

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**Análise do perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em tumores adrenocorticais
e o efeito dessa modulação na tumorigênese da adrenal**

Carolina Alves Pereira Corrêa

Ribeirão Preto - SP
2020

Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Departamento de Genética

**Análise do perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em tumores adrenocorticais
e o efeito dessa modulação na tumorigênese da adrenal**

Carolina Alves Pereira Corrêa

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli
Coorientador: Dr. Augusto Faria Andrade

Ribeirão Preto - SP

2020

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Corrêa, Carolina Alves Pereira

Análise do perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em tumores adrenocorticais e o efeito dessa modulação na tumorigênese da adrenal. Ribeirão Preto, 2020. 124f

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Scrideli, Carlos Alberto

1. Tumor Adrenocortical. 2. microRNAs. 3. TGF- β .

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, localizado no Departamento de Pediatria do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP) e com apoio financeiro das seguintes agências de fomento e instituições:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carolina Alves Pereira Corrêa

“Análise do perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em tumores adrenocorticais e o efeito dessa modulação na tumorigênese da adrenal.”

Tese apresentada ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Genética.

Data da defesa:

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof.Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

É um grande desafio utilizar um espaço tão pequeno e algumas palavras para demonstrar minha gratidão a todos que fizeram parte da minha trajetória na pós-graduação.

Agradeço ao **Prof. Dr. Carlos Alberto Scrideli**, por ser meu orientador desde o início da minha jornada, por tantos ensinamentos, pela confiança que sempre depositou em mim e por toda dedicação e auxílio para o desenvolvimento desse trabalho. Obrigada por contribuir para o meu desenvolvimento profissional.

Ao meu coorientador, **Dr. Augusto Faria Andrade**, que é para mim um grande exemplo de profissional. Obrigada por tudo que me ensinou durante esses anos, pela paciência e dedicação comigo e com o meu trabalho; por todas as discussões e rapidez em me dar respostas e orientações.

Ao **Prof. Dr. Luiz Gonzaga Tone**, por ter aberto as portas do laboratório para mim para que eu pudesse fazer um estágio e me permitir ficar durante o mestrado e o doutorado, e que continua me acolhendo até hoje. Sempre mostrando a importância de se ter uma equipe trabalhando em conjunto.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Pediatria do HC-FMRP, **Beth, Paola, Evelise, Cléo, Luciana** e a todos os funcionários pela boa convivência e auxílio sempre que necessário.

À **Prof^ª. Dra. Maria Sol Brassesco**, pelas oportunidades e ensinamentos durante a minha jornada.

Agradeço a todos do **Departamento de Pediatria e Genética** e a todos os **Professores** que estiveram comigo dentro da sala de aula e fora dela, discutindo resultados e compartilhando conhecimentos. E à **Susie Nalon**, por estar sempre pronta a ajudar e sem a qual nada aconteceria! Obrigada por tudo, Susie!

Agradeço a todo o apoio financeiro recebido durante esse trabalho das agências **FAPESP, CNPq e Capes**. Sem as quais nada seria possível!

Aos grandes amigos que ganhei durante minha jornada:

À **Dra. Rosane**, que é mais do que chefe, é uma grande amiga! Obrigada por todo o apoio, por enxugar lágrimas, por me aconselhar nos momentos difíceis. Pela cumplicidade e companheirismo ao longo desse tempo todo.

À **Veridiana Kill Suazo**, por toda a amizade, conselhos, puxões de orelha. Muito do que sei hoje devo a você! Obrigada pelo acolhimento tão rápido quando cheguei e por ter se tornado tão importante para o meu desenvolvimento no laboratório!

À **Mirella Baroni**, que me recebeu no laboratório e que me ensinou a dar os primeiros passos na pesquisa e a quem tenho como exemplo de trajetória. Obrigada por todos os ensinamentos e por estar sempre comigo além da bancada. Por sempre me ouvir e aconselhar. Obrigada pelo grande apoio nessa minha reta final e em todos os meus momentos!

À **Keteryne Rodrigues da Silva**, que foi um presente que recebi para auxiliar em seu estágio no laboratório e que se tornou uma grande amiga, que tanto me ensina, ajuda e aconselha. Obrigada por estar sempre comigo, por dividir tantos momentos e por sempre ter uma carta na manga todas as vezes que me vi sem saída!

À **Luciana Veronez**, que chegou há menos tempo, mas demonstrou a grande profissional que é, me ajudando a conduzir meu estudo e dividindo comigo experiências e discussões essenciais. E que se tornou uma amiga para todas as horas! Obrigada por sempre estar comigo, pelos conselhos e amparo!

Ao **Pablo Chagas**, que começou como amigo de bancada e experimentos, e hoje se tornou um irmão. Alguém que troca comigo muitas conversas, conselhos, pensamentos dentro e fora da pesquisa. Obrigada por tudo!

À **Gabriela Vieira**, que sempre compartilhou comigo os desesperos e euforias. Por sempre me mostrar que independente de qualquer coisa, temos sempre que colocar um sorriso no rosto e continuar a caminhada!

Aos amigos e companheiros do dia a dia no laboratório, **Karina, Grazi, Gabriel, Rodrigo, Lenisa, Taci, Kleiton, Ricardo e Gustavo**, por estarem sempre prontos a me ajudar, ensinar e

estenderem a mão, por dividirem momentos divertidos e estarem sempre prontos para tomarem um café.

À **Lara Elis**, que se tornou um exemplo de profissional e de coragem. Uma amiga que levo comigo no coração, independente da distância física, sei que estamos sempre juntas!

À **Régia Lira**, que me deu os primeiros ensinamentos no trabalho do doutorado, compartilhando técnicas e discussões e que se tornou uma amiga querida; alguém que também está comigo no coração!

Aos meus amigos fora do laboratório e da vida acadêmica:

À **Ana Paula Nogueira**, por estar comigo desde o berço, por entender meus momentos de tensão devido à pesquisa, por me apoiar sempre e compartilhar comigo todos os meus momentos! Você é minha irmã de alma e eu te amo!

À **Giovana Tórtoro e Sebastião Silva**, por se tornarem amigos tão especiais, por compartilharem comigo momentos e por serem espelho para mim.

Aos amigos **Erika, Carol Angelis, Isabela Rangel, Deivid, Leonardo Santana, Tamy, Sâmee, Felipe, Tom, Well**, por serem tão especiais e por me apoiarem sempre, compartilhando comigo os melhores momentos!

À **Débora Mazzotti e a Maria Clara Festuccia**, por estarem comigo todas as manhãs nesses últimos dois anos, e por me fazerem resgatarem valores e experiências que já tinham se perdido em mim. Obrigada meninas, vocês são parte importante da minha vida!

À minha família:

À minha mãe **Claudia**, a quem não tenho palavras para agradecer! Obrigada por toda sua dedicação para fazer de mim o que sou hoje! Por me apoiar, aconselhar, amparar e nunca me deixar desistir dos meus sonhos! Obrigada por estar comigo em todas as minhas conquistas e por sempre me mostrar que existe um novo caminho! Você é o meu exemplo e eu te amo além da vida!

Aos meus avós, **Nelson e Vera**, por serem mais que avós para mim, são segundos pais, e por terem se dedicado à minha criação e crescimento! Por me ampararem sempre e me apoiarem em minha caminhada! Vocês são minhas riquezas! Meu amor por vocês é imensurável!

Aos meus tios **Vera, Mario, Nelson, Fernanda e Regina**, aos meus primos **Leonardo, Amanda e Helena**, e ao meu padrasto, **Paulo**. Obrigada por todo o apoio, incentivo e por estarem sempre comigo em todas as situações! Amo vocês!

Aos meus irmãos, **Victor, Juan e Enzo**. Vocês são meu coração batendo fora do peito! Amo vocês incondicionalmente!

Ao meu Pai **Ivan**, à **Silvana e Marina**, por todo o incentivo e apoio!

À **Camila Pontoglio**, por ser meu exemplo diário de otimismo, persistência e dedicação com o trabalho. Por me incentivar todos os dias a ser uma pessoa melhor! Por me mostrar que a vida é leve e alegre e que só depende de nós para fazer o dia ser bonito. Obrigada por estar ao meu lado nos meus melhores e piores momentos, por entender meus momentos de angústia, por me dar colo e enxugar minhas lágrimas. Por ser a melhor companheira que eu poderia ganhar da vida! Sem você eu não teria conseguido! Minha gratidão e amor são eternos!

À família postiça que ganhei de presente, **Tia Dedé, Tia Rita, Tio Jesner, Marquinho, Erika e Renata**. Obrigada por me receberem tão bem e por tanto carinho! Estão sempre em meu coração!

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado e agradeço à **Deus**, por todas as bênçãos e amparos recebidos não só agora, mas durante a vida inteira. Sou muito grata a tudo!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas.
Mas ao tocar em uma alma humana, seja apenas
outra alma humana.”*

Carl G. Jung

RESUMO

ALVES PEREIRA CORRÊA, Carolina. **Análise do perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em tumores adrenocorticais e o efeito dessa modulação na tumorigênese da adrenal.** 2020. 124f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

O tumor adrenocortical (TAC) pediátrico é um câncer raro, com baixa incidência, e sobrevida global em 5 anos variando de 54-77%. No sul/sudeste do Brasil essa incidência é 10-15 vezes maior do que no resto do mundo, possivelmente devido à presença de uma mutação germinativa no gene *TP53*. O tratamento atual consiste em ressecção cirúrgica e, em casos mais avançados, uso de mitotano associado ou não a quimioterapia. Apesar desse tratamento, cerca de 50% dos pacientes apresentam recidiva. Há uma grande dificuldade em classificar esses tumores quanto ao seu grau histológico e malignidade, e até o momento não existe uma caracterização precisa de subgrupos moleculares associados a desfecho clínico. Para a definição prognóstica tem sido utilizado estadiamento clínico, porém nem sempre com boa correlação com desfecho da doença. Portanto, existe uma grande necessidade de entender melhor a biologia dos TAC, para que o prognóstico e terapia desses pacientes sejam melhor direcionados. Dentre as alterações descritas para este tumor, pouco se sabe sobre a ação de miRNAs em TAC pediátricos, bem como a relação dessa desregulação com a via de desenvolvimento TGF- β . O objetivo desse estudo foi investigar a expressão do miR-483-3p e do miR-630 em linhagens celulares de TAC, amostras tumorais de pacientes pediátricos e controles não neoplásicos, os efeitos de suas modulações e sua relação com o funcionamento da via TGF- β . Foi observado que o miR-483-3p apresenta maior expressão nas amostras tumorais em relação as não neoplásicas, enquanto o miR-630 não apresentou diferença, mas a desregulação de ambos esteve associada com o prognóstico dos pacientes, por estarem relacionados com sobrevida, estadios avançados, recidiva, metástase e óbito. Além disso, ao modificar a expressão do miR-483-3p e do miR-630 *in vitro*, foi observada diminuição na viabilidade celular e formação de colônias, bem como alteração na expressão de alguns genes da via TGF- β , como *TGFBR1*, *TGFBR2* e *SMAD7*; além de alteração na expressão das proteínas Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. Além disso, a combinação da inibição da via TGF- β com o aumento da expressão do miR-630 ou com o silenciamento do miR-483-3p, promoveu queda na viabilidade celular, na formação de colônias, além de alterar a expressão de proteínas da via em questão. Todos os dados em conjunto indicam que ambos os miRNAs podem ser potenciais marcadores para prever o prognóstico dos pacientes com TAC, visto que apresentam envolvimento com a via TGF- β .

Palavras-chave: Tumor Adrenocortical, miRNA, TGF- β

ABSTRACT

ALVES PEREIRA CORRÊA, Carolina. **Analysis of the expression profile of miR-483-3p and miR-630 in adrenocortical tumors and the effect of this modulation on adrenal tumorigenesis.** 2020. 124f. Doctoral Thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil, 2020.

The pediatric adrenocortical tumor (ACT) is rare cancer, with low incidence, and overall 5-year survival ranging from 54-77%. In the south/southeast of Brazil, this incidence is 10-15 times higher than in the rest of the world, possibly due to the presence of a germline mutation in the TP53 gene. Current treatment consists of surgical resection and, in more advanced cases, the use of mitotane associated or not with chemotherapy. Despite this treatment, about 50% of patients experience recurrence. There is great difficulty in classifying these tumors according to their histological grade and malignancy, and so far, there is no precise characterization of molecular subgroups associated with clinical outcome. For the prognostic definition, clinical staging has been used, but not always with a good correlation with the outcome of the disease. Therefore, there is a great need to better understand the biology of ACT, so that the prognosis and therapy of these patients are better targeted. Among the alterations described for this tumor, little is known about the action of miRNAs in pediatric ACT, as well as the relationship between this dysregulation and the TGF- β development pathway. The aim of this study was to investigate the expression of miR-483-3p and miR-630 in ACT cell lines, tumor samples from pediatric patients and non-neoplastic controls, the effects of their modulations and their relationship with the functioning of the TGF- β . It was observed that miR-483-3p show greater expression in tumor samples compared to non-neoplastic samples, while miR-630 showed no difference, but the dysregulation of both was associated with patients' prognosis, as they are related to survival, stages advanced, with relapse, metastasis, and death. In addition, when modifying the expression of miR-483-3p and miR-630 in vitro, a decrease in cell viability and colony formation was observed, as well as changes in the expression of some genes of the TGF- β pathway, such as TGFBR1, TGFBR2, and SMAD7; in addition to changes in the expression of the Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin proteins. Besides that, the combination of inhibition of the TGF- β pathway with increased expression of miR-630 or silencing of miR-483-3p promoted a decrease in cell viability, colony formation, and altering protein expression the pathway in question. All the data together indicate that both miRNAs can be potential markers to predict the prognosis of patients with ACT since they are involved with the TGF- β pathway.

Keywords: Adrenocortical Tumor, miRNA, TGF- β

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Morfologia da glândula adrenal fetal e adulta. | 19 |
| Figura 2. Representação da glândula adrenal no adulto | 20 |
| Figura 3. Via de sinalização canônica TGF- β | 33 |
| Figura 4. Biogênese dos microRNAs.. | 35 |
| Figura 5. Expressão Relativa do miR-483-3p e miR-630 em amostras de TAC e tecido adrenal não neoplásico..... | 50 |
| Figura 6. Associação da sobrevida dos pacientes com suas condições clínicas..... | 54 |
| Figura 7. Associação da expressão do miR-630 com a sobrevida livre de eventos e global em pacientes com TAC.. | 55 |
| Figura 8. Associação da expressão do miR-630 e as características clínicas de pacientes pediátricos com TAC..... | 56 |
| Figura 9. Associação da expressão do miR-483-3p com a sobrevida livre de eventos e global de pacientes pediátricos com TAC.. | 57 |
| Figura 10. Associação da expressão do miR-483-3p e as características clínicas de pacientes pediátricos com TAC..... | 58 |
| Figura 11. Expressão do miR-483-3p e miR-630 nas linhagens celulares H295A e H295R.. | 59 |
| Figura 12. Transdução dos miRNAs nas linhagens celulares de TAC..... | 60 |
| Figura 13. Análise de viabilidade celular após hiperexpressão do miR-630 ou silenciamento do miR-483-3p em linhagens de TAC..... | 60 |
| Figura 14. Capacidade clonogênica após hiperexpressão do miR-630 ou silenciamento do miR-483-3p em linhagens de TAC..... | 61 |
| Figura 15 A e B. Análise de migração da linhagem H295R após hiperexpressão do miR-630 | 62 |
| Figura 16 A e B. Análise de migração da linhagem H295R após silenciamento do miR-483-3p. | 63 |
| Figura 17. Expressão gênica após a transdução nas linhagens H295A e H295R..... | 66 |
| Figura 18. Quantificação de proteínas após transdução dos miRNAs nas linhagens celulares de TAC.. | 67 |
| Figura 19. Viabilidade celular após inativação da via TGF- β nas células transduzidas.. | 68 |
| Figura 20. Capacidade clonogênica após inativação da via TGF- β nas células transduzidas. | 69 |
| Figura 21. Quantificação de proteínas após inativação da via TGF- β na H295A..... | 70 |
| Figura 22. Quantificação de proteínas após inativação da via TGF- β na H295R. | 71 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Estadiamento proposto para tumores adrenocorticais em crianças..... | 28 |
| Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes pediátricos com Tumores Adrenocorticais. | 44 |
| Tabela 3. Genes alvos do miR-483-3p e do miR-630 obtidos pelo miRWalk 2.0 | 64 |
| Tabela 4. Correlação de expressão entre o miR-483-3p e o miR-630 com genes alvos. | 65 |

Lista de Abreviaturas e Siglas

| | |
|-----------------|--|
| 3 β HSD | 3 β -hidroxisteroide desidrogenase |
| AAC | Adenomas Adrenocorticais |
| CAC | Carcinomas Adrenocorticais |
| cDNA | Ácido desoxirribonucléico complementar |
| CO ₂ | Dióxido de Carbono |
| CTNNB1 | β -catenina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| FGF2 | Fator de Crescimento de Fibroblastos 2 |
| IGF | Fator de Crescimento Semelhante a Insulina |
| mRNA | RNA Mensageiro |
| miRNA | microRNA |
| PBS | Tampão salina fosfato |
| PCR | Reação em cadeia da Polimerase |
| pre-miRNA | miRNA precursor |
| pri-miRNA | miRNA primário |
| SF1 | Fator Esteroidogênico 1 |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| TAC | Tumor Adrenocortical |
| TEM | Transição Epitélio-Mesenquimal |
| TGF- β | Fator de Crescimento Transformante β |
| WNT | Wingless |
| ZD | Zona Definitiva |
| ZF | Zona Fasciculada |
| Zfetal | Zona Fetal |
| ZG | Zona glomerulosa |
| ZR | Zona Reticulada |
| ZT | Zona de Transição |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1. Glândulas Supra-Renais | 18 |
| 1.2. Tumores Adrenocorticais (TAC) | 20 |
| 1.2.1. TAC em Adultos | 20 |
| 1.2.2. TAC em Crianças | 25 |
| 1.3. Fator Transformante de Crescimento β (TGF- β) | 30 |
| 1.4. MicroRNAs e o Câncer | 33 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 39 |
| 3. HIPÓTESE | 40 |
| 4. OBJETIVOS | 41 |
| 4.1. Objetivo Geral | 41 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 41 |
| 5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL | 42 |
| 6. MATERIAL E MÉTODOS | 43 |
| 6.1. Amostras biológicas | 43 |
| 6.2. Extração de RNA e síntese de cDNA..... | 43 |
| 6.3. Linhagens celulares e condições de cultura. | 44 |
| 6.4. Avaliação da expressão de miRNAs e mRNA nas amostras e nas linhagens de TAC | 45 |
| 6.5. Inibição da expressão do miR-483-3p e aumento da expressão do miR-630 nas linhagens celulares de TAC..... | 45 |
| 6.6. Ensaio de viabilidade celular..... | 46 |
| 6.7. Ensaio de formação de colônias | 47 |
| 6.8. Ensaio de migração (<i>Wound healing</i>) | 47 |
| 6.9. Tratamento com Inibidor da via TGF- β , Sb431542 | 47 |
| 6.10. Western Blotting | 48 |
| 6.11. Análise Estatística | 48 |
| 7. RESULTADOS | 50 |
| 7.1. Expressão do miR-483-3p e miR-630 em amostras de pacientes com TAC..... | 50 |
| 7.2. Análise de sobrevida de acordo com as características clínicas da nossa coorte de pacientes pediátricos com TAC | 51 |
| 7.3. Associação da expressão do miR-483-3p e miR-630 às características clínicas dos pacientes | 54 |
| 7.4. Expressão do miR-483-3p e miR-630 na linhagem celular de TAC, H295 | 58 |
| 7.5. Modulação do miR-483-3p e miR-630 na linhagem celular H295 | 59 |

| | | |
|------------|---|------------|
| 7.6. | Efeito funcional da modulação dos miRNAs nas linhagens de TAC..... | 60 |
| 7.6.1. | Viabilidade celular | 60 |
| 7.6.2. | Capacidade clonogênica..... | 61 |
| 7.6.3. | Migração Celular..... | 61 |
| 7.7. | Genes alvos preditos e validados do miR-630 e do miR-483-3p | 63 |
| 7.8. | Correlação entre expressão gênica e expressão dos miRNAs | 64 |
| 7.9. | Expressão de genes e proteínas da via TGF- β nas linhagens celulares após a transdução.... | 65 |
| 7.10. | Ensaio de viabilidade celular e capacidade clonogênica após a inibição da via TGF- β | 67 |
| 7.11. | Expressão proteica nas linhagens transduzidas e tratadas com inibidor da via TGF- β . 69 | |
| 8. | DISCUSSÃO | 72 |
| 9. | CONCLUSÕES | 84 |
| 10. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 85 |
| 11. | APÊNDICES | 107 |
| 11.1. | Apêndice 1. Dados Clínicos Pacientes Pediátricos com TAC | 107 |
| 11.2. | Apêndice 2. Dados Clínicos Pacientes Pediátricos sem TAC..... | 110 |
| 11.3. | Apêndice 3. Tabela com sondas dos miRNAs e genes utilizados | 111 |
| 11.4. | Apêndice 4. Tabela com os anticorpos utilizados | 112 |
| 11.5. | Apêndice 5. Sobrevida Global e Livre de Eventos associadas com mutação no <i>TP53</i> e Gênero..... | 113 |
| 11.6. | Apêndice 6. Expressão miR-630 de acordo com dados clínicos dos pacientes (dados não significativos)..... | 114 |
| 11.7. | Apêndice 7. Expressão do miR-483-3p de acordo com dados clínicos dos pacientes (dados não significativos). | 115 |
| 11.8. | Apêndice 8. Ensaio de formação de colônias..... | 117 |
| 12. | ANEXOS | 120 |
| 12.1. | ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido..... | 120 |
| 12.2. | ANEXO 2 - Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP | 123 |

1. INTRODUÇÃO

1.1. Glândulas Supra-Renais

As glândulas supra-renais ou adrenais são órgãos endócrinos localizados acima dos rins, responsáveis pela síntese de hormônios essenciais para o funcionamento do organismo. Durante a gestação, essas glândulas são constituídas por uma zona definitiva (ZD), que se situa mais externamente, uma zona de transição (ZT) intermediária e uma zona fetal (ZFetal), mais internamente (Figura 1A). Os hormônios produzidos nessa fase são muito importantes para o correto desenvolvimento e função dessas glândulas, contribuindo para a maturação e sobrevivência fetal (MESIANO; JAFFE, 1997).

