOOL, M. M. J. et al. Expression of Angiogenesis-Related Genes in Canine Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumors. **Domestic animal endocrinology**, v. 47, p. 73–82, abr. 2014.
- KOOL, M. M. J. et al. Insulin-like Growth Factor--Phosphatidylinositol 3 Kinase Signaling in Canine Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumors. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 1, p. 214–224, jan. 2015.
- KOWALEWSKI, M. P. et al. Characterization of the Canine 3 $\beta$ -Hydroxysteroid Dehydrogenase and Its Expression in the Corpus Luteum during Diestrus. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 101, n. 4–5, p. 254–262, nov. 2006.
- LABELLE, P. et al. Indicators of Malignancy of Canine Adrenocortical Tumors: Histopathology and Proliferation Index. **Veterinary pathology**, v. 41, n. 5, p. 490–497, set. 2004.
- LACROIX, A. et al. Cushing's Syndrome. **Lancet (London, England)**, v. 386, n. 9996, p. 913–927, ago. 2015.
- LANG, J. M. et al. Elective and Emergency Surgical Management of Adrenal Gland Tumors: 60 Cases (1999-2006). **Journal of the American Animal Hospital Association**, v. 47, n. 6, p. 428–435, 2011.
- LAUFER, E. et al. Sonic hedgehog signaling during adrenal development. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 351, n. 1, p. 19–27, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2011.10.002>>.
- LEE, S. et al. Ectopic Cushing's Syndrome Associated with a Pheochromocytoma in a Dog: A Case Report. **BMC veterinary research**, v. 16, n. 1, p. 35, fev. 2020.
- LEMETAYER, J.; BLOIS, S. Update on the use of trilostane in dogs. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 4, n. 54, p. 397–407, 2018.

LI, H. Minimap2: Pairwise Alignment for Nucleotide Sequences. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 34, n. 18, p. 3094–3100, set. 2018.

LIANG, W.; SUN, F. Prognostic Alternative mRNA Splicing in Adrenocortical Carcinoma. **Frontiers in endocrinology**, v. 12, p. 538364, 2021.

LIBÉ, R. et al. Mutational Analysis of PRKAR1A and Gs(Alpha) in Sporadic Adrenocortical Tumors. **Experimental and clinical endocrinology & diabetes : official journal, German Society of Endocrinology [and] German Diabetes Association**, v. 113, n. 5, p. 248–251, maio 2005.

LISUREK, M.; BERNHARDT, R. Modulation of aldosterone and cortisol synthesis on the molecular level. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 215, n. 1–2, p. 149–159, 2004.

LIU, S.; CHENG, C. Alternative RNA Splicing and Cancer. **Wiley interdisciplinary reviews. RNA**, v. 4, n. 5, p. 547–566, 2013.

LOTTATI, M.; BRUYETTE, D. S. Outcomes of the Addition of Pasireotide to Traditional Adrenal-Directed Treatment for Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism Secondary to Macroadenoma: 9 Cases (2013-2015). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 252, n. 11, p. 1403–1408, jun. 2018.

LOUISET, E. et al. Intraadrenal Corticotropin in Bilateral Macronodular Adrenal Hyperplasia. **The New England journal of medicine**, v. 369, n. 22, p. 2115–2125, nov. 2013.

LV, J. et al. Alternative Splicing Events and Splicing Factors Are Prognostic in Adrenocortical Carcinoma. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 918, 2020.

MAMELAK, A. N.; OWEN, T. J.; BRUYETTE, D. Transsphenoidal Surgery Using a High Definition Video Telescope for Pituitary Adenomas in Dogs with Pituitary Dependent Hypercortisolism: Methods and Results. **Veterinary surgery : VS**, v. 43, n. 4, p. 369–379, maio 2014.

MARTINS, F. S. M. et al. Epidemiological, clinical, and laboratory aspects in a case series of canine hyperadrenocorticism: 115 cases (2010-2014). **Pesquisa Veterinaria Brasileira**, v. 39, n. 11, p. 900–908, 2019.

MASSARI, F. et al. Adrenalectomy in Dogs with Adrenal Gland Tumors: 52 Cases (2002-2008). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 239, n. 2, p. 216–221, jul. 2011.