Após o nascimento, a glândula adrenal passa por um processo de remodelagem intensa através de processos de diferenciação, de modo que nos primeiros 6 meses após o nascimento as zonas fetais se atrofiam devido a mecanismos de apoptose; enquanto a zona definitiva e a zona de transição passam por processos de proliferação e hiperplasia, dando origem a adrenal adulta. Esse processo de diferenciação continua após o nascimento, podendo ser finalizado apenas aos 15 anos de idade (COULTER, 2004; MESIANO; JAFFE, 1997; SPENCER; MESIANO; LEE; JAFFE, 1999; SUCHESTON; CANNON, 1968).

Assim, no adulto, cada glândula é formada externamente por uma cápsula, seguida por uma região intermediária, chamada de córtex e internamente pela medula. Esta sintetiza as catecolaminas, como a epinefrina e noraepinefrina (KEMPNÁ; FLÜCK, 2008; RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004). A descrição histológica do córtex adrenal permitiu a compreensão de que ele é dividida em três zonas distintas: a Zona Glomerulosa (ZG), responsável pela produção dos mineralocorticoides (aldosterona); a Zona Fasciculada (ZF), responsável pela produção dos glicocorticoides (corticosterona e cortisol); e a Zona Reticulada (ZR), responsável pela síntese de andrógenos (DHEA e DHEA-S) (KEMPNÁ; FLÜCK, 2008; RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004) (Figura 1B e Figura 2). Estes tecidos são distintos embriologicamente e fisiologicamente e secretam hormônios que são essenciais para a vida (KEMPNÁ; FLÜCK, 2008).

Todos os hormônios produzidos por cada região tem como substrato comum, o colesterol. E a síntese de esteroides está relacionada à ação de enzimas da família P450 e à enzima 3 β -hidroxisteroide desidrogenase (3 β HSD), ou seja, a expressão diferenciada dessas enzimas em cada zona, determina quais hormônios são sintetizados e em quais quantidades (RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004). Além disso, essa expressão se altera de acordo com o estágio do desenvolvimento, como por exemplo, por meio da análise dos níveis de expressão

gênica, utilizando a técnica de *microarray*, onde comparou-se 18 amostras de adrenal fetal e 12 amostras de adrenal adulta, foi identificada uma expressão diferenciada de 69 genes envolvidos com a esteroidogênese, fatores de transcrição, fatores de crescimento, reguladores do ciclo celular, angiogênese e matriz extracelular (KEMPNÁ; FLÜCK, 2008). Esses hormônios são importantes para o metabolismo corporal, desenvolvimento sexual, puberdade e no estresse. Sendo assim, qualquer alteração na função dessas glândulas pode acarretar prejuízos graves para o organismo (KEMPNÁ; FLÜCK, 2008), ocasionando o surgimento de síndromes e doenças, como os tumores adrenocorticais.

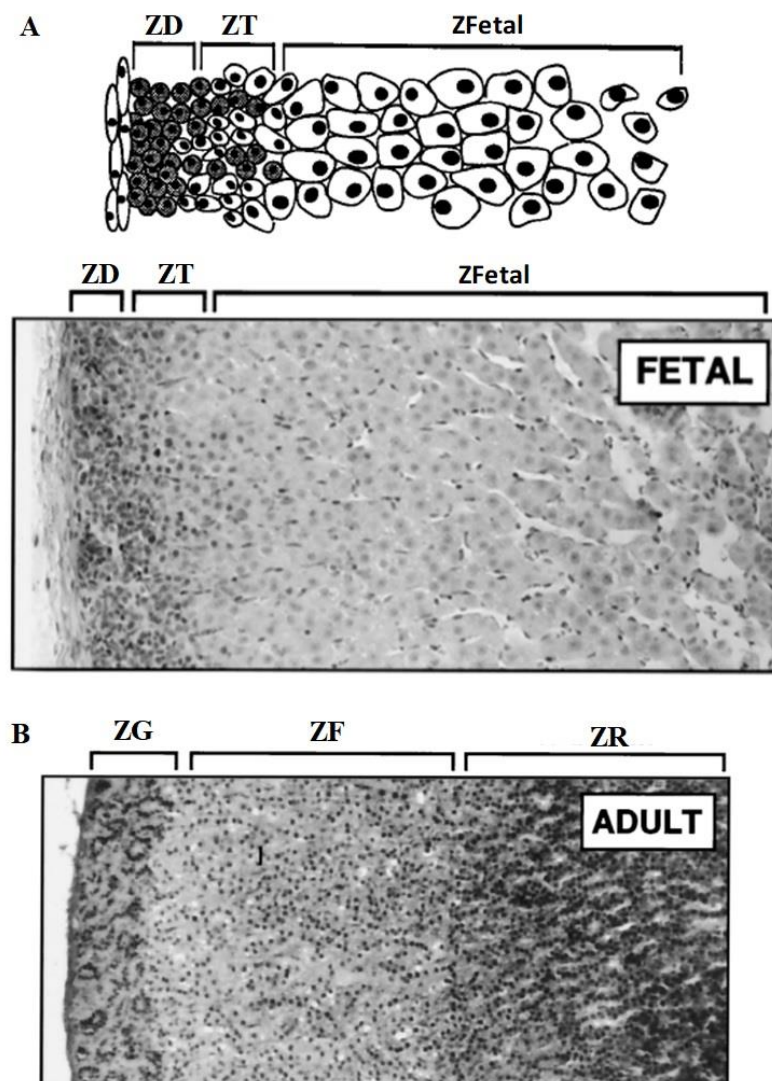


Figura 1. Morfologia da glândula adrenal fetal e adulta. (A) A adrenal fetal é composta por três zonas distintas, a Zona Definitiva (ZD), Zona de Transição (ZT) e a Zona Fetal (ZFetal); (B) que após o nascimento, passam por processos de diferenciação e dão origem à Zona Glomerulosa (ZG), Zona Fasciculada (ZF) e Zona reticulada (ZR) da glândula adulta. Adaptada de (MESIANO; JAFFE, 1997).

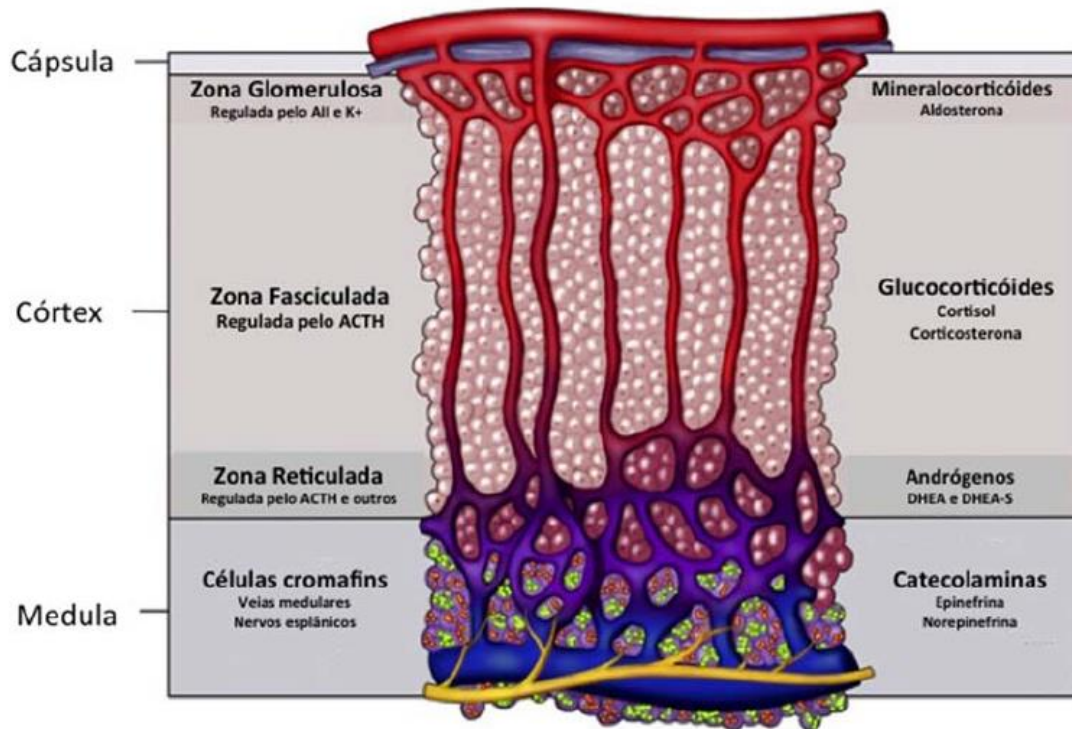


Figura 2. Representação da glândula adrenal no adulto. Destaque das regiões que compõem a glândula adrenal: Cápsula, Córtex e Medula, com as três zonas que formam o córtex adrenal e os hormônios produzidos por cada uma. ACTH: hormônio adrenocorticotrófico. **Adaptado de (WANG; RAINEY, 2012).**

1.2. Tumores Adrenocorticais (TAC)

1.2.1. TAC em Adultos

Os tumores adrenocorticais (TAC) são aqueles que acometem a região cortical das glândulas adrenais, que podem ser benignos (adenomas) ou malignos (carcinomas). Os adenomas adrenocorticais (AAC) são frequentemente detectados durante procedimentos de diagnóstico para outras doenças e na grande maioria dos casos permanecem clinicamente silenciosos, com um bom prognóstico (MANSMANN; LAU; BALK; ROTHBERG *et al.*, 2004; SONG; CHAUDHRY; MAYO-SMITH, 2008). O carcinoma adrenocortical (CAC), por sua vez, é extremamente raro, com uma incidência anual, de 0,7-2 casos por milhão de pessoas (ELSE; KIM; SABOLCH; RAYMOND *et al.*, 2014; FIORENTINI; GRISANTI; COSENTINI; ABATE *et al.*, 2019; KERKHOFS; VERHOEVEN; VAN DER ZWAN; DIELEMAN *et al.*, 2013). Esse tumor pode aparecer em qualquer idade, porém existe um pico de incidência entre os 40 e 50 anos de idade, e maior frequência em mulheres (60%) (FASSNACHT; DEKKERS; ELSE; BAUDIN *et al.*, 2018; KOSCHKER; FASSNACHT; HAHNER; WEISMANN *et al.*, 2006).

Embora a presença de metástase seja evidência absoluta de malignidade, a classificação de tumores benignos ou malignos é um grande desafio, pois ambos parecem compartilhar múltiplas aberrações genéticas (FIGUEIREDO; STRATAKIS; SANDRINI; DELACERDA *et al.*, 1999). Identificar a presença de malignidade, principalmente antes que ocorra a metástase, é de vital importância para a determinação do prognóstico dos pacientes, sobrevida global e para direcionar o tratamento (AUBERT; WACRENIER; LEROY; DEVOS *et al.*, 2002).

Grande parte dos pacientes com CAC procuram serviços de saúde por apresentarem excesso de produção hormonal (ABIVEN; COSTE; GROUSSIN; ANRACT *et al.*, 2006; ICARD; GOUDET; CHARPENAY; ANDREASSIAN *et al.*, 2001; KOSCHKER; FASSNACHT; HAHNER; WEISMANN *et al.*, 2006). Nesses casos, os tumores são chamados de funcionantes, ou seja, aqueles em que a glândula continua produzindo hormônio, sendo os sintomas da síndrome de Cushing os mais frequentes. No entanto, o avanço rápido da doença traz também outros sintomas como: atrofia muscular profunda, hipertensão e diabetes mellitus (STEWART; WALKER; HOLDER; O'HALLORAN *et al.*, 1995). Uma alta porcentagem das mulheres afetadas desenvolvem sinais e sintomas de excesso de produção de andrógenos e virilização com ou sem a síndrome de Cushing concomitante. A produção de estrógenos nos homens leva a feminilização (FASSNACHT; LIBÉ; KROISS; ALLOLIO, 2011). Já os pacientes com tumores não funcionantes, ou seja, sem produção hormonal, apresentam desconfortos abdominais, com náuseas e vômitos, e dor nas costas, causada pelo efeito do rápido crescimento da massa tumoral (FASSNACHT; LIBÉ; KROISS; ALLOLIO, 2011).

A cirurgia é a primeira forma de tratamento adotada para os pacientes em estágios menos avançados até intermediários; enquanto outras formas de terapia, como terapia molecular alvo-específica, imunoterapia, ou abordagens multidisciplinares são aplicadas em pacientes com graus mais avançados da doença, com a finalidade de melhorar o prognóstico (VARGHESE; HABRA, 2017). As diretrizes atuais recomendam a ressecção cirúrgica do tumor primário como único tratamento com potencial curativo, porém, é uma abordagem realista apenas em pacientes em estágios iniciais da doença. E mesmo assim, ocorre recorrência da doença em 30-70% dos pacientes operados (FASSNACHT; DEKKERS; ELSE; BAUDIN *et al.*, 2018).

Além disso, o mal prognóstico de pacientes com CAC também ocorre em função da maioria dos pacientes apresentar metástase ou a doença em grau muito avançado já ao diagnóstico, e nesses casos, a cirurgia não é favorável (AYALA-RAMIREZ; JASIM; FENG; EJAZ *et al.*, 2013; LEBoulLEUX; DEANDREIS; AL GHUZLAN; AUPÉRIN *et al.*, 2010; MILLER; AMMORI; GAUGER; BROOME *et al.*, 2010). O estágio da doença ao diagnóstico é muito importante e chega a ser um fator prognóstico, visto que pacientes em estágios iniciais

apresentam taxa de sobrevida em 5 anos de 60%-80%, enquanto aqueles com doença avançada, que apresentam metástase, a sobrevida cai para até 28% (FASSNACHT; DEKKERS; ELSE; BAUDIN *et al.*, 2018; FASSNACHT; JOHANSSEN; QUINKLER; BUCSKY *et al.*, 2009).

Para a maioria dos pacientes, é prescrito o uso adjuvante do agente adrenolítico mitotano, (FASSNACHT; DEKKERS; ELSE; BAUDIN *et al.*, 2018; WASZUT; SZYSZKA; DWORAKOWSKA, 2017); que após um estudo retrospectivo multicêntrico, mostrou estar associado a uma redução significativa do risco de recaída e morte (BERRUTI, 2017). Quando se trata de pacientes que apresentam metástases ou um quadro inoperável, o tratamento consiste apenas no uso de mitotano ou este combinado com etoposídeo, doxorrubicina e cisplatina (EDP-M) (BERRUTI; TERZOLO; SPERONE; PIA *et al.*, 2005; FASSNACHT; TERZOLO; ALLOLIO; BAUDIN *et al.*, 2012). Apesar do mitotano ser o único medicamento aprovado para o tratamento do CAC (TERZOLO; BAUDIN; ARDITO; KROISS *et al.*, 2013), sua farmacocinética, perfil de segurança e efeitos adversos mostram uma variabilidade individual que limitam sua eficácia (PARAGLIOLA; TORINO; PAPI; LOCANTORE *et al.*, 2018). Além disso, a maioria dos pacientes que recebem EDP-M acabam sofrendo de progressão da doença. Nesses pacientes, outra abordagem é adotada, com o uso de gemcitabina e capecitabina (SPERONE; FERRERO; DAFFARA; PRIOLA *et al.*, 2010; TERZOLO; DAFFARA; ARDITO; ZAGGIA *et al.*, 2014), mas o benefício clínico é também limitado; mostrando a importância de novas estratégias de terapia (FIORENTINI; GRISANTI; COSENTINI; ABATE *et al.*, 2019). Existem poucos dados confirmando a eficácia da radioterapia, porém, pode ser indicada de maneira complementar ao mitotano com a finalidade de reduzir os riscos de recidiva local (BERRUTI; BAUDIN; GELDERBLUM; HAAK *et al.*, 2012).

Alguns autores sugeriram alguns critérios histológicos para ajudar na classificação da doença. Weiss, em 1984, propôs uma classificação com base em alguns critérios histológicos para determinar o grau de malignidade tumoral. Os carcinomas podem ser diagnosticados pela presença de pelo menos 3 dos 9 critérios de Weiss. Três desses critérios relacionam-se a características citológicas (grau nuclear, mitoses e mitoses atípicas); três referem-se à estrutura tumoral (células claras, arquitetura difusa e necrose confluyente), e três referem-se à invasão (invasão venosa, invasão sinusoidal e infiltração capsular) (PAPOTTI; LIBÈ; DUREGON; VOLANTE *et al.*, 2011; WEISS, 1984; WEISS; MEDEIROS; VICKERY, 1989). Em 2002, foi proposta uma revisão do escore de Weiss, eliminando 4 critérios mais subjetivos e de difícil interpretação; assim, cada critério é pontuado com 1 se presente e 0 se ausente, e os tumores com escore superior ou igual a 3 são classificados como malignos (AUBERT; WACRENIER; LEROY; DEVOS *et al.*, 2002). Porém, apenas dados histológicos não são suficientes para

predizer o diagnóstico, prognóstico e tratamento; sendo importante uma classificação ou descrição molecular desses tumores.

Algumas alterações moleculares têm relevância não apenas patológica, mas também auxiliam no diagnóstico, valor prognóstico e terapia, como por exemplo, as alterações encontradas nos genes *IGF-1* (Fator de Crescimento ligado à Insulina) e *SFI* (fator esteroidogênico 1) (FASSNACHT; LIBÉ; KROISS; ALLOLIO, 2011), entre outras. A sinalização de IGF está envolvida no desenvolvimento e na manutenção da diferenciação da adrenal e estudos já mostraram um papel dessa via de sinalização em TAC (GICQUEL; BERTAGNA; GASTON; COSTE *et al.*, 2001), ou seja, a alta expressão do gene *IGF2*, é observada na maioria dos CAC e pode estar associada a síndrome de *Beckwith-Wiedemann* (ADAM; HAHNER; HARTMANN; HEINRICH *et al.*, 2010; BOULLE; LOGIÉ; GICQUEL; PERIN *et al.*, 1998; DE FRAIPONT; EL ATIFI; CHERRADI; LE MOIGNE *et al.*, 2005; GICQUEL; RAFFIN-SANSON; GASTON; BERTAGNA *et al.*, 1997; WIEDEMANN; BURGIO; ALDENHOFF; KUNZE *et al.*, 1983). Da mesma maneira, o gene *SFI* desempenha um papel importante no desenvolvimento da adrenal, pois ele regula os genes necessários para a biossíntese do cortisol e aldosterona (SCHIMMER; WHITE, 2010). Além disso, camundongos *knockout* para esse gene, morrem após o nascimento por insuficiência adrenocortical (LUO; IKEDA; PARKER, 1994; SADOVSKY; CRAWFORD; WOODSON; POLISH *et al.*, 1995) e estudos também já demonstraram uma alta expressão desse gene em TAC e que essa alta expressão é associada a um prognóstico desfavorável (SBIERA; SCHMULL; ASSIE; VOELKER *et al.*, 2010).

Outra via de sinalização importante é a Wnt, que é ativa durante o desenvolvimento embrionário, e é encontrada ainda ativa na maioria dos TAC benignos e malignos, devido a uma mutação somática que permite que o gene *CTNNB1* não seja marcado para degradação e, conseqüentemente, ocorre a transcrição dos genes alvos dessa via de sinalização (TADJINE; LAMPRON; OUADI; BOURDEAU, 2008; TISSIER; CAVARD; GROUSSIN; PERLEMOINE *et al.*, 2005). Além do fator de crescimento IGF, outros fatores de crescimento estão envolvidos com a regulação do crescimento e funcionamento normal da adrenal, como o fator de crescimento de fibroblastos (FGF2), fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) e o fator de crescimento transformante (TGF) (FEIGE; VILGRAIN; BRAND; BAILLY *et al.*, 1998; HOTTA; BAIRD, 1986).

Mutações germinativas no gene *TP53* estão presentes em famílias com Síndrome de *Li-Fraumeni*, o que confere maior susceptibilidade à diversos tipos de câncer, entre eles o CAC (HISADA; GARBER; FUNG; FRAUMENI *et al.*, 1998). Em 20-35% dos adultos com CAC

são encontradas mutações somáticas nesse mesmo gene (LIBÈ; GROUSSIN; TISSIER; ELIE *et al.*, 2007; OHGAKI; KLEIHUES; HEITZ, 1993; REINCKE; KARL; TRAVIS; MASTORAKOS *et al.*, 1994), o que parece estar associado a uma maior agressividade e progressão do tumor (LIBÈ; GROUSSIN; TISSIER; ELIE *et al.*, 2007).

Aproximadamente 5-10% dos CAC são associados a mutações germinativas e com diversas síndromes. As síndromes genéticas mais comuns são Síndrome de *Li-Fraumeni*, englobando 2-4% dos casos em adultos; Síndrome de *Lynch*, acometendo 3% dos casos; Múltiplas Neoplasias Endócrinas Tipo I, presente em 1-2% dos casos; e mais raramente Polipose Adenomatosa Familiar e a síndrome de *Beckwith-Wiedemann* (ELSE; KIM; SABOLCH; RAYMOND *et al.*, 2014; GATTA-CHERIFI; CHABRE; MURAT; NICCOLI *et al.*, 2012; PETR; ELSE, 2016; RAYMOND; ELSE; EVERETT; LONG *et al.*, 2013; RAYMOND; EVERETT; FURTADO; GUSTAFSON *et al.*, 2013).

Estudos têm sido feitos, com grandes esforços, para melhorar o tratamento e qualidade de vida dos pacientes; no entanto, o prognóstico ainda permanece limitado, visto que o CAC é uma doença muito heterogênea e abriga uma diversidade de variantes morfológicas, clínicas e genéticas, que auxiliam no valor prognóstico (VATRANO; VOLANTE; DUREGON; GIORCELLI *et al.*, 2018; ZHENG; CHERNIACK; DEWAL; MOFFITT *et al.*, 2016). Até agora, a maioria dos dados moleculares disponíveis sobre o CAC está restrita à expressão gênica, *array*-CGH ou perfil de metiloma e comparam carcinomas com o equivalente benigno, os adenomas (VATRANO; VOLANTE; DUREGON; GIORCELLI *et al.*, 2018).

Nos últimos anos, através de uma caracterização molecular de TAC foi possível a identificação de anormalidades genéticas e moleculares, com a possibilidade de novos alvos moleculares para o desenvolvimento de novas terapias. Entre elas, mutações recorrentes em genes como *ZNFR*, *CTNNB1*, *TP53* e *RBI* (ASSIÉ; LETOUZÉ; FASSNACHT; JOUINOT *et al.*, 2014; VOLANTE; BUTTIGLIERO; GRECO; BERRUTI *et al.*, 2008; ZHENG; CHERNIACK; DEWAL; MOFFITT *et al.*, 2016). Assim, mutações somáticas do gene *TP53* são detectáveis em cerca de um terço dos casos adultos (GIACOMAZZI; SELISTRE; ROSSI; ALEMAR *et al.*, 2013). Também foram encontradas mutações no gene *ZNRF3* nos carcinomas (ZHENG; CHERNIACK; DEWAL; MOFFITT *et al.*, 2016) e, da mesma forma, mutações no *CTNNB1* são detectáveis em cerca de 40% dos carcinomas, mas os adenomas também apresentam essa mutação em uma porcentagem semelhante (GAUJOUX; GRABAR; FASSNACHT; RAGAZZON *et al.*, 2011). O papel desses genes na progressão tumoral ainda é controverso e nenhuma dessas alterações demonstrou ser marcador de prognóstico ou preditivo para direcionar o tratamento, visto que a assinatura genômica do TAC é altamente

instável ao longo da progressão do tumor. (VATRANO; VOLANTE; DUREGON; GIORCELLI *et al.*, 2018). Portanto, há uma grande necessidade de maiores investigações para definir possíveis biomarcadores que possam ter um impacto positivo na clínica (VATRANO; VOLANTE; DUREGON; GIORCELLI *et al.*, 2018).

No entanto, toda essa descrição feita é particular dos tumores adultos, que são mais estudados e compreendidos atualmente. Os tumores pediátricos possuem algumas particularidades e especificações.

1.2.2. TAC em Crianças

Os TAC pediátricos são ainda mais raros, representando 0,2% de todos os tumores infantis, uma incidência mundial de 0,3 casos por milhão de crianças por ano (ELSE; KIM; SABOLCH; RAYMOND *et al.*, 2014), e apresentando um pico antes dos 5 anos de idade e outro após os 10 anos. Da mesma maneira que em adultos, atingem mais meninas do que meninos e a taxa de sobrevida global em 5 anos após o diagnóstico é melhor em crianças, ficando entre 54% e 77% (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004).

Uma exceção ocorre na região Sul/Sudeste do Brasil, que apresenta uma incidência de 3,4 a 4,2 por milhão de crianças com menos de 15 anos (RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004; SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997), ou seja, uma incidência 10-15 vezes maior. Essa alta incidência é possivelmente relacionada a uma mutação germinativa no gene *TP53*, comum nessa população. Essa mutação ocorre no éxon 10 do códon 337 (p.R337H), e causa uma substituição de uma arginina por uma histidina (RIBEIRO; SANDRINI; FIGUEIREDO; ZAMBETTI *et al.*, 2001). Estudos indicam um possível efeito fundador (PINTO; BILLERBECK; VILLARES; DOMENICE *et al.*, 2004) e foi demonstrado que o alelo mutante era de ascendência europeia caucasiana (GARRITANO; GEMIGNANI; PALMERO; OLIVIER *et al.*, 2010), ou seja, parece que as famílias brasileiras que carregam esse alelo mutante habitam locais ao longo da principal rota utilizada pelos comerciantes portugueses nos séculos XVIII e XIX, sugerindo que esse gene mutante pode ter origem portuguesa (GARRITANO; GEMIGNANI; PALMERO; OLIVIER *et al.*, 2010). Porém, alguns autores contestam essa origem, visto que a população no sul do Brasil tem origem bastante diversificada, contando com italianos, alemães e japoneses, por exemplo; hipótese que ainda não foi formalmente demonstrada (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; PASKULIN; GIACOMAZZI; ACHATZ; COSTA *et al.*, 2015).

No entanto, a penetrância dessa mutação já foi estimada em 1:10 (apenas 10-15% dos portadores desenvolveriam o tumor) (FIGUEIREDO; SANDRINI; ZAMBETTI; PEREIRA *et al.*, 2006) e parecia não estar associada ao aparecimento de outras doenças ao longo da vida (RIBEIRO; SANDRINI; FIGUEIREDO; ZAMBETTI *et al.*, 2001). Porém, sabe-se hoje que essa penetrância é ainda mais baixa, em torno de 3,4% (COSTA; GERBER; IBAÑEZ; MELANDA *et al.*, 2019; CUSTÓDIO; PARISE; KIESEL FILHO; KOMECHEN *et al.*, 2013) e que a mutação p.R337H parece estar associada a outros tipos de câncer, como câncer de mama, câncer gástrico, do sistema nervoso central (como carcinoma de plexo coróide) e sarcoma de partes moles (ACHATZ; ZAMBETTI, 2016; ASSUMPÇÃO; SEIDINGER; MASTELLARO; RIBEIRO *et al.*, 2008; CUSTODIO; TAQUES; FIGUEIREDO; GUGELMIN *et al.*, 2011; GIACOMAZZI; KOEHLER-SANTOS; PALMERO; GRAUDENZ *et al.*, 2013; SEIDINGER; MASTELLARO; PASCHOAL FORTES; GODOY ASSUMPÇÃO *et al.*, 2011). Portanto, tem sido realizada uma triagem neonatal no Sul do Brasil para a mutação p.R337H, que traz benefícios clínicos para portadores que são monitorados quanto a sinais precoces de TAC pediátricos (CUSTÓDIO; PARISE; KIESEL FILHO; KOMECHEN *et al.*, 2013).

As características clínicas mais frequentes em crianças com esse tipo tumoral incluem a virilização, com o aparecimento de características sexuais precocemente, como desenvolvimento de pelos pubianos, acne facial, alteração de voz, pelos faciais e também aceleração do crescimento (GUPTA; RIVERA; NOVOTNY; RODRIGUEZ *et al.*, 2018; MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). Aproximadamente 29% dos pacientes apresentam elevada produção de cortisol, algumas vezes com sintomas relacionados a síndrome de Cushing (GUPTA; RIVERA; NOVOTNY; RODRIGUEZ *et al.*, 2018; MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). Mais de 90% dos casos pediátricos apresentam tumores funcionantes (CIFTCI; SENOCAK; TANYEL; BÜYÜKPAMUKÇU, 2001), o que auxilia na avaliação clínica. Para os tumores não funcionantes, o tumor aparece em exames de ultrassom para investigar a razão do aumento do volume abdominal e de dores nessa região (RIBEIRO; PINTO; ZAMBETTI; RODRIGUEZ-GALINDO, 2012).

O tratamento utilizado para os pacientes pediátricos é o mesmo já testado em adultos, ou seja, uma combinação entre mitotano, cisplatina, etoposídeo e doxorrubicina (BERRUTI; TERZOLO; PIA; ANGELI *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-GALINDO; FIGUEIREDO; ZAMBETTI; RIBEIRO, 2005; ZANCANELLA; PIANOVSKI; OLIVEIRA; FERMAN *et al.*, 2006). A ressecção completa do tumor também é recomendada como único tratamento eficaz,

evidenciando uma chance de cura de 80% para os pacientes com tumores pequenos (MASTELLARO; RIBEIRO; OLIVEIRA-FILHO; SEIDINGER *et al.*, 2018). Ainda assim, 30% a 50% dos pacientes com TAC apresentam recidivas locais ou distantes, por isso, quanto mais cedo o diagnóstico, maior a chance de cura, visto que casos avançados são altamente agressivos e com alta mortalidade (JOHNSON; GRECO, 1986; MASTELLARO; RIBEIRO; OLIVEIRA-FILHO; SEIDINGER *et al.*, 2018).

A radioterapia não é recomendada pois, deve-se considerar que a maioria das crianças com TAC apresenta mutações germinativas no *TP53* que predispõem ao câncer. Portanto, o tratamento com radiação nessas crianças pode aumentar a incidência de tumores secundários (BERRUTI; BAUDIN; GELDERBLUM; HAAK *et al.*, 2012; RIBEIRO; MICHALKIEWICZ; FIGUEIREDO; DELACERDA *et al.*, 2000). Os principais locais de metástase são pulmão, fígado, linfonodos e trato gastrointestinal, em ordem decrescente de frequência (BERGADÁ; VENARA; MAGLIO; CIACCIO *et al.*, 1996; CHUDLER; KAY, 1989; RIBEIRO; SANDRINI NETO; SCHELL; LACERDA *et al.*, 1990). Investigações frequentes de imagem e avaliação endócrina são de extrema importância para detectar recorrência da doença durante o seguimento a longo prazo desses pacientes (CIFTCI; SENOCAK; TANYEL; BÜYÜKPAMUKÇU, 2001). Outros fatores prognósticos incluem taxa de mitose, peso e tamanho tumoral e presença de metástase (KLEIN; TURNER; GRAY; YU *et al.*, 2011). Há uma sobreposição considerável nas características clínicas e histológicas entre os tumores malignos e benignos, devido à sua raridade e heterogeneidade, existindo evidências limitadas sobre quais critérios histológicos adotar para diferenciá-los (GUPTA; RIVERA; NOVOTNY; RODRIGUEZ *et al.*, 2018), visto que é difícil prever o comportamento de tumores localizados através de imagem ou histopatologia (KLEIN; TURNER; GRAY; YU *et al.*, 2011).

Crianças com menos de 5 anos tendem a ter características clínicas mais favoráveis quando comparadas com crianças mais velhas que apresentam tumores com as mesmas características histopatológicas (DEHNER, 2003; MCATEER; HUACO; GOW, 2013; WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003); ou seja, crianças mais velhas têm maior tendência a apresentar metástases, pior sobrevida global e maior probabilidade de apresentarem tumores maiores (MCATEER; HUACO; GOW, 2013).

A classificação histológica de Weiss não é recomendada para crianças (NAKAMURA; YAMAZAKI; FELIZOLA; ISE *et al.*, 2015). Os tumores adrenocorticais pediátricos com prognóstico desfavorável, baseado somente em critérios histopatológicos, apresentam frequentemente evolução clínica favorável (GUPTA; RIVERA; NOVOTNY; RODRIGUEZ *et al.*, 2018; WAJCHENBERG; ALBERGARIA PEREIRA; MEDONCA; LATRONICO *et al.*,

2000; WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003). Portanto, foi observado que o estadiamento tumoral é o fator prognóstico mais relevante para crianças com TAC (TUCCI; MARTINS; SUAID; COLOGNA *et al.*, 2005), sendo determinado no momento de diagnóstico e relacionando a extensão da doença, tamanho e peso do tumor, sendo I e II os estadiamentos com prognóstico mais favorável e III e IV, aqueles com prognóstico desfavorável (Tabela 1) (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997). Essa classificação ajuda na definição do prognóstico e no direcionamento para uma terapia adequada, visto que somente pacientes com estadiamento I e II são curáveis com cirurgia e que, aproximadamente 90% dos pacientes classificados em estadio III, mesmo com a ressecção completa do tumor, têm recorrência e doença metastática dentro dos primeiros 5 anos após a cirurgia (ALLOLIO; FASSNACHT, 2006; FASSNACHT; ALLOLIO, 2009; MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004).

Além disso, na década de 1990, foi proposta a criação de um registro pediátrico de TAC, para definir melhor as manifestações clínicas, de prognóstico, tratamento e desfecho clínico dos pacientes pediátricos. Assim, foram registrados 254 casos entre 1990 e 2001, dos quais 228 eram carcinomas, com idade média dos pacientes de 3,2 anos. A maioria dos pacientes apresentavam sintomas de virilização, 75% foram classificados em estádios I e II e, até o momento do relato (2004), 38% dos pacientes foram a óbito. A SLE foi estimada em 54%, com um melhor prognóstico sendo associado com estadio I da doença, idade menor que 3 anos e presença apenas de virilização (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). Apesar desses registros, não foi possível ainda estabelecer recomendações sobre o tratamento, porque o número de pacientes tratados e avaliados foi considerado pequeno (RIBEIRO; PINTO; ZAMBETTI; RODRIGUEZ-GALINDO, 2012).

Tabela 1. Estadiamento proposto para tumores adrenocorticais em crianças.
(Modificado de (SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997).

| Estadio | Definição |
|---------|--|
| I | Tumores pequenos (<200 cm ³ ou <100g), completamente removidos, com níveis hormonais normalizados após a cirurgia e ausência de metástase. |
| II | Tumores maiores (≥200 cm ³ ou ≥100g), resíduos microscópicos ou disseminação do tumor durante a cirurgia e níveis hormonais anormais após a cirurgia. |
| III | Tumores inoperáveis ou doença residual após a cirurgia |
| IV | Doença metastática. |

Assim, vemos que a classificação por estadiamento também não é completa na determinação do prognóstico, deixando algumas lacunas na determinação da progressão da doença. A caracterização genética dos tumores pediátricos é ainda mais precária do que em adultos. Alguns dados provenientes de pacientes brasileiros sugerem o envolvimento das vias IGF, WNT e de apoptose nos TAC pediátricos (LEAL; MERMEJO; RAMALHO; MARTINELLI *et al.*, 2011; LOREA; MORENO; BORGES; MARTINELLI *et al.*, 2012; PEIXOTO LIRA; FEDATTO; MARCO ANTONIO; LEAL *et al.*, 2016); além do envolvimento do complexo de histocompatibilidade humana (HLA), especialmente os de classe II, no comportamento biológico de pacientes pediátricos de TAC (LEITE; LIRA; FEDATTO; ANTONINI *et al.*, 2014). E por fim, foi demonstrado que pacientes brasileiros pediátricos com TAC apresentam alta expressão de *BUB1* e *BUBR1*, que são genes relacionados a *checkpoint* mitótico, e também, apresentam uma associação entre a maior expressão de *AURKA* e *AURKB* (relacionados ao controle do ciclo celular) com um pior desfecho clínicos dos pacientes (BORGES; MORENO; MARTINELLI; ANTONINI *et al.*, 2013).