MELIÁN, C. et al. Ultrasound Evaluation of Adrenal Gland Size in Clinically Healthy Dogs and in Dogs with Hyperadrenocorticism. **The Veterinary record**, v. 188, n. 8, p. e80, abr. 2021.

MESTRINHO, L. A. et al. **Surgical Excision of an Adrenal Neuroblastoma in a Dog.** *Frontiers in veterinary science*, 2019. .

MILLER, J. N.; PEARCE, D. A. Nonsense-Mediated Decay in Genetic Disease: Friend or Foe? **Mutation research. Reviews in mutation research**, v. 762, p. 52–64, 2014.

MILLER, W. L.; AUCHUS, R. J. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders. **Endocrine Reviews**, v. 32, n. 1, p. 81–151, 2011.

MITANI, F. Functional Zonation of the Rat Adrenal Cortex: The Development and Maintenance. **Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical and biological sciences**, v. 90, n. 5, p. 163–183, 2014.

MORANDI, F. et al. Imaging Diagnosis--Bilateral Adrenal Adenomas and Myelolipomas in a Dog. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, v. 48, n. 3, p. 246–249, 2007.

MORISSETTE, J. et al. Genetic Linkage Mapping of HSD3B1 and HSD3B2 Encoding Human Types I and II 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta 5-Delta 4-Isomerase Close to D1S514 and the Centromeric D1Z5 Locus. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 69, n. 1–2, p. 59–62, 1995.

MURPHY, A. J. et al. Therapeutic Targeting of Alternative Splicing: A New Frontier in Cancer Treatment. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 868664, 2022.

NAGUMO, T. et al. Utility of Contrast-Enhanced Ultrasound in Differential Diagnosis of Adrenal Tumors in Dogs. **The Journal of veterinary medical science**, v. 82, n. 11, p. 1594–1601, nov. 2020.

NAKAMURA, Y. et al. Adrenal changes associated with adrenarache Yasuhiro. v. 10, n. 1, p. 1–23, 2009.

OGISHIMA, T.; MITANI, F.; ISHIMURA, Y. Isolation of two distinct cytochromes P-45011 beta with aldosterone synthase activity from bovine adrenocortical mitochondria. **J Biochem**, v. 105, n. 4, p. 497–499, 1989. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2788159](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2788159)>.

OIKONOMOPOULOS, S. et al. Methodologies for Transcript Profiling Using Long-Read Technologies. **Frontiers in genetics**, v. 11, p. 606, 2020.

PACBIO. **Introduction to RNA sequencing using the Iso-Seq method.** Disponível em: <<https://www.pacb.com/products-and-services/applications/rna-sequencing/>>. Acesso em: 20 maio. 2022.

- PAGANI, E. et al. Ultrasonographic Features of Adrenal Gland Lesions in Dogs Can Aid in Diagnosis. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 267, nov. 2016.
- PAYNE, A. H.; HALES, D. B. Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. **Endocrine Reviews**, v. 25, n. 6, p. 947–970, 2004.
- PEREZ-RIVAS, L. G. et al. The Gene of the Ubiquitin-Specific Protease 8 Is Frequently Mutated in Adenomas Causing Cushing's Disease. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 100, n. 7, p. E997-1004, jul. 2015.
- PIHLAJOKI, M. et al. Adrenocortical zonation, renewal, and remodeling. **Frontiers in Endocrinology**, v. 6, n. MAR, p. 1–14, 2015.
- REUSCH, C. E. Trilostane: a review of success history. In: 35th World Small Animal Veterinary Congress, **Anais...**2010.
- RHEAUME, E. et al. Structure and Expression of a New Complementary DNA Encoding the Almost Exclusive 3 Beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase/Delta 5-Delta 4-Isomerase in Human Adrenals and Gonads. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 5, n. 8, p. 1147–1157, ago. 1991.
- ROBIC, A.; FARAUT, T.; PRUNIER, A. Pathways and genes involved in steroid hormone metabolism in male pigs: A review and update. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 140, p. 44–55, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.11.001>>.
- SALESOV, E. et al. Urinary and Plasma Catecholamines and Metanephrines in Dogs with Pheochromocytoma, Hypercortisolism, Nonadrenal Disease and in Healthy Dogs. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 29, n. 2, p. 597–602, 2015.
- SANDERS, K. et al. New Insights in the Functional Zonation of the Canine Adrenal Cortex. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 30, n. 3, p. 741–750, 2016.
- SANDERS, K. et al. The Utrecht Score: A Novel Histopathological Scoring System to Assess the Prognosis of Dogs with Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 3, p. 329–337, set. 2019a.
- SANDERS, K. et al. Molecular Markers of Prognosis in Canine Cortisol-Secreting Adrenocortical Tumours. **Veterinary and comparative oncology**, v. 17, n. 4, p. 545–552, dez. 2019b.
- SANDERS, K. et al. Circulating MicroRNAs as Non-Invasive Biomarkers for Canine Cushing's Syndrome. **Frontiers in veterinary science**, v. 8, p. 760487, 2021.
- SASAKI, F.; NISHIOKA, S. Fetal Development of the Pituitary Gland in the Beagle.