O gene *IGF2*, da mesma forma que nos carcinomas adultos, é descrito como altamente expresso nos TAC pediátricos (LIMA; LERARIO; ALENCAR; BRITO *et al.*, 2011; PEIXOTO LIRA; FEDATTO; MARCO ANTONIO; LEAL *et al.*, 2016); assim como o gene *IGF1R*, cuja hiperexpressão está associada com um pior prognóstico, como metástase e recorrência do tumor (ALMEIDA; FRAGOSO; LOTFI; SANTOS *et al.*, 2008; PEIXOTO LIRA; FEDATTO; MARCO ANTONIO; LEAL *et al.*, 2016). Mutações no gene *CTNNB1* são comumente identificadas em TAC pediátricos (PINTO; CHEN; EASTON; FINKELSTEIN *et al.*, 2015). Leal e colaboradores, em 2011, demonstraram que o gene *CTNNB1* aparece mutado em 6% dos pacientes pediátricos avaliados, assim como ocorre uma desregulação na expressão de genes relacionados a via de sinalização WNT/ β -catenina na maioria desses pacientes (LEAL; MERMEJO; RAMALHO; MARTINELLI *et al.*, 2011). Também já foi proposto que a inativação da via Wnt/ β -catenina pode auxiliar no tratamento do TAC infantil (GUNDGURTHI; KHARB; DUTTA; GARG *et al.*, 2012). Além disso, estudos de coortes diferentes indicam uma associação contraditória entre mutações no gene *CTNNB1* e a mutação p.R337H, do gene *TP53*. Leal e colaboradores em 2011 estudaram 62 pacientes pediátricos com TAC, dos quais 4 apresentavam mutação no *CTNNB1* e a mutação p.R337H (LEAL; MERMEJO; RAMALHO; MARTINELLI *et al.*, 2011); enquanto Pinto e colaboradores em 2015 estudaram 37 pacientes pediátricos com TAC e observaram que os 3 pacientes que apresentavam mutações no *CTNNB1*, não apresentavam a mutação p.R337H, sugerindo que

elas parecem ser mutuamente exclusivas (PINTO; CHEN; EASTON; FINKELSTEIN *et al.*, 2015).

Da mesma maneira que em adultos, o gene *SFI*, também se encontra hiperexpresso em TAC pediátrico (FIGUEIREDO; CAVALLI; PIANOVSKI; LALLI *et al.*, 2005; PIANOVSKI; CAVALLI; FIGUEIREDO; SANTOS *et al.*, 2006) e esses tumores pediátricos também são frequentemente associados com a síndrome de *Beckwith-Wiedemann* (com alterações no *IGF2*) (PAPOTTI; DUREGON; VOLANTE; MCNICOL, 2014) e com a síndrome de *Li-Fraumeni* (associada a mutações no *TP53*) (GIACOMAZZI; SELISTRE; ROSSI; ALEMAR *et al.*, 2013). A maioria das crianças diagnosticadas com TAC (50-80%) tem mutação no *TP53*, mas apenas 3 a 10% das crianças com a síndrome de *Li-Fraumeni* vão desenvolver tumor (WASSERMAN; NOVOKMET; EICHLER-JONSSON; RIBEIRO *et al.*, 2015). A proteína codificada pelo gene *TP53* é crucial para preservar a integridade genômica, e mutações nesse gene promovem a queda da atividade dessa proteína e, conseqüentemente, aumentam a probabilidade do aparecimento de tumores (ZAMBETTI, 2007).

Outra via envolvida no correto funcionamento e maturação da glândula adrenal e que quando desregulada parece contribuir para o surgimento dos TAC é a via de sinalização TGF- β , que é composta por uma ampla família de proteínas de fatores de crescimento (MASSAGUÉ, 1990), cujo efeito é variável e parece ser dependente do tipo celular. De uma maneira geral, a via TGF- β estimula a proliferação de células mesenquimais e inibe a proliferação de células epiteliais (ROBERTS; FLANDERS; KONDAIAH; THOMPSON *et al.*, 1988), além de modular a diferenciação celular e estar relacionada com a produção hormonal de células esteroidais (MESIANO; JAFFE, 1997).

1.3.Fator Transformante de Crescimento β (TGF- β)

Na década de 1980, foi descoberto que um único fator, o TGF- β , era responsável por mediar inúmeros processos celulares como proliferação celular, diferenciação, crescimento celular, atividade imunossupressora, morfogênese, entre outros (MASSAGUÉ, 1990), o que é possível pois o TGF- β representa uma grande família com moléculas que desempenham diversas atividades dentro da célula (MASSAGUÉ, 1987). O TGF- β é expresso em praticamente todas as células humanas e desempenha um importante papel no desenvolvimento normal e homeostase. Existem três isoformas, TGF- β 1, TGF- β 2 e TGF- β 3, que são ligantes com uma atividade biológica semelhante e muito importantes em processos como proliferação celular, migração, diferenciação e apoptose (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010; MASSAGUÉ, 2008). A expressão de TGF- β é ativa durante o desenvolvimento embrionário e também na fase

adulta de ratos, e foi possível identificar sua expressão em pelo menos 12 tecidos ou órgãos de ratos adultos, entre eles o córtex adrenal (HEINE; MUNOZ; FLANDERS; ELLINGSWORTH *et al.*, 1987; RAPPOLEE; BRENNER; SCHULTZ; MARK *et al.*, 1988; THOMPSON; FLANDERS; SMITH; ELLINGSWORTH *et al.*, 1989).

A via de sinalização é ativada quando um dos ligantes recruta e se liga ao receptor de membrana TGFBR2, que é responsável por recrutar e fosforilar o TGFBR1. Este complexo ativo, por sua vez, fosforila SMAD2 e SMAD3, que recrutam SMAD4, translocando para o núcleo, e regulando fatores de transcrição responsáveis pela expressão de diversos genes (HATA; CHEN, 2016; HELDIN; MOUSTAKAS, 2012; MIYAZONO, 2000; MIYAZONO; TEN DIJKE; HELDIN, 2000), como *p15*, *p21* e *p27* (DATTO; YU; WANG, 1995; HANNON; BEACH, 1994; POLYAK; KATO; SOLOMON; SHERR *et al.*, 1994) (Figura 3). Muitos fatores de transcrição que fazem parte da ativação da transcrição gênica por essa via são tecido-específicos e, portanto, regulam a transcrição de acordo com o contexto celular (THILLAINADESAN; CHITILIAN; ISOVIC; ABLACK *et al.*, 2012).

No entanto, de acordo com as proteínas que são recrutadas pela ativação dos receptores, pode haver ativação da via não canônica, que é responsável por estimular inúmeras quinases, como MAPKs, ERK, P38, JNK (MU; GUDEY; LANDSTRÖM, 2012). Um mecanismo interessante, é que um dos genes transcritos quando a via é ativada, é o *Smad7*, conhecido por inibir a ativação do complexo de proteínas Smads, através da inibição da fosforilação do TGFBR1 (MORIKAWA; DERYNCK; MIYAZONO, 2016).

Avaliando a interação dessas proteínas com o desenvolvimento da adrenal fetal, foi observado que TGF- β inibe a proliferação celular da Zona Fetal e Zona Definitiva (PARKER; STANKOVIC; HARLIN; CARDEN, 1992; RIOPEL; BRANCHAUD; GOODYER; ADKAR *et al.*, 1989; SPENCER; RABINOVICI; MESIANO; GOLDSMITH *et al.*, 1992). Além disso, a ação dessas proteínas foi relacionada a menor produção e expressão de cortisol e enzimas esteroideogênicas da família do P450 na Zona Fetal e Zona Definitiva (STANKOVIC; DION; PARKER, 1994), indicando uma possível regulação negativa da via TGF- β na adrenal fetal.

Essa via é conhecida por apresentar um paradigma, pois provoca múltiplas respostas celulares, incluindo respostas opostas, dependendo das condições celulares, (MASSAGUÉ; KELLY; MOTTOLA, 1985; ROBERTS; ANZANO; WAKEFIELD; ROCHE *et al.*, 1985; TUCKER; SHIPLEY; MOSES; HOLLEY, 1984), fenômeno conhecido como Paradoxo do TGF- β (MORRISON; PARVANI; SCHIEMANN, 2013). Devido a isso, desempenha um importante papel no câncer, tendo atividades de supressor e promotor tumoral (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010; MASSAGUÉ, 2008). Por participar de tantos processos celulares

importantes, fica claro perceber que qualquer desregulação no seu funcionamento, pode acarretar prejuízos para o organismo, como o crescimento celular desenfreado causado pela falta de atividade inibidora do crescimento do TGF- β . Essa perda de atividade pode ser causada por erros na expressão gênica ou na ativação de TGF- β , assim como em problemas nos receptores ou moléculas a níveis pós-receptores (MASSAGUÉ, 1990), como por exemplo, mutações e deleções em genes como *TGFBR2* e *SMAD4*, que já foram descritas em alguns tipos tumorais, como câncer de cólon e câncer de pâncreas (HAHN; SCHUTTE; HOQUE; MOSKALUK *et al.*, 1996; MARKOWITZ; WANG; MYEROFF; PARSONS *et al.*, 1995).

Costuma-se ser aceito que a via TGF- β age como supressora tumoral em células normais, mas quando o microambiente é tumoral, ela tem papel de promoção do câncer (VANDER ARK; CAO; LI, 2018). Células tumorais podem apresentar aumento da expressão de *TGF β 1*, quando comparadas com tecidos normais. Além disso, elevada expressão de componentes da via TGF- β pode ser correlacionada com progressão tumoral e pior prognóstico, indicando um papel pró-oncogênico da via TGF- β em estágios mais avançados. Evidências mostram que o aumento da expressão de genes da via TGF- β pelas células tumorais promove progressão tumoral, estimulando a transição epitélio-mesenquimal (TEM), o que contribui para a migração, invasão e sobrevivência das células tumorais durante estágios mais avançados (LABELLE; BEGUM; HYNES, 2011).

Mutações ou deleções de genes pertencentes à via ocorrem com frequência em uma variedade de tumores, como câncer colorretal, câncer de cólon, câncer gástrico, gliomas, entre outros (DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; MASSAGUÉ, 2008). E estudos têm concentrado esforços para entender a função dessa via em cânceres sem inativações genéticas de Smads ou receptores da via (FENG; LIANG; LIANG; ZHAI *et al.*, 2002; WANG; LONG; DAI; LIANG *et al.*, 2008), sugerindo que a ativação de oncogenes pode suprimir a resposta inibidora de crescimento desencadeada pela via TGF- β (GU; FENG, 2018). Portanto, estudos mais específicos e abrangentes devem ser realizados, levando em consideração que essa via age de diferentes maneiras de acordo com o tipo celular em questão, devendo ser compreendida em cada caso, separadamente.

Além de regular a expressão de diversos genes que codificam proteínas, a via TGF- β também é responsável por regular a expressão de RNAs não codificadores de proteínas, como os microRNAs (miRNAs) (BLAHNA; HATA, 2013). Entre eles, aqueles pertencentes a família do miR-200 e miR-205 aparecem com a expressão diminuída em células submetidas a TEM, em resposta ao TGF- β (GREGORY; BERT; PATERSON; BARRY *et al.*, 2008; PARK; GAUR; LENGYEL; PETER, 2008). Além disso, a via TGF pode estar relacionada à regulação

do processamento dos miRNAs, através da interação de proteínas Smads com componentes de DROSHA, promovendo o processamento do miRNA primário (DAVIS; HILYARD; LAGNA; HATA, 2008).

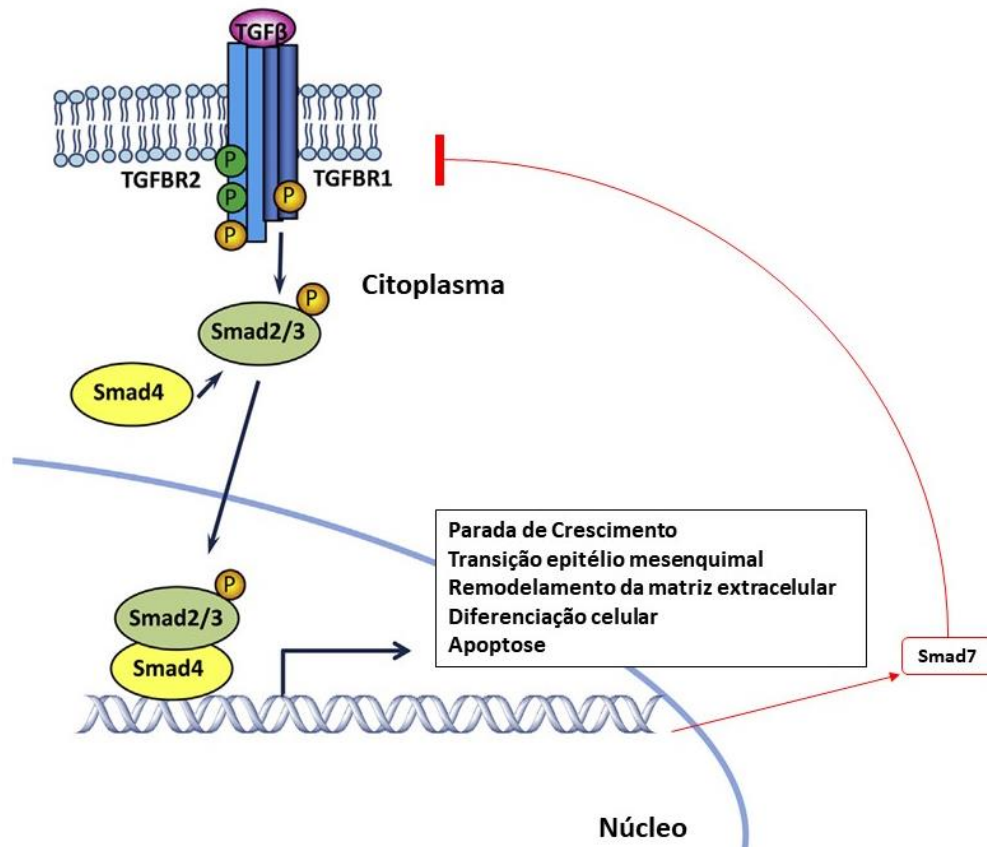


Figura 3. Via de sinalização canônica TGF-β. A sinalização inicia quando um dos ligantes (TGF-β1, TGF-β2 e TGF-β3) se liga e ativa o TGFBR2, que é responsável por fosforilar o TGFBR1. Este por sua vez, ativa Smad 2/3 e recruta Smad4, que formam um complexo e translocam para o núcleo, permitindo a transcrição de genes alvos. **Adaptado de (VANDER ARK; CAO; LI, 2018).**

1.4. MicroRNAs e o Câncer

Em mamíferos, os miRNAs foram descobertos há mais de uma década como uma classe abundante de pequenos RNAs que não codificam proteínas. Possuem 18-24 nucleotídeos de comprimento e regulam a expressão gênica através da hibridização com sequências alvos de RNA mensageiro (mRNA) (AMBROS, 2004; WANG; CHEN; SEN, 2016); e segundo a última versão do miRBase (Release 22, outubro de 2018), mais de 2.500 sequências de miRNAs foram identificadas no genoma humano (ALLES; FEHLMANN; FISCHER; BACKES *et al.*, 2019; KOZOMARA; BIRGAOANU; GRIFFITHS-JONES, 2019), ou seja, existe uma gama de moléculas no nosso organismo desempenhando funções que ainda não conhecemos.

Os miRNAs são sintetizados no núcleo, através da ação de enzimas, como a RNA polimerase II, que transcreve pequenas regiões de RNA em um miRNA primário (pri-miRNA),

que possui uma estrutura de *hairpin*. O pri-miRNA é clivado por uma RNase III, a Drosha, para produzir o miRNA precursor (pre-miRNA) (HAN; LEE; YEOM; KIM *et al.*, 2004). Após isso, o pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma, pela Exportina 5. Uma vez no citoplasma, a enzima Dicer cliva o pre-miRNA para formar um miRNA maduro de cadeia dupla. Uma das cadeias será a fita guia, que será incorporada no complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC). Este complexo é responsável por guiar os miRNAs maduros para seus mRNAs alvos, levando a sua degradação ou repressão da tradução desses mRNAs (GEBERT; MACRAE, 2019; HA; KIM, 2014; HAN; LEE; YEOM; KIM *et al.*, 2004; LIU; CARMELL; RIVAS; MARSDEN *et al.*, 2004; MACFARLANE; MURPHY, 2010) (Figura 4).

Sabe-se que mais de 60% dos genes que codificam proteínas contêm pelo menos um sítio de ligação aos miRNAs, podendo-se afirmar que a maioria dos genes que codificam proteínas pode estar sob o controle dessas pequenas moléculas (FRIEDMAN; FARH; BURGE; BARTEL, 2009). Muitos miRNAs apresentam um padrão de expressão tecido-específico, sugerido que essas moléculas desempenham um papel crítico no desenvolvimento, função e manutenção dos tecidos e órgãos. O mesmo miRNA pode controlar centenas de genes, portanto, essas moléculas podem regular diversos mecanismos biológicos como controlar o ciclo celular, apoptose, proliferação celular, diferenciação, migração e invasão (CHERRADI, 2015). Portanto, qualquer alteração no nível de expressão dos miRNAs tem efeitos significativos na saúde humana e no desenvolvimento de doenças, como doenças neurológicas (Shah, Bristow e Port, 2017), distúrbios cardiovasculares (Mellis & Caporali, 2017) e o câncer (M. Teng *et al.*, 2017).

Diversos estudos têm demonstrado que os perfis de expressão de miRNAs se relacionam com doenças malignas específicas (LIN; GREGORY, 2015) e que sua desregulação está envolvida nos comportamentos biológicos do câncer (CAO; JIANG; TANG; LIANG, 2017), visto que podem levar a inibição ou promover a expressão de muitos genes relacionados ao desenvolvimento de tumores (OLIVETO; MANCINO; MANFRINI; BIFFO, 2017).

Níveis anormais de miRNAs em tumores tem sérias consequências patogênicas, ou seja, os miRNAs que estão com os níveis de expressão aumentados nos tumores, contribuem para a oncogênese ao regular genes supressores tumorais; enquanto aqueles miRNAs que estão com os níveis de expressão diminuídos, contribuem para a expressão dos oncogenes. Sendo assim, os miRNAs podem funcionar como supressores tumorais ou oncogenes dependendo do microambiente, que fornece uma gama diferente de genes alvos disponíveis (CHERRADI, 2015; SVORONOS; ENGELMAN; SLACK, 2016).

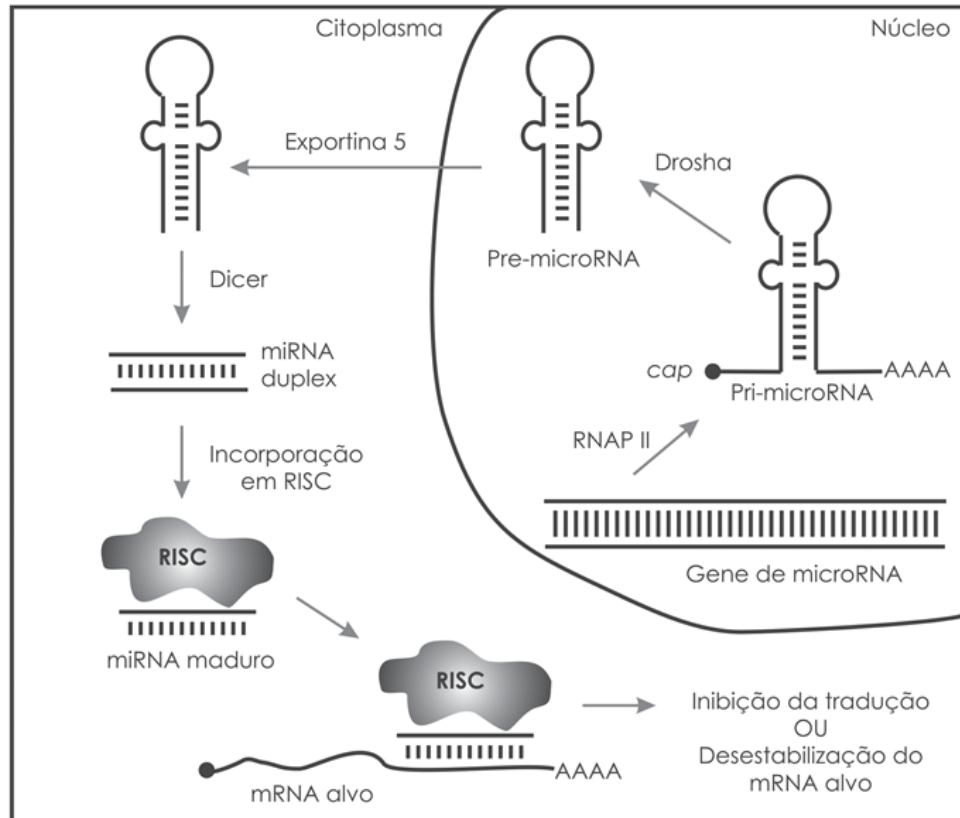


Figura 4. Biogênese dos microRNAs. Os genes dos miRNAs são transcritos no núcleo pela RNA Polimerase II (RNAP II), gerando os miRNAs primários (Pri-miRNAs). Estes possuem uma cauda poli-A em uma extremidade enquanto na outra apresentam cap. Uma outra enzima denominada Drosha, cliva o pri-miRNA, retirando essas duas caudas, e formando o miRNA precursor (Pre-miRNA). Este, com o auxílio de uma enzima denominada Exportina 5, é transportado para o citoplasma onde será processado pela Dicer, para se tornar um duplex de miRNA. Uma dessas fitas do duplex é incorporada no complexo RISC, o qual vai interagir com o mRNA-alvo por complementariedade total ou parcial, mediando a inibição da tradução ou desestabilização desse mRNA-alvo (PEREIRA; CORRÊA, 2017).

O primeiro relato de alteração na expressão de miRNAs em câncer foi feito em 2002 em estudos de leucemia linfóide aguda (CALIN; DUMITRU; SHIMIZU; BICHI *et al.*, 2002). Em seguida, foi realizada a primeira pesquisa sistemática na qual foi evidenciado que 50% dos miRNAs estudados estavam presentes em regiões ligadas ao câncer de pulmão, de mama, de ovário, cólon, gástrico, leucemias e linfomas, entre outros (CALIN; SEVIGNANI; DUMITRU; HYSLOP *et al.*, 2004; SEVIGNANI; CALIN; SIRACUSA; CROCE, 2006). A partir desses estudos, muitos outros se iniciaram para identificar possíveis miRNAs que estivessem com sua expressão alterada em tecidos tumorais, podendo contribuir para a progressão da doença. Um grande número de miRNAs já conhecidos estão localizados em regiões genômicas que estão relacionadas ao câncer (CALIN; SEVIGNANI; DUMITRU; HYSLOP *et al.*, 2004) e podem levar à identificação de subgrupos de tumores de pior prognóstico com alterações moleculares distintas (CHERRADI, 2015).

Estudos já indicam que essas moléculas têm sido extensivamente associadas com a progressão dos TAC (HASSAN; ZHAO; SIDHU, 2016), ou seja, a expressão anormal dos miRNAs pode estar associada com características clínicas e patológicas nesse tumor (NAKAMURA; YAMAZAKI; FELIZOLA; ISE *et al.*, 2015). No entanto, a compreensão dos miRNAs na patogênese dessa doença ainda é pouco estudada (CHERRADI, 2015).

Nesse contexto, foi em 2009 que começaram a surgir os primeiros estudos de identificação de miRNAs diferencialmente expressos nesses tumores. Através da técnica de PCR *array*, 22 miRNAs se mostraram diferencialmente expressos entre amostras de pacientes adultos diagnosticados com carcinomas, adenomas ou amostras de adrenais não neoplásicas, entre eles estão os miRNAs miR-184, miR-210, miR-214, miR-375, miR-503 e miR-511 (TÖMBÖL; SZABÓ; MOLNÁR; WIENER *et al.*, 2009). Outro estudo, identificou 14 miRNAs altamente expressos e nove miRNAs com a expressão diminuída entre amostras de pacientes adultos diagnosticados com carcinomas ou adenomas, entre eles, o miR-195 foi descrito como um indicativo de pior prognóstico entre os carcinomas devido a sua baixa expressão nessas amostras (SOON; TACON; GILL; BAMBACH *et al.*, 2009). O miR-335 e o miR-7 também foram relatados com uma expressão reduzida em carcinomas quando comparados a tecidos não tumorais do córtex adrenal (SOON; TACON; GILL; BAMBACH *et al.*, 2009).

A partir disso, estudos começaram a identificar várias alterações na expressão de miRNAs em amostras de TAC adultos que poderiam estar associadas a um pior prognóstico, como por exemplo a hipoexpressão do miR-125b, miR-100, miR-195 (PATTERSON; HOLLOWAY; WENG; FOJO *et al.*, 2011); miR-139-3p, miR-675, miR-335 (SCHMITZ; HELWIG; BERTRAM; SHEU *et al.*, 2011); miR-497 e miR-195 (ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011); miR-335 e miR-195 (CHABRE; LIBÉ; ASSIE; BARREAU *et al.*, 2013) em carcinomas em relação aos adenomas. Outros miRNAs foram identificados com expressão aumentada nos carcinomas, como o miR-503, miR-210, miR-542-5p, miR320a, miR-93, miR-148b (CHABRE; LIBÉ; ASSIE; BARREAU *et al.*, 2013). Além disso, o miR-139-5p e o miR-376a parecem identificar pacientes que tem recidiva e os que não tem (CHABRE; LIBÉ; ASSIE; BARREAU *et al.*, 2013). O miR-21 e miR-210 também foram encontrados hiperexpressos em carcinomas; e a hiperexpressão do miR-503, miR-1202 e miR-1275 foi associada com pior sobrevida dos pacientes com CAC (ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011).

Em 2014, foi descrito que o miR-34b-5p, miR-410, miR-503, miR-506-3p, miR-506-5p, miR-508-3p e miR-510 estão com a expressão aumentada em carcinomas em relação à amostras não neoplásicas de adrenal; enquanto o miR-511, miR-214-3p, miR-497 e miR-195 apresentam

expressão reduzida (ASSIÉ; LETOUZÉ; FASSNACHT; JOUINOT *et al.*, 2014). Feimesser e colaboradores encontraram miRNAs diferencialmente expressos em carcinomas, como os outros autores já tinham descrito anteriormente, no entanto, realizaram a hiperexpressão dos miRNAs miR-195 e miR-497 na linhagem celular de CAC, H295R, e observaram diminuição no crescimento celular e indução de apoptose (FEINMESSER; BENBASSAT; MEIRI; BENJAMIN *et al.*, 2015). O miR-7, é considerado um supressor tumoral, visto que quando restaurada sua expressão em linhagem tumoral de adrenal, houve redução da proliferação celular e indução da parada do ciclo celular em G1. Da mesma forma, ensaios *in vivo* demonstraram que a restauração do miR-7 promoveu inibição do crescimento tumoral (GLOVER; ZHAO; GILL; WEISS *et al.*, 2015).

Koperski e colaboradores identificaram um grupo de miRNAs que, além de apresentarem uma expressão diferenciada entre carcinomas, adenomas e tecido normal, podem ser utilizados como marcadores de malignidade. São eles: miR-503-5p, miR-450a-5p, miR-210 e o miR-421 (KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017). E o miR-431 demonstrou uma baixa expressão em pacientes de pior prognóstico e que são resistentes ao tratamento. Dessa forma, a restauração desse miRNA em linhagem celular de CAC permitiu uma melhor resposta celular ao tratamento com mitotano e doxorubicina (KWOK; ZHAO; GLOVER; GILL *et al.*, 2019).

Tem sido estimado que a transcrição de mais de 30% de mRNAs é regulada pelos miRNAs. Assim, genes da via TGF- β não seriam diferentes; a expressão de ligantes, receptores e Smads também está sob o controle de miRNAs (BLAHNA; HATA, 2012). A desregulação da expressão de miRNAs pode, inclusive, promover uma atividade descontrolada da sinalização da via TGF- β e contribuir para inúmeras patologias, como a tumorigênese (BLAHNA; HATA, 2012). Por fim, os miRNAs cuja expressão é regulada pela via TGF- β geralmente tem como alvo mRNAs que codificam mediadores dessa mesma via, indicando um ciclo de *feedback* regulatório entre os miRNAs e os genes da via TGF- β (HATA; CHEN, 2016).

Apesar disso, os estudos para identificar miRNAs diferencialmente expressos em pacientes pediátricos são raros. Atualmente, somente um estudo identificou miRNAs diferencialmente expressos em 25 amostras de TAC pediátricos em relação a 5 amostras não neoplásicas, sendo que a maioria se mostrou hipoexpresso nos tumores em relação as amostras não tumorais, entre eles o miR-195, o miR-214, o miR-375 e os miR-99 e miR-100, que regulam a expressão de *mTOR* e *IGF1R*. Já o miR-503 apresentou expressão elevada nas amostras tumorais em relação às não tumorais. Nenhum dos miRNAs avaliados foi capaz de discriminar os pacientes com recidiva e os sem recidiva (DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010).

Sendo assim, novos estudos são necessários para identificar miRNAs que possam ser utilizados como marcadores moleculares de pior prognóstico em pacientes pediátricos. Um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa através da técnica de *microarray*, identificou diversos miRNAs diferencialmente expressos entre 37 amostras de pacientes pediátricos com TAC e 9 tecidos adrenais não neoplásicos também pediátricos (FEDATTO, 2014). Entre eles, o miR-483-3p (*Fold Change*: 4,9) e o miR-630 (*Fold Change*: - 4,3) apresentaram como alvos preditos e validados, genes pertencentes à via TGF- β , após uma busca realizada no banco de dados miRWalk 2.0. Entre eles estão *TGFBR1*, *TGFBR2*, *SMAD2*, *SMAD3*, *SMAD4*, entre outros (DWEET; GRETZ, 2015; DWEET; STICHT; GRETZ, 2013; DWEET; STICHT; PANDEY; GRETZ, 2011). De acordo com essa análise, esses dois miRNAs se tornaram o foco do estudo como possíveis marcadores de prognóstico, agindo através da regulação dos genes alvos pertencentes à via TGF- β .

2. JUSTIFICATIVA

Os TAC têm sido alvos de investigação na tentativa de melhor caracterizar sua genômica e consequentemente suas implicações na progressão e tratamento para este tipo de tumor. Estudos têm buscado marcadores moleculares que se relacionem com o diagnóstico e/ou prognóstico dos pacientes, visando buscar um tratamento mais eficaz e com menos efeitos colaterais. Diversos estudos comparam a expressão diferencial de miRNAs em tecidos tumorais e sua contraparte não neoplásica, buscando melhor compreender o papel dessas moléculas na tumorigênese. Dado que os miRNAs têm o potencial de controlar simultaneamente vários alvos em todas as redes relacionadas ao câncer (BRACKEN; LI; WRIGHT; LAWRENCE *et al.*, 2014), as abordagens terapêuticas do câncer baseadas nos miRNAs podem ser uma maneira muito atraente para o desenvolvimento de estratégias mais práticas a esse respeito (WEN; DANQUAH; CHAUDHARY; MAHATO, 2015). No entanto, para o TAC há uma escassez de estudos relacionando a ação os miRNAs com o desenvolvimento e progressão tumoral, principalmente em crianças, com apenas um estudo tendo sido feito até o momento. Da mesma forma, faltam informações do papel da via de sinalização TGF- β nesses tumores e como os miRNAs podem influenciar no funcionamento dessa via. Sendo assim, a análise molecular dos TAC auxilia em uma melhor estratificação, caracterização e compreensão dos processos carcinogênicos desses tumores, bem como das funções e vias moleculares reguladas por miRNAs em TAC pediátricos.

O miR-483-3p se origina do miR-483, que está localizado na mesma região cromossômica do gene *IGF2* (11p15.5) (FU; TIE; XU; ZHANG *et al.*, 2005; SOON; TACON; GILL; BAMBACH *et al.*, 2009; VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010), sendo este o gene encontrado mais expresso em TAC (GIORDANO; THOMAS; KUICK; LIZYNESS *et al.*, 2003). Além disso, esse miRNA tem como alvo, o gene *SMAD4*, importante na via de sinalização TGF- β , atuando nos processos de proliferação celular e formação de colônias (HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011). Da mesma maneira, o miR-630 está relacionado com a sinalização de TGF- β , com os mecanismos de metástase e TEM, exercendo sua função parcialmente em seu alvo, o oncogene *SLUG* (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016). Dessa forma, ambos miRNAs podem exercer papéis importantes na oncogênese, possivelmente através da via de sinalização TGF- β , podendo contribuir para uma melhor estratificação dos pacientes como uma maneira de auxiliar no prognóstico e tratamento.

3. HIPÓTESE

A hipótese desse trabalho é de que a desregulação da expressão do miR-483-3p e do miR-630 está associada com o comportamento e progressão dos tumores adrenocorticais pediátricos, visto que os miRNAs desempenham um papel importante na regulação da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da adrenal e tumorigênese.

4. OBJETIVOS

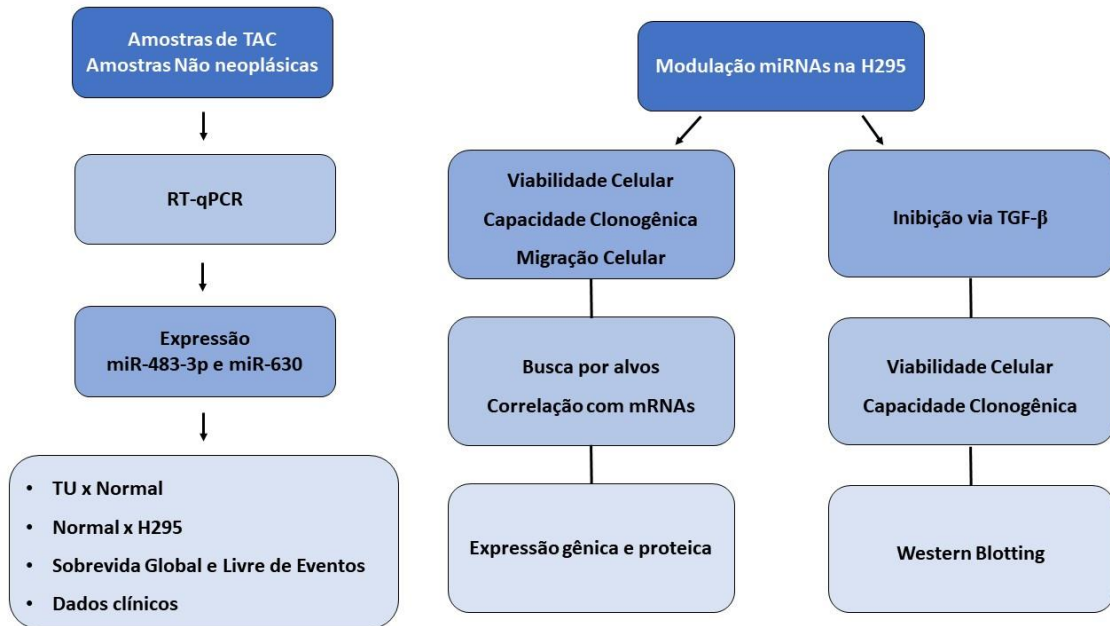
4.1. Objetivo Geral

Analisar o perfil de expressão do miR-483-3p e miR-630 em amostras de pacientes pediátricos diagnosticados com TAC e o efeito da sua modulação na tumorigênese da adrenal.

4.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil de expressão do miR-483-3p e do miR-630 em linhagens celulares e em amostras de pacientes pediátricos diagnosticados com TAC.
- Associar os níveis de expressão encontrados nas amostras tumorais e os parâmetros clínicos e biológicos dos pacientes.
- Investigar os efeitos do silenciamento do miR-483-3p e aumento da expressão do miR-630 na linhagem de TAC NCI-H295 na proliferação celular, capacidade clonogênica e migração.
- Verificar os efeitos da modulação do miR-483-3p e miR-630 na linhagem de TAC NCI-H295 à nível gênico e proteico.
- Avaliar os efeitos da combinação da modulação do miR-483-3p e do miR-630 com inibidor da via de sinalização TGF- β .

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1. Amostras biológicas

Para avaliar a expressão do miR-483-3p e miR-630 nas amostras de pacientes diagnosticados com TAC, foram utilizadas 67 e 64 amostras tumorais, respectivamente e 19 amostras controles provenientes da adrenal de pacientes pediátricos sem diagnóstico de TAC. Todas essas amostras foram obtidas em dois centros de referência do Sudeste do Brasil: a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP/USP e o Centro Infantil Boldrini – UNICAMP. Os dados referentes aos pacientes são mostrados nas Tabela 2 e Apêndice 1 e 2.

Após a coleta, as amostras foram identificadas, microdissecadas e armazenadas em nitrogênio líquido no banco de tumores do Departamento de Pediatria e Puericultura da FMRP, o qual possui aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (processos n° 9373/2003; 9374/2003 e 9375/2003) e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Infantil Boldrini (processo n° 1.75-050809). O diagnóstico foi confirmado pelo Departamento de Patologia da FMRP/USP e do Centro Infantil Boldrini e após essa confirmação o RNA foi extraído de acordo com o protocolo descrito na seção 6.2. Todas as amostras foram coletadas com participação voluntária do paciente ou responsável, atestada em termo de consentimento (Anexo A) e aprovada por comitê de ética (Anexo B). Este projeto faz parte do Auxílio Regular FAPESP (processo n°. 2010/07020-9) intitulado “*Estudos moleculares em neoplasias da criança e do adolescente: Assinatura de microRNAs e estudos funcionais de genes candidatos a terapia alvo*”, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP (processo n°. 8380/2010).

6.2. Extração de RNA e síntese de cDNA

As amostras dos pacientes e as linhagens celulares tiveram seu RNA total extraído utilizando o reagente TRIZOL[®] (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, EUA) segundo as especificações do fabricante. A síntese de cDNA foi realizada de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante, utilizando *primers* específicos para os miRNAs e o kit *High Capacity*[®] (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), de acordo com o protocolo sugerido pelo fabricante.

Tabela 2. Dados clínicos dos pacientes pediátricos com Tumores Adrenocorticais.

| Categoria | Variável | Quantidade (em %) |
|----------------------------------|-----------------|--------------------------|
| Idade | < 3 anos | 72,1% |
| | > 3 anos | 27,90% |
| Gênero | Feminino | 77,90% |
| | Masculino | 22,1% |
| Metástase | Sim | 10,30% |
| | Não | 89,70% |
| Recidiva | Sim | 19,10% |
| | Não | 80,90% |
| Evento | Recidiva/Óbito | 23,50% |
| | Vivo | 76,50% |
| Desfecho | Óbito | 16,20% |
| | Vivo | 83,80% |
| Mutação P53 | Sim | 85,29% |
| | Não | 13,23% |
| | Sem informação | 1,48% |
| Quimioterapia | Sim | 20,5% |
| | Não | 78% |
| | Sem informação | 1,50% |
| Hormônio | Cushing | 4,4% |
| | Virilizante | 61,80% |
| | Misto | 26,50% |
| | Nenhum | 7,3% |
| Classificação de Sandrini | I | 61,80% |
| | II | 20,60% |
| | III | 7,3% |
| | IV | 10,30% |

6.3. Linhagens celulares e condições de cultura.

Foram utilizadas duas linhagens celulares de TAC, a H295R e a H295A, que foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Sonir Antonini do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Ambas são derivadas da mesma linhagem, H295, proveniente do córtex da glândula adrenal de uma mulher de 48 anos de idade.