**The Anatomical record**, v. 251, n. 2, p. 143–151, jun. 1998.

SBIERA, S. et al. High Diagnostic and Prognostic Value of Steroidogenic Factor-1 Expression in Adrenal Tumors. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 95, n. 10, p. E161-71, out. 2010.

SBIERA, S. et al. Lack of Ubiquitin Specific Protease 8 (USP8) Mutations in Canine Corticotroph Pituitary Adenomas. **PLoS one**, v. 11, n. 12, p. e0169009, 2016.

SCHIMMER, B. P.; WHITE, P. C. Minireview: Steroidogenic Factor 1: Its Roles in Differentiation, Development, and Disease. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 24, n. 7, p. 1322–1337, jul. 2010.

SCHWARTZ, P. et al. Evaluation of Prognostic Factors in the Surgical Treatment of Adrenal Gland Tumors in Dogs: 41 Cases (1999-2005). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 232, n. 1, p. 77–84, jan. 2008.

SHANG, S.; HUA, F.; HU, Z.-W. The Regulation of  $\beta$ -Catenin Activity and Function in Cancer: Therapeutic Opportunities. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 33972–33989, maio 2017.

SHAO, M.; KINGSFORD, C. Accurate assembly of transcripts through phase-preserving graph decomposition. **Nature Publishing Group**, v. 0, n. November, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nbt.4020>>.

SIEBER-RUCKSTUHL, N. S. et al. Cortisol, Aldosterone, Cortisol Precursor, Androgen and Endogenous ACTH Concentrations in Dogs with Pituitary-Dependant Hyperadrenocorticism Treated with Trilostane. **Domestic animal endocrinology**, v. 31, n. 1, p. 63–75, jul. 2006.

SIEBER-RUCKSTUHL, N. S. et al. Evaluation of Cortisol Precursors for the Diagnosis of Pituitary-Dependent Hypercortisolism in Dogs. **The Veterinary record**, v. 162, n. 21, p. 673–678, maio 2008.

SIMARD, J. et al. Molecular biology and genetics of the  $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase/ $\Delta 5$ - $\Delta 4$  isomerase gene family. **Endocrine Reviews**, v. 150, n. SUPPL., p. 525–582, 2005.

SOLER ARIAS, E. A. et al. **Cushing's syndrome caused by intra-adrenocortical adrenocorticotrophic hormone in a dog.** **Journal of veterinary internal medicine**, jan. 2022. .

SOULSBY, S. N. et al. Ultrasonographic Evaluation of Adrenal Gland Size Compared to Body Weight in Normal Dogs. **Veterinary radiology & ultrasound : the official journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association**, v. 56, n. 3, p. 317–326, 2015.



STAATS, C. Mecanismos de processamento e maturação do RNA. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. (Ed.). **Biologia molecular básica**. 5. ed. [s.l: s.n.]p. 239–259.

SQANTI3. Disponível em: <https://github.com/ConesaLab/SQANTI3/wiki/SQANTI3-output/>. Acessado em: 20 de maio 2022.

STEFFENSEN, C. et al. Epidemiology of Cushing's Syndrome. **Neuroendocrinology**, v. 92 Suppl 1, p. 1–5, 2010.

STEWART, P. M.; KRONE, N. P. The adrenal cortex. In: MELMED, S. et al. (Ed.). **Williams Textbook of Endocrinology**. 12. ed. Philadelphia: Elsevier, 2011. p. 479–534.