A H295R foi mantida em meio DMEM-F12 (Gibco BRL, *ThermoFisher*) suplementado com 2% de *NuSerum* (*CorningTM*) e 1% ITS (BD *Biosciences*); a H295A foi mantida em meio RPMI (Gibco BRL, *ThermoFisher*) suplementado com 2% de SBF (Gibco BRL, *ThermoFisher*) e 1% ITS (Gibco BRL, *ThermoFisher*). Ambas com adição de 60mg/mL de penicilina e 100µg/mL de estreptomicina, em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ a 37°C.

A autenticidade das linhagens foi testada através do perfil de marcadores STR (*Short Tandem Repeats*) pela metodologia padronizada pela ATCC (ANSI/ATCC-0002-2011).

6.4. Avaliação da expressão de miRNAs e mRNA nas amostras e nas linhagens de TAC

O nível de expressão do miR-483-3p, miR-630, miRNAs endógenos (*RNU6B* e *RNU48*), dos genes *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *SMAD3* e *SMAD7* e do endógeno, *GUS*, foram quantificados através da técnica de transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-qPCR). Todas as reações foram realizadas no aparelho Quant Studio 12K (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As sondas TaqMan® foram adquiridas pelo sistema *on-demand* da Applied Biosystems (Apêndice 3). Para a expressão do miRNA, o volume final para cada reação foi de 10µL, sendo 4,5µL da amostra investigada (diluída 1/10), 5µL de Universal PCR Master Mix (GoTaq® Probe qPCR Master Mix, Promega) e 0,5µL de cada sonda utilizada. Para a expressão gênica, o volume final para cada reação foi de 12µL, sendo 5,4µL da amostra investigada (diluída 1/50), 6µL de Universal PCR Master Mix e 0,6µL de cada sonda utilizada. Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$). Este estudo utilizou o método de quantificação relativa, o qual sinaliza a mudança de expressão do miRNA e/ou gene alvo em relação a uma amostra referência (a média dos CTs das amostras não neoplásicas). Portanto a quantificação do miRNA e/ou gene alvo normalizado com os genes endógenos e em relação ao calibrador foi obtida pela fórmula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$, sendo Ct o ciclo em que o nível de fluorescência alcança um limiar pré-estabelecido (*threshold*) (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

6.5. Inibição da expressão do miR-483-3p e aumento da expressão do miR-630 nas linhagens celulares de TAC

Ambas as linhagens, H295A e H295R, foram submetidas à transdução lentiviral. Para inibir a expressão do miR-483-3p, foram utilizados vetores lentivirais MISSION® Lenti microRNA *Inhibitor* (HLTUD0592 – hsa-miR-483-3p e o controle negativo HLTUD001C – *Negative Control 1* - Sigma-Aldrich); e para aumentar a expressão do miR-630 foram utilizados também vetores lentivirais MISSION® Lenti microRNA *mimic* (HLMIR0861 – hsa-miR-630 e o controle negativo NCLMIR001 – *Negative Control 1* - Sigma-Aldrich).

As células foram semeadas em placa de 96 poços em densidade de $3,5 \times 10^4$ e 24 horas depois, a transdução foi realizada, adicionando os lentivírus nas concentrações adequadas em

cada poço. Foram testados os MOIs (*multiplicity of infection*) 0,5, 1, 5 e 10. MOI é o número de partículas lentivirais, calculado com base no número de células por poço e na concentração estoque do produto. Após 24 horas da transdução, o meio com vírus foi retirado, e foi adicionado meio completo. 5 dias depois, as células começaram a ser selecionadas utilizando o antibiótico Puromicina na dose de 5µg/mL (P8833 – 25mg - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). A eficiência do silenciamento e da hiperexpressão dos miRNAs foram confirmadas através de RT-qPCR, sendo que para o silenciamento, é possível quantificar sua eficiência através de uma planilha fornecida pelo fabricante. O MOI utilizado para o miR-483-3p foi o de 5 e para o controle negativo, o de 0,5; e para o miR-630 o MOI utilizado foi o de 1,0 e para o seu controle negativo, o MOI de 1,5.

6.6. Ensaio de viabilidade celular

Para verificar o efeito do silenciamento do miR-483-3p e da expressão aumentada do miR-630 nas linhagens celulares foi utilizado o kit de viabilidade celular *CellTiter-Glo*® (Promega), de acordo com as instruções do fabricante. Para isso, as células foram semeadas em densidades iniciais de 2×10^4 em placas de 96 poços em triplicata e mantidas em condições de cultura. As análises foram realizadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Em cada intervalo de tempo adicionou-se 30µL do reagente *Cell Titer Glo*®, mantidas em agitação por 5 minutos e em seguida, 100µL do conteúdo foi transferido para uma placa de luminescência, também de 96 poços, que foi submetida a leitura no aparelho *SpectraMax*® *L Microplate Reader*. Foram realizados 3 experimentos independentes e os resultados estão expressos em média \pm desvio padrão.

A detecção é baseada no uso da reação de luciferase para medir a quantidade de ATP de células viáveis. Em poucos minutos após a perda da integridade da membrana, as células perdem a capacidade de sintetizar o ATP e as ATPases endógenas destroem qualquer ATP remanescente; assim, os níveis de ATP caem abruptamente. Após a adição do reagente *CellTiter-Glo*® ocorre lise das membranas celulares e liberação do ATP; em seguida ocorre inibição das ATPases endógenas e fornecimento de luciferina, luciferase e outros reagentes necessários para medir o ATP usando uma reação bioluminescente (IMLIMTHAN; CORREIA; FIGUEIREDO; LINTINEN *et al.*, 2020).

6.7. Ensaio de formação de colônias

Para avaliar a capacidade de formação de colônias após a transdução, foi realizado o ensaio de clonogenicidade. Para isso, as células foram semeadas em placas de 12 poços em densidade de $2,5 \times 10^3$ e mantidas em cultura até que as colônias fossem visíveis, mas não confluentes. A H295A transduzida com o miR-630 permaneceu em cultura por 20 dias, enquanto a H295R, transduzida com o miR-483-3p, permaneceu em cultura por 15 dias. Após esse período o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS, fixadas com metanol e coradas com Giemsa. A contagem das células foi realizada pelo software *ImageJ* 1.51j8 (NIH, EUA). Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão, e comparados com os resultados das células controle.

6.8. Ensaio de migração (*Wound healing*)

Para avaliar se a modulação dos miRNAs teve efeito na migração celular foi utilizado o protocolo descrito por Liang et al. (2007) com algumas modificações (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Para isso, as células foram semeadas em placas de 6 poços em densidade de 1×10^6 . Após as células atingirem confluência, foi criada uma zona horizontal livre de células no centro da placa com o auxílio de uma ponteira de 200 μ L, que em seguida foi fotografada e utilizada como tempo zero. Essas placas foram mantidas em condições adequadas de cultura e após 48, 72 e 96 horas os mesmos poços foram fotografados a fim de verificar se houve migração das células para dentro da zona livre de células. As imagens foram adquiridas pelo *software Imaging NIS Elements V 5.11*. A análise foi realizada de acordo com a área, em relação ao tempo zero, utilizando o software *ImageJ* 1.51j8 (NIH, EUA). Foram realizados 3 experimentos independentes, em triplicata, e os resultados foram expressos como média e desvio padrão, e comparados com os resultados das células controle.

6.9. Tratamento com Inibidor da via TGF- β , Sb431542

Para inibir a atividade da via TGF- β , foi utilizado o inibidor SB431542 (5mg – Sigma-Aldrich). Uma solução estoque de 10mM do inibidor, foi dissolvida em DMSO, e foi utilizada a dose de 10 μ M para o tratamento das células, de acordo com a literatura (DEREBECKA-HOLYSZ; LEHMANN; HOLYSZ; TRZECIAK, 2009).

Para os ensaios onde foi utilizado esse tratamento, como viabilidade celular e capacidade clonogênica, as células foram plaqueadas como já descrito anteriormente e o

tratamento foi realizado após 24 horas. As análises foram feitas como já descrito na sessão 6.6 e 6.7).

Para os ensaios de expressão de mRNA após o tratamento, as células foram semeadas em placas de 12 poços em densidade de 5×10^5 e após 24 horas, foi adicionado meio de cultura com o inibidor e depois de 24 horas foi realizada a coleta dessas células para verificar a expressão gênica após modulação dos miRNAs e inibição da via TGF- β . Para verificar a expressão proteica após os tratamentos, as células foram semeadas em placas de 6 poços (densidade de 1×10^6) e após 24 horas, foi adicionado meio de cultura com inibidor. Depois de 24 horas de tratamento foi realizada a coleta dessas células para verificar a expressão proteica, como descrito a seguir.

6.10. Western Blotting

Para avaliar a expressão das proteínas foi utilizada a metodologia de *Western Blotting*. Para isso foi realizada a extração de proteínas das linhagens celulares através do reagente RIPA *Lysis and Extraction Buffer*® (Pierce Biotechnology, IL, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação dessas proteínas por método de Bradford, para que 40-50 μ g de cada amostra fosse submetida a uma separação por eletroforese SDS-PAGE. Após essa separação, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose e incubadas com TBST 1% contendo 5% de solução bloqueadora por 60 minutos, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as mesmas membranas foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário (Apêndice 4) das proteínas de interesse, diluídos de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as membranas foram lavadas com TBST 0,1% Tween-20 e incubadas com o anticorpo secundário por 60 minutos à temperatura ambiente e sem contato com a luz. As bandas foram detectadas por quimioluminescência pelo sistema *ChemiDoc* (BioRad Laboratories, CA, EUA) utilizando o Kit *ECLTM Western Blotting System* (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). A quantificação das bandas para a expressão das proteínas foi realizada através do *software* ImageJ 1.51j8 (NIH, EUA).

6.11. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o auxílio do programa *SPSS 20.0 for Windows* (SPSS, Chicago, IL, USA) e *GraphPad Prism 5.0* (GraphPad Software, San Diego, Ca, USA).

Para a análise da comparação da expressão dos miRNAs entre as amostras estudadas (tumores adrenocorticais, adrenais não neoplásicas e linhagens celulares), análise das

expressões dos miRNAs em relação às características clínicas dos pacientes, e análises de expressão gênica foi utilizado o teste de Mann-Whitney. Para analisar a sobrevida global em 5 anos (com óbito por qualquer causa como evento desfavorável) e sobrevida livre de eventos em 5 anos (com recidiva ou óbito como evento desfavorável) foi realizada a análise univariada onde foi aplicado o teste Log-Rank e construídas curvas de Kaplan-Meier. Foram consideradas as medianas de expressão de cada miRNA nas amostras tumorais como valor de corte para a hipoexpressão ou hiperexpressão. Os parâmetros clínicos que foram considerados foram: idade ao diagnóstico; gênero; sintomas quanto ao tipo de hormônio produzido (virilizante, associado com síndrome de Cushing ou misto); presença ou ausência de mutação no *TP53*; classificação de Sandrini; presença ou ausência de recidiva, presença ou ausência de metástase, tamanho tumoral, desfecho (óbito ou não), evento (se o paciente foi a óbito ou teve recidiva ou permaneceu vivo) e sobrevida global e livre de eventos. As correlações das expressões dos miRNAs com os genes foi analisada através do coeficiente de *Spearman Rho*.

Para os ensaios funcionais de viabilidade celular, clonogenicidade e migração foram utilizados os testes *t-student*, *One Way Anova* e pós-teste de Bonferroni. Foram realizados pelo menos três experimentos independentes, em triplicata, e foram considerados significativamente estatísticos aqueles resultados com valor de $P \leq 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1. Expressão do miR-483-3p e miR-630 em amostras de pacientes com TAC

A partir dos resultados obtidos no ensaio de *microarray* realizado anteriormente pelo nosso grupo de pesquisa (FEDATTO, 2014), no presente estudo optamos por validar esses achados em um número maior de amostras. Assim, a expressão de ambos os miRNAs, miR-483-3p e miR-630, foi avaliada por RT-qPCR. Para o miR-483-3p foram utilizadas 67 amostras provenientes de pacientes pediátricos com TAC e 19 amostras de tecido adrenal não neoplásico também pediátrico. Para o miR-630 foram utilizadas 64 amostras tumorais e as mesmas 19 amostras controle. Como essas avaliações foram realizadas em momentos diferentes, três amostras foram insuficientes e não foi possível incluí-las nas análises de expressão do miR-630.

Foi possível observar que o miR-483-3p manteve o perfil de expressão encontrado no ensaio prévio de *microarray*, apresentando uma expressão elevada nas amostras tumorais em relação às amostras não neoplásicas ($P < 0,001$) (Figura 5A). Já o miR-630, após a validação, não apresentou diferença de expressão entre os dois grupos avaliados, como mostra a Figura 5 B. Portanto, para verificar se esses miRNAs, principalmente o miR-630, apresentavam alguma associação com prognóstico, associamos suas expressões com os parâmetros clínicos dos pacientes.

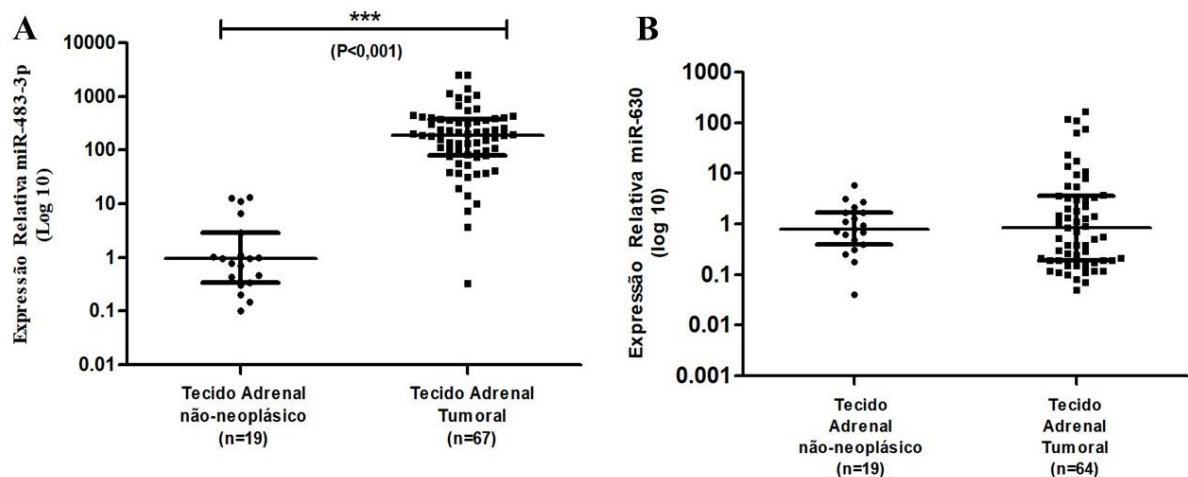
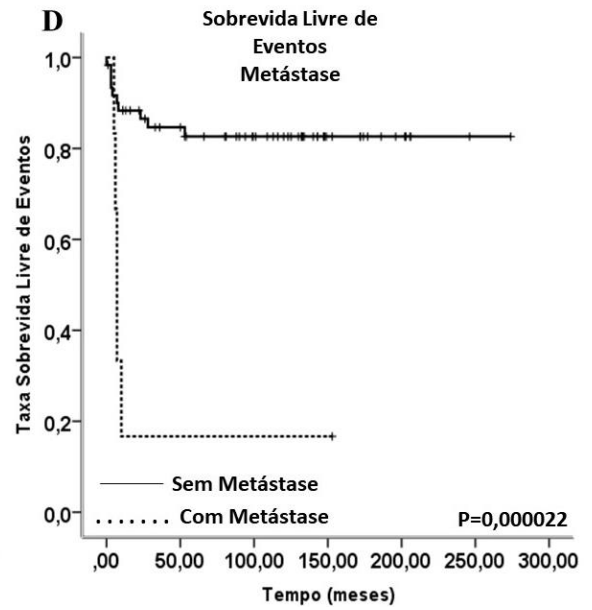
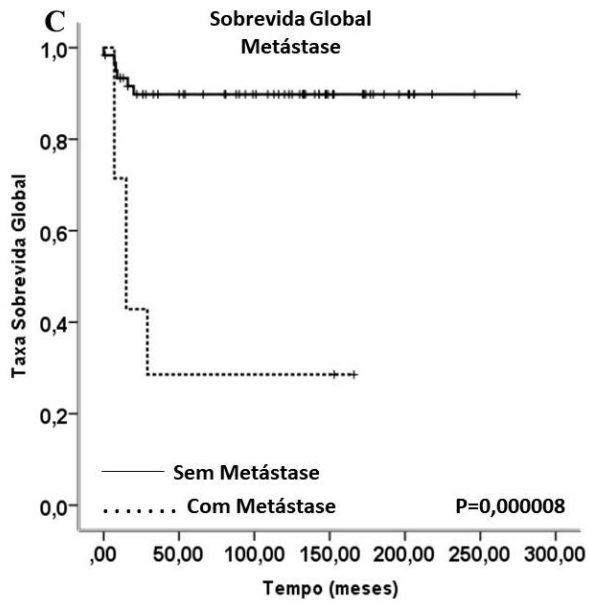
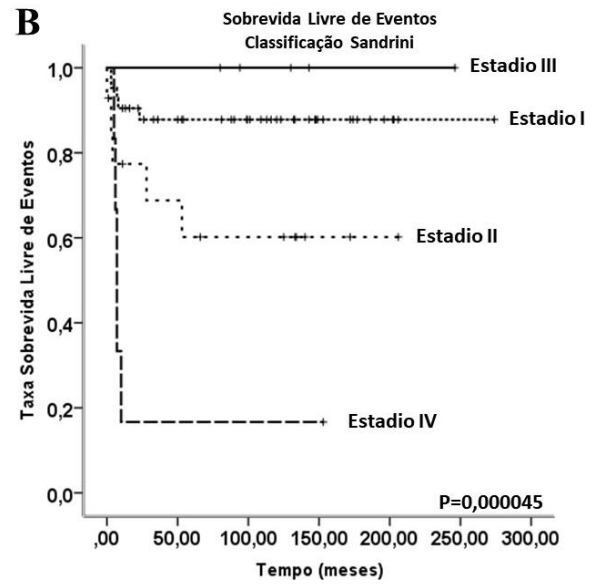
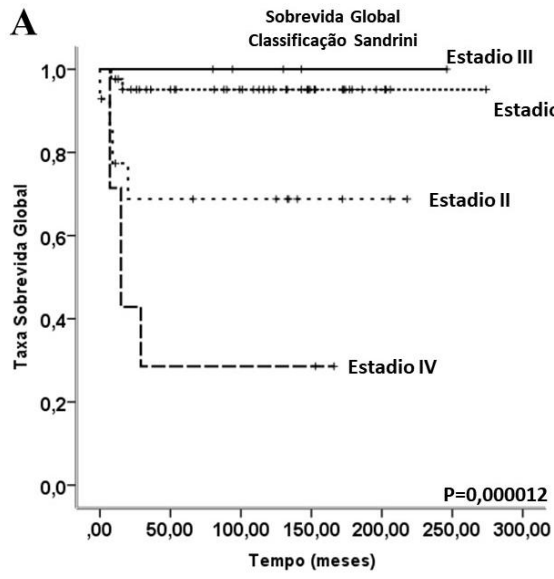


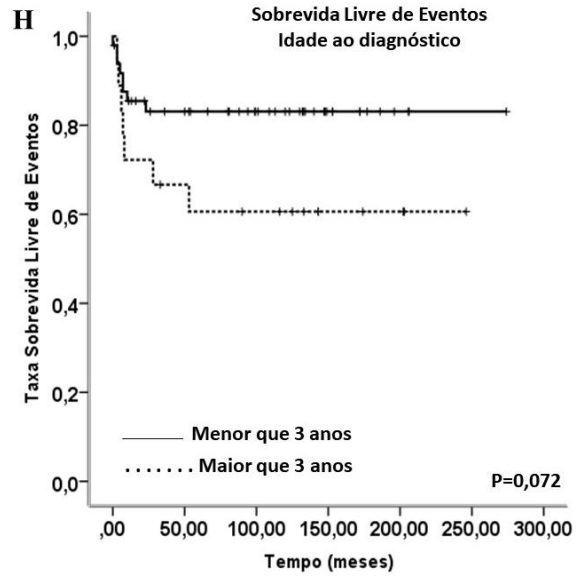
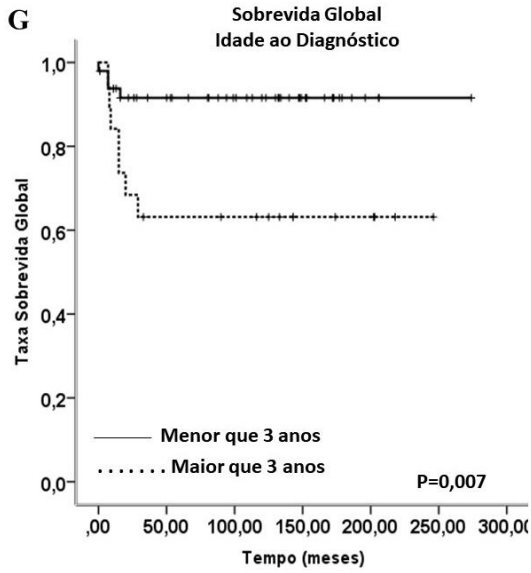
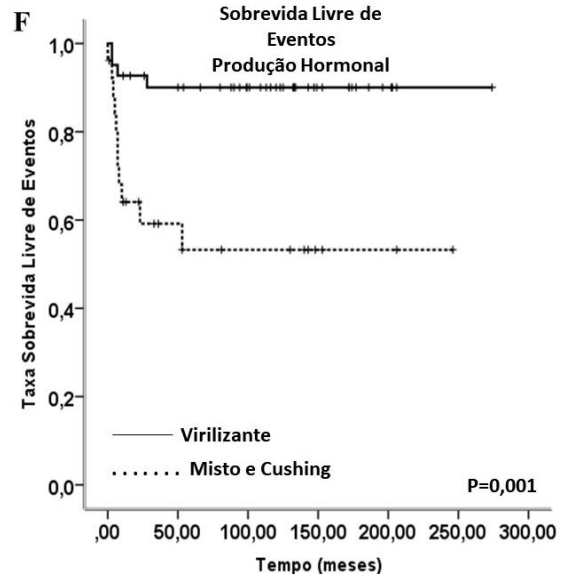
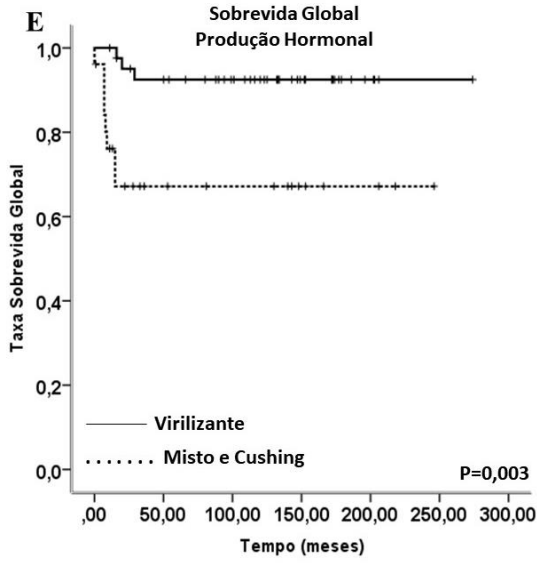
Figura 5. Expressão Relativa do miR-483-3p e miR-630 em amostras de TAC e tecido adrenal não neoplásico. Utilizando a técnica de RT-qPCR (A) foi encontrado diferença significativa ($P < 0,001$) no nível de expressão do miR-483-3p quando comparado tecido tumoral ($n=67$) e tecido não neoplásico ($n=19$). (B) Para o miR-630 não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos avaliados ($P=0,937$). Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$ (representados por *), obtidos através do teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

7.2. Análise de sobrevida de acordo com as características clínicas da nossa coorte de pacientes pediátricos com TAC

Para que fosse possível entender o comportamento dos pacientes com relação as suas características clínicas foram traçadas curvas de sobrevida para as características avaliadas. Assim, em relação a classificação de Sandrini, apesar do estadio III ser considerado um prognóstico ruim, na nossa casuística, os cinco pacientes estadio III evoluíram melhor, apresentando melhor sobrevida global (SG) e livre de eventos (SLE); seguido dos 42 pacientes classificados em estadio I, em seguida vem os 14 classificados em estadio II. E os que apresentaram pior sobrevida global e livre de eventos foram os sete pacientes de estadio IV, como esperado ($P=0,000012$ e $P=0,000045$) (Figura 6A e 6B). A presença e ausência de metástase também dividiu os pacientes quanto a sobrevida. Os sete pacientes que apresentaram metástase tiveram pior SG ($P=0,000008$) e SLE ($P=0,000022$) (Figura 6C e 6D).

O tipo de hormônio produzido também parece ter influenciado na sobrevida, pois os três pacientes com síndrome de Cushing juntamente com os 18 pacientes com produção hormonal mista apresentaram pior SG e SLE, em relação aos 42 pacientes virilizantes ($P=0,003$ e $P=0,001$) (Figura 6E e 6F). Com relação a idade ao diagnóstico, os 19 pacientes com mais de três anos apresentaram pior SG ($P=0,007$) em relação aos 49 pacientes com menor idade, como esperado (Figura 6G). No entanto, apesar de apresentar a mesma tendência, para SLE, esse dado não foi significativo ($P=0,072$) (Figura 6H). E, por fim, os 13 pacientes com tamanho tumoral superior a 200cm^2 tiveram pior SG e SLE ($P=0,003$ e $P=0,008$) (Figura 6I e 6J). Para as características: presença ou ausência de mutação no TP53 e gênero, não houve uma diferença significativa com relação a sobrevida dos pacientes (Apêndice 1 e 5).





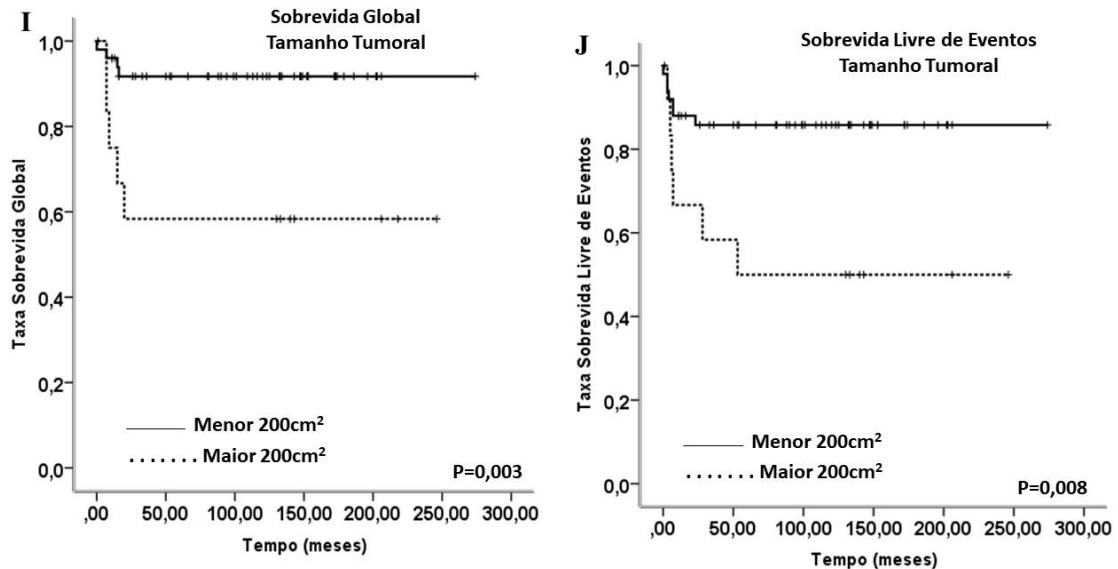


Figura 6. Associação da sobrevida dos pacientes com suas condições clínicas. Avaliando cada parâmetro clínico, foi possível encontrar diferenças significativas nas sobrevidas global e livre de eventos. (**A e B**) Com base na classificação de Sandrini, os pacientes em estadios III (n=5) foram os que melhor apresentaram sobrevida global e livre de eventos e os 7 pacientes em estadios IV, foram os com pior sobrevida global e livre de eventos. Já os 42 pacientes em estadios I e os 14 em estadios II apresentaram uma sobrevida intermediária, sendo que quem é estadios I, tem sobrevida melhor do que quem é estadios II. (**C e D**) Os 7 pacientes que apresentaram metástase, tiveram pior sobrevida global e livre de eventos. (**E e F**) Com relação a produção hormonal, os pacientes classificados como virilizantes (n=42), são os de melhor sobrevida; e os de pior sobrevida, são aqueles com síndrome de Cushing juntamente com os de produção mista (n=21). (**G e H**) A idade ao diagnóstico mostrou que os pacientes com mais de 3 anos (n=19) tiveram pior sobrevida global; porém, para a sobrevida livre de eventos, os resultados não foram significativos. (**I e J**) E os pacientes com tamanho tumoral superior a 200cm^2 (n=13) tiveram também pior sobrevida global e livre de eventos em relação aos 50 com tumor menor que 200cm^2 . Esses dados foram obtidos após aplicar o teste Log-Rank e as curvas foram construídas de acordo com Kaplan-Meier. Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$.

7.3. Associação da expressão do miR-483-3p e miR-630 às características clínicas dos pacientes

Após análise dos perfis de expressão dos miRNAs avaliados nas amostras tumorais, investigamos se eles poderiam ter alguma associação com o comportamento clínico desses pacientes. Para isso foi feito um levantamento dos dados clínicos onde foram considerados: presença ou ausência da mutação R337H no *TP53*; metástase; recidiva; idade ao diagnóstico (maior ou menor que 3 anos); gênero (masculino ou feminino); tipo de hormônio produzido (virilizante, síndrome de Cushing ou misto); classificação de acordo com Sandrini; tamanho tumoral; desfecho clínico (se o paciente foi ou não a óbito); evento (se o paciente foi a óbito ou apresentou ou não recidiva) e SG e SLE (Tabela 2 e Apêndice 1).

A expressão do miR-630 teve associação significativa com a SLE, onde aqueles pacientes que possuíam maior expressão do miR-630 (n=31) apresentaram uma pior sobrevida em relação aos que tiveram menor expressão (n=32) ($P=0,045$) (Figura 7A). Dessa forma, apesar de não ter havido diferença na expressão entre amostras tumorais e não tumorais; quando

apenas os tumores são avaliados, é observado que a maior expressão do miR-630 está associada a um pior prognóstico. A mesma análise foi feita para a SG, porém os resultados não foram significativos ($P=0,313$) (Figura 7B).

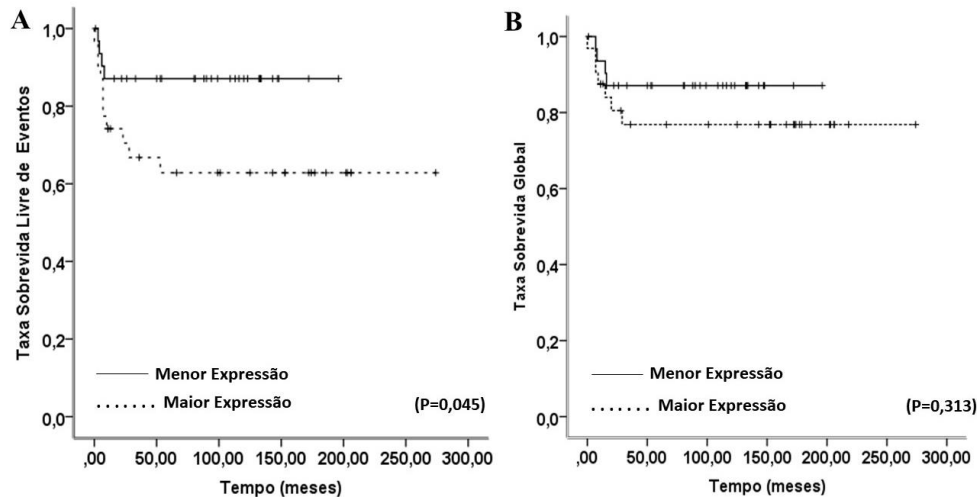


Figura 7. Associação da expressão do miR-630 com a sobrevida livre de eventos e global em pacientes com TAC. Traçando a mediana dos valores de expressão do miR-630 dividimos os pacientes entre aqueles que expressam esse miRNA acima ($n=31$) ou abaixo da mediana encontrada ($n=32$) e realizamos o teste Log-Rank e curvas de Kaplan-Meier para analisar a sobrevida livre de eventos (**A**) e sobrevida global (**B**) dos pacientes avaliados. Pacientes que apresentaram maior expressão do miR-630, são aqueles que apresentaram menor sobrevida livre de eventos ($P=0,045$). Para a sobrevida global não foram obtidos resultados significativos ($P=0,313$).

Seguindo essa mesma tendência, de uma forma geral, a maior expressão do miR-630 foi relacionada com pior prognóstico devido sua associação com vários outros parâmetros clínicos avaliados. Por exemplo, os pacientes classificados em estadió IV apresentaram maior expressão do miR-630 em relação aos pacientes com tumores classificados em estadió III ($P=0,022$) (Figura 8A). Os pacientes que apresentaram recidiva também hiperexpressaram esse miRNA em relação aos que não apresentaram ($P=0,012$) (Figura 8B). E, por fim, os pacientes que tiveram recidiva e foram a óbito também apresentaram maior expressão desse miRNA em relação aos pacientes que não tiveram recidiva e nem foram a óbito ($P=0,014$) (Figura 8C). Os outros parâmetros avaliados não apresentaram dados significativos, como idade ao diagnóstico, tipo de hormônio produzido, presença ou ausência de mutação no *TP53*, presença ou ausência de metástase, gênero, se o paciente foi ou não a óbito e tamanho tumoral (Apêndice 6).

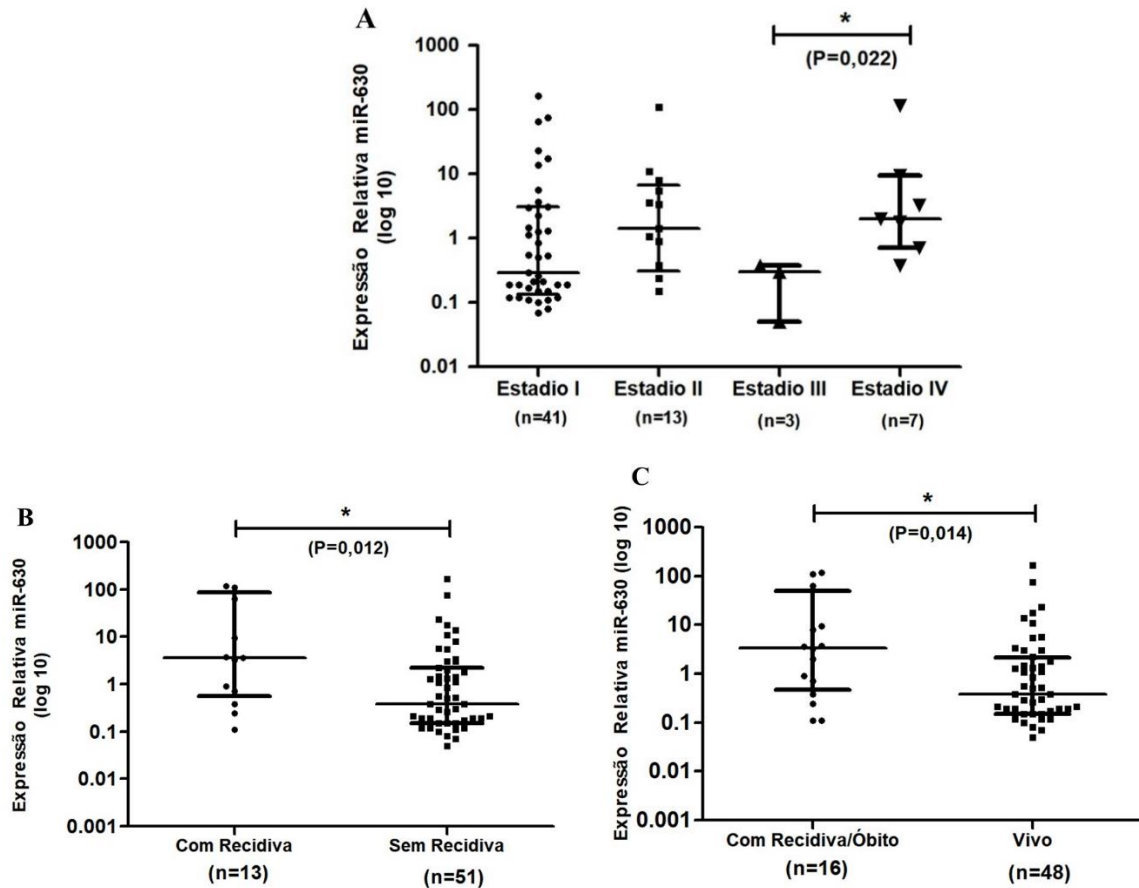


Figura 8. Associação da expressão do miR-630 e as características clínicas de pacientes pediátricos com TAC. Através da técnica de RT-qPCR foi avaliado o nível de expressão do miR-630 e feitas associações com o comportamento clínico dos pacientes avaliados. Assim, a maior expressão do miR-630 foi associada com (A) pacientes em estadio IV (n=7) em relação aos pacientes em estadios III (n=3) (P=0,022); (B) pacientes com recidiva (n=13) em relação aos pacientes sem recidiva (n=51) (P=0,012); e (C) pacientes que tiveram recidiva e ou foram a óbito (n=16) em relação aos que continuam vivos (n=48) (P=0,014). Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$ (representados pelo *), obtidos através do teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

Para o miR-483-3p, apesar dos dados não serem significativos para SLE (P=0,393) (Figura 9A), o padrão foi o mesmo para a SG, ou seja, a análise mostrou que pacientes que têm menor expressão desse miRNA (n=33), apresentaram pior SG em relação aos pacientes que expressam mais (n=34) (P=0,028) (Figura 9B).

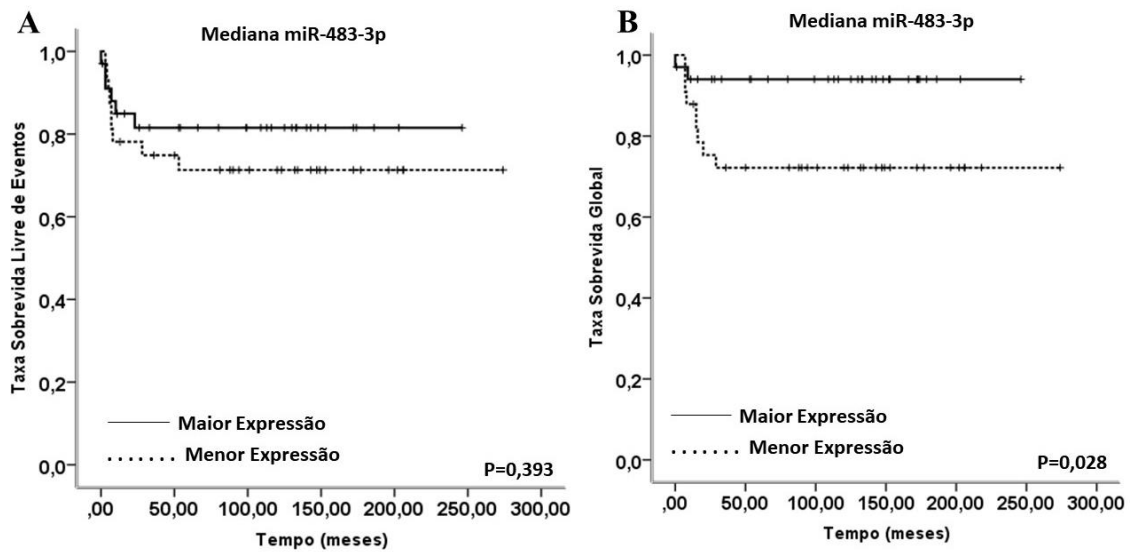


Figura 9. Associação da expressão do miR-483-3p com a sobrevida livre de eventos e global de pacientes pediátricos com TAC. Através da mediana dos valores de expressão do miR-483-3p obtidos pela técnica de RT-qPCR, os pacientes foram divididos entre aqueles que tem expressão acima da mediana (n=34) e aqueles pacientes que têm valor de expressão abaixo da mediana encontrada (n=33). Dessa forma, utilizando o teste Log-Rank e construindo curvas de Kaplan-Meier, foi obtida a sobrevida livre de eventos e sobrevida global desses pacientes avaliados. **(A)** Apesar de não significativo, a sobrevida livre de eventos nos pacientes que tem menor expressão do miR-483-3p, é pior em relação a sobrevida dos pacientes que tem maior expressão desse miRNA. **(B)** Para a sobrevida global, é possível identificar que os pacientes que apresentaram menor expressão do miR-483-3p, são aqueles que apresentaram menor sobrevida global (P=0,028).