TAKEMORI, S. et al. Molecular Mechanism of Cytochrome P-450-Dependent Aldosterone Biosynthesis in the Adrenal Cortex. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, v. 6, n. 8, p. 267–273, 1995.

TARDAGUILA, M. et al. SQANTI: Extensive Characterization of Long-Read Transcript Sequences for Quality Control in Full-Length Transcriptome Identification and Quantification. **Genome research**, v. 28, n. 3, p. 396–411, fev. 2018.

TAVARES, R. et al. Splice Variants in the Proteome: A Promising and Challenging Field to Targeted Drug Discovery. **Drug discovery today**, v. 20, n. 3, p. 353–360, mar. 2015.

THIEL, A. et al. PRKACA Mutations in Cortisol-Producing Adenomas and Adrenal Hyperplasia: A Single-Center Study of 60 Cases. **European journal of endocrinology**, v. 172, n. 6, p. 677–685, jun. 2015.

THOMAS, J. L.; BUCHOLTZ, K. M.; KACSOH, B. Selective inhibition of human 3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 as a potential treatment for breast cancer. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 125, n. 1–2, p. 57–65, 2012.

THURÓCZY, J. Foetal Development of Endocrine Organs in Dog. **Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene**, v. 55 Suppl 2, p. 10–16, jul. 2020.

VAL, P.; MARTINEZ-BARBERA, J.-P.; SWAIN, A. Adrenal development is initiated by Cited2 and Wt1 through modulation of Sf-1 dosage. **Development**, v. 134, n. 12, p. 2349–2358, 2007. Disponível em: <<http://dev.biologists.org/cgi/doi/10.1242/dev.004390>>.

VAN BOKHORST, K. L. et al. Concurrent Pituitary and Adrenocortical Lesions on Computed Tomography Imaging in Dogs with Spontaneous Hypercortisolism. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 33, n. 1, p. 72–78, jan. 2019.

- VAN RIJN, S. J. et al. The Influence of Pituitary Size on Outcome After Transsphenoidal Hypophysectomy in a Large Cohort of Dogs with Pituitary-Dependent Hypercortisolism. **Journal of veterinary internal medicine**, v. 30, n. 4, p. 989–995, jul. 2016.
- VENTER, J. C. et al. The Sequence of the Human Genome. **Science (New York, N.Y.)**, v. 291, n. 5507, p. 1304–1351, fev. 2001.
- VILAR, L. et al. Diagnóstico e diagnóstico diferencial da Síndrome de Cushing. In: VILAR, L. (Ed.). **Endocrinologia clínica**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooga, 2021. p. 472–500.
- WAGNER, S. et al. Cytochrome b5 Expression in Gonadectomy-induced Adrenocortical Neoplasms of the Domestic Ferret (*Mustela putorius furo*). v. 258, p. 255–258, 2008.
- WENGER, M. et al. Effect of Trilostane on Serum Concentrations of Aldosterone, Cortisol, and Potassium in Dogs with Pituitary-Dependent Hyperadrenocorticism. **American journal of veterinary research**, v. 65, n. 9, p. 1245–1250, set. 2004.
- WOOD, M. A. et al. Fetal Adrenal Capsular Cells Serve as Progenitor Cells for Steroidogenic and Stromal Adrenocortical Cell Lineages in *M. Musculus*. **Development (Cambridge, England)**, v. 140, n. 22, p. 4522–4532, nov. 2013.
- XU, N. et al. Identification of Survival-Associated Alternative Splicing Events and Signatures in Adrenocortical Carcinoma Based on TCGA SpliceSeq Data. **Aging**, v. 12, n. 6, p. 4996–5009, mar. 2020.
- YATES, R. et al. Adrenocortical Development, Maintenance, and Disease. **Current topics in developmental biology**, v. 106, p. 239–312, 2013.
- ZAHA, A.; PASSAGLIA, L. Técnicas de biologia molecular. In: ZAHA, A.; FERREIRA, H.; PASSAGLIA, L. (Ed.). **Biologia molecular básica**. 5. ed. São Paulo: Artmed, 2014. p. 357–359.
- ZAJICEK, G.; ARIEL, I.; ARBER, N. The Streaming Adrenal Cortex: Direct Evidence of Centripetal Migration of Adrenocytes by Estimation of Cell Turnover Rate. **The Journal of endocrinology**, v. 111, n. 3, p. 477–482, dez. 1986.