Para o miR-483-3p, quando avaliada a classificação dos tumores de acordo com Sandrini, foi observado que os pacientes classificados em estadio IV, apresentaram menor expressão do miR-483-3p em relação aos pacientes classificados em estadio I (P=0,027), aos pacientes com estadio II (P=0,014) ou aos pacientes com estadio III (0,028) (Figura 10A). Além disso, os pacientes que apresentaram metástase, também tiveram menor expressão do miRNA em relação aos pacientes que não apresentaram metástase (P=0,012) (Figura 10B). E ainda, os pacientes que foram a óbito também apresentaram menor expressão do miR-483-3p em relação aos pacientes que permaneceram vivos (P=0,039) (Figura 10C).

Os outros parâmetros avaliados não apresentaram resultados significativos, como idade ao diagnóstico, mutação no *TP53*, recidiva, produção hormonal, ocorrência de algum evento (recidiva ou óbito) ou não, gênero e tamanho tumoral (Apêndice 7). Portanto, de uma maneira geral, a menor expressão do miR-483-3p parece estar associada com um pior prognóstico desses pacientes, mesmo que sua expressão esteja aumentada nas amostras tumorais em relação as não tumorais.

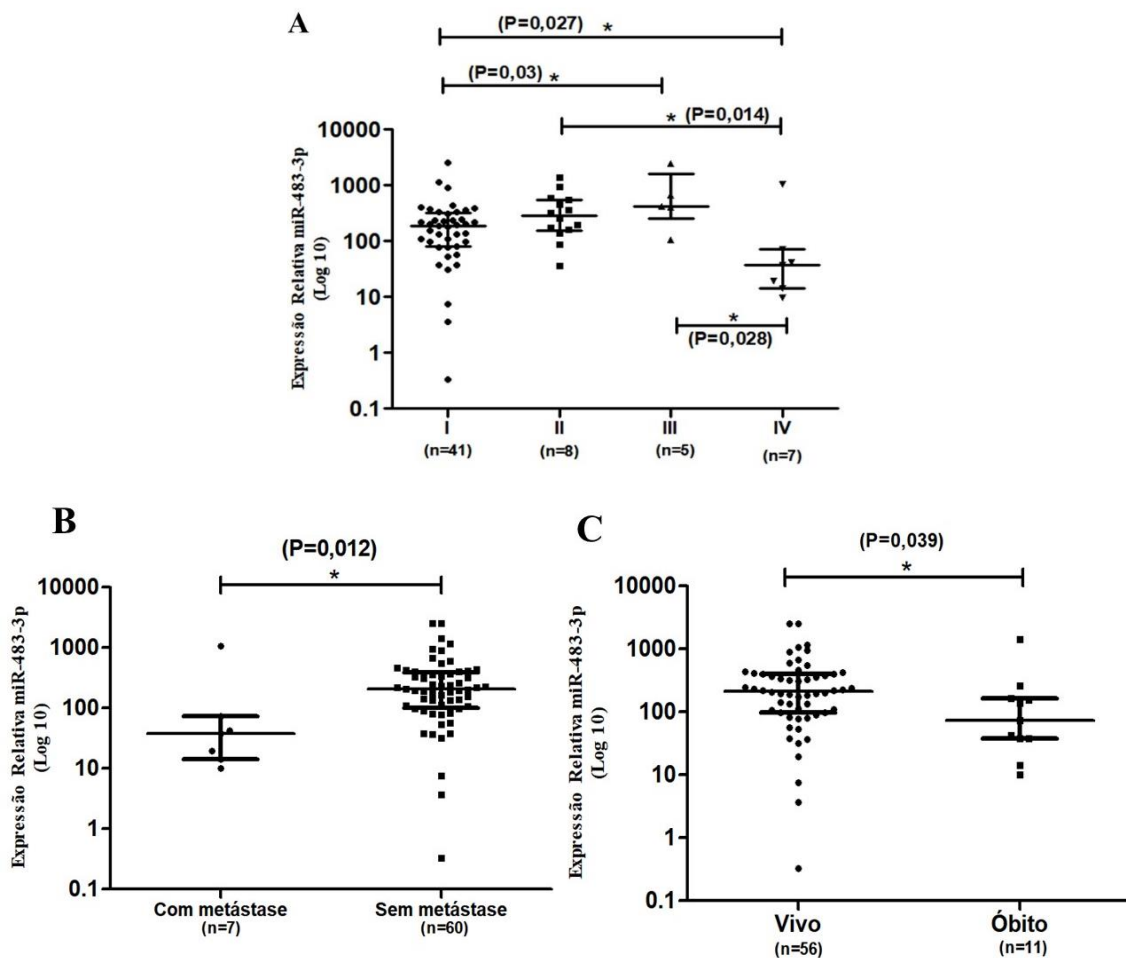


Figura 10. Associação da expressão do miR-483-3p e as características clínicas de pacientes pediátricos com TAC. A expressão do miR-483-3p avaliada por RT-qPCR foi associada com alguns dados clínicos dos pacientes com TAC, ou seja, **(A)** a menor expressão desse miRNA foi relacionada com estadió IV, de acordo com Sandrini (P=0,027; P=0,014, P=0,028); **(B)** com presença de metástase (P=0,012) e **(C)** com pacientes que foram a óbito (P=0,039). Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$ (representados em *), obtidos através do teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

7.4. Expressão do miR-483-3p e miR-630 na linhagem celular de TAC, H295

Após avaliar as expressões nas amostras dos pacientes, o próximo passo foi investigar como esses miRNAs se comportam em linhagens celulares de TAC, como um primeiro modelo de avaliação. Infelizmente, o único modelo celular disponível para o tumor de adrenal, é a linhagem H295, proveniente de uma paciente de 48 anos, que deu origem a duas variantes, a H295A e a H295R (GAZDAR; OIE; SHACKLETON; CHEN *et al.*, 1990; RAINEY; BIRD; MASON, 1994; RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004; RODRIGUEZ; HUM; STAELS; MILLER, 1997). Apesar de sabermos que o tumor se comporta de maneira diferente quando o

paciente é pediátrico ou adulto, optamos por dar seguimento as análises, levando em conta essa diferença quando necessário.

Assim, a primeira investigação feita foi avaliar a expressão dos miRNAs estudados nas linhagens H295A e H295R. Foi observado o mesmo padrão de expressão encontrado nas amostras de TAC pediátrico, ou seja, o miR-630 está hipoexpresso e o miR-483-3p está hiperexpresso em ambas as linhagens em relação às amostras não neoplásicas (Figuras 11A e B). Nessas condições, pudemos investigar o comportamento das linhagens quando a expressão desses miRNAs fosse restaurada (no caso do miR-630) ou diminuída (no caso do miR-483-3p).

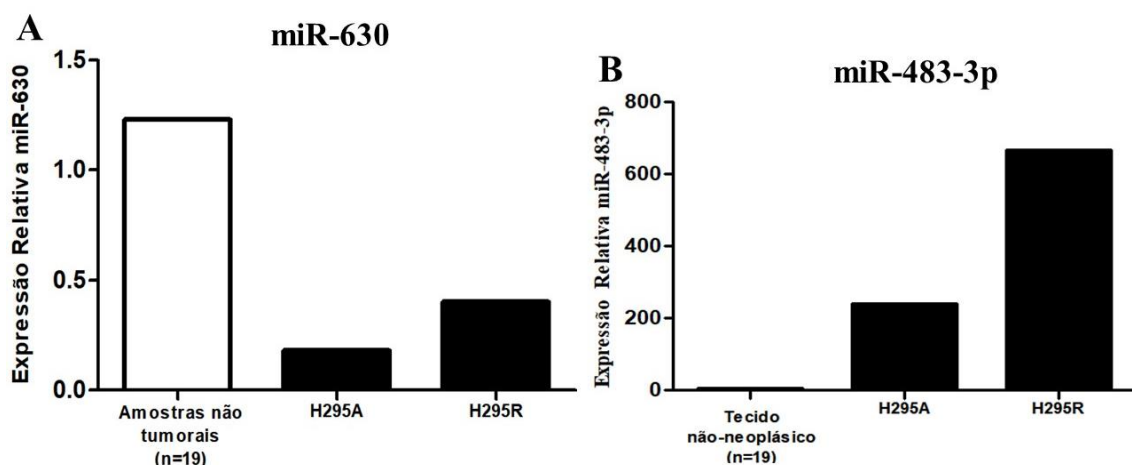


Figura 11. Expressão do miR-483-3p e miR-630 nas linhagens celulares H295A e H295R. Através da técnica de RT-qPCR foi avaliada a expressão do miR-483-3p e do miR-630 nas linhagens celulares de TAC. O miR-630 está hipoexpresso (A), enquanto o miR-483-3p está hiperexpresso (B) nas linhagens em relação ao tecido não-neoplásico (n=19).

7.5. Modulação do miR-483-3p e miR-630 na linhagem celular H295

Como foi encontrado o mesmo padrão de expressão dos miRNAs nas linhagens e nas amostras tumorais avaliadas, nos propusemos a modificar a expressão desses miRNAs para observar se encontraríamos um comportamento mais ou menos agressivo das linhagens nessa nova condição. Assim, foi feito o silenciamento do miR-483-3p e a hiperexpressão do miR-630 em ambas as linhagens utilizando vetores lentivirais. Contudo, os processos de silenciamento na H295A e de hiperexpressão na H295R não foram obtidos pois as células não cresceram após o procedimento.

Após a realização da transdução, foi possível observar a hiperexpressão do miR-630 na H295A (Figura 12A) e; a diminuição da expressão do miR-483-3p na H295R, sendo que esse silenciamento foi de 87% em relação ao controle (Figura 12B).

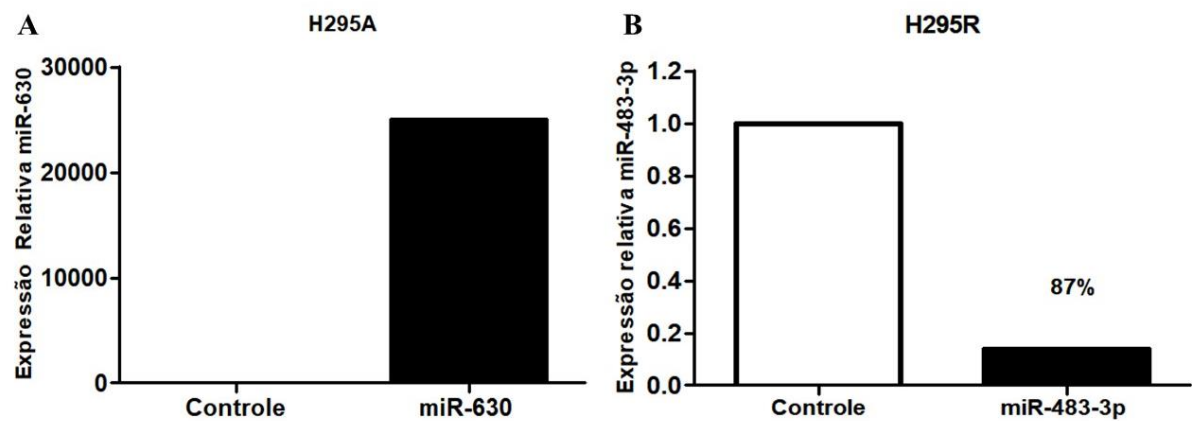


Figura 12. Transdução dos miRNAs nas linhagens celulares de TAC. Após a transdução lentiviral das linhagens celulares foi possível observar (A) a hiperexpressão do miR-630 nas células H295A (B) e o silenciamento de 87% do miR-483-3p na H295R. Esses resultados foram validados através da técnica de RT-qPCR, após coletar uma alíquota de células, que tiveram seu RNA extraído e o cDNA sintetizado. Para o silenciamento, o fabricante fornece uma planilha para avaliar a eficiência desse silenciamento, medida em porcentagem.

7.6. Efeito funcional da modulação dos miRNAs nas linhagens de TAC

7.6.1. Viabilidade celular

Após modificarmos a expressão dos miRNAs nas linhagens, avaliamos como essas células se comportariam nessa nova condição. Supondo que após alterada a expressão dos miRNAs as células poderiam ter seu crescimento e comportamento modificado, foi realizado o ensaio de viabilidade celular.

Foi possível observar que o aumento da expressão do miR-630 permitiu a diminuição da viabilidade celular em todos os tempos avaliados ($P < 0,001$) (Figura 13A) e o silenciamento do miR-483-3p ocasionou diminuição da viabilidade celular após 96 horas ($P < 0,01$) (Figura 13B).

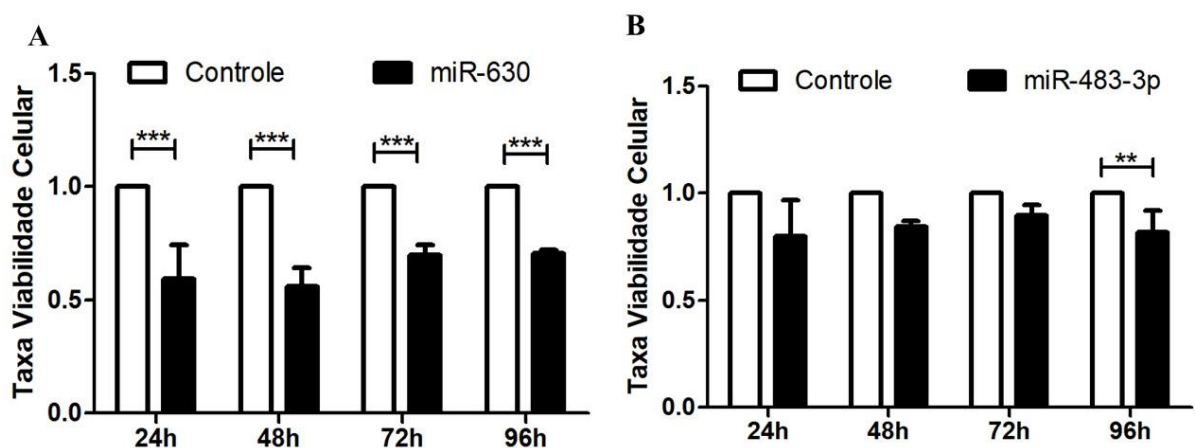


Figura 13. Análise de viabilidade celular após hiperexpressão do miR-630 ou silenciamento do miR-483-3p em linhagens de TAC. Após a transdução, foi avaliada a taxa de viabilidade celular nas duas linhagens estudadas. (A) Na H295A, com o miR-630 hiperexpresso, foi observado a diminuição da viabilidade celular em todos os tempos avaliados ($P < 0,001$) e (B) na H295R, com o miR-483-3p silenciado, também foi observado essa

diminuição, porém apenas após 96 horas ($P < 0,01$). Esses dados foram obtidos aplicando o teste One-way ANOVA seguido do pós teste de Bonferroni. Foram realizados 3 experimentos independentes e foram considerados significativos os valores de $P < 0,05$.

7.6.2. Capacidade clonogênica

Em seguida, através do ensaio de clonogênica, foi possível observar o comportamento das células em um tempo maior, visto que elas permaneceram em cultura por um período entre 15 e 20 dias, além de investigar a capacidade de crescimento das células em um novo local. A hiperexpressão do miR-630 foi capaz de diminuir a capacidade das células de formarem colônias (Figuras 14A) ($P = 0,0028$); porém o silenciamento do miR-483-3p não promoveu nenhum efeito significativo na capacidade de formação de colônias (Figura 14B) ($P = 0,2002$). As fotos das colônias encontram-se no Apêndice 8.

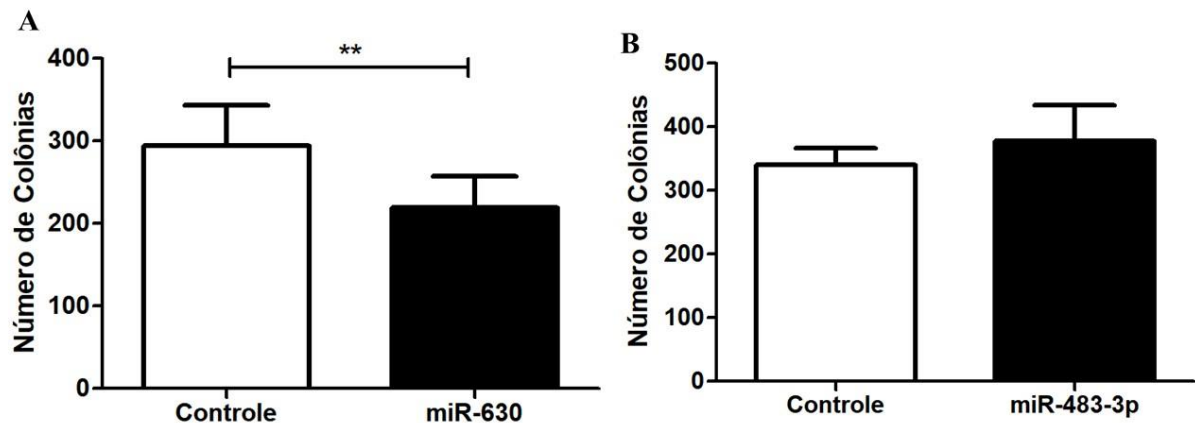


Figura 14. Capacidade clonogênica após hiperexpressão do miR-630 ou silenciamento do miR-483-3p em linhagens de TAC. Após a transdução do miR-630 e do miR-483-3p, foi realizado um ensaio de formação de colônias para investigar a longo prazo o efeito dessa modulação nas linhagens celulares. (A) Após 20 dias, as células com o miR-630 hiperexpresso tiveram menor capacidade de formação de colônias em relação as células controle ($P = 0,0028$). (B) Para o miR-483-3p, no entanto, o silenciamento não foi capaz de modificar a capacidade de formação de colônias dessas células ($P = 0,2002$). As células foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa a contagem de colônias foi feita através do software ImageJ. Foram realizados 3 experimentos independentes e foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

7.6.3. Migração Celular

Ao realizar o ensaio de migração, foi observado que não houve diferença significativa na taxa de migração celular quando o miR-630 está aumentado na H295A ($P > 0,05$) (Figura 15A) e quando o miR-483-3p está diminuído na H295R ($P < 0,05$) (Figura 15B); indicado pela área de migração relativa. Esses dados indicam que apesar de haver queda na viabilidade celular após a modulação dos miRNAs, estes parecem não interferir na taxa de migração para essas linhagens.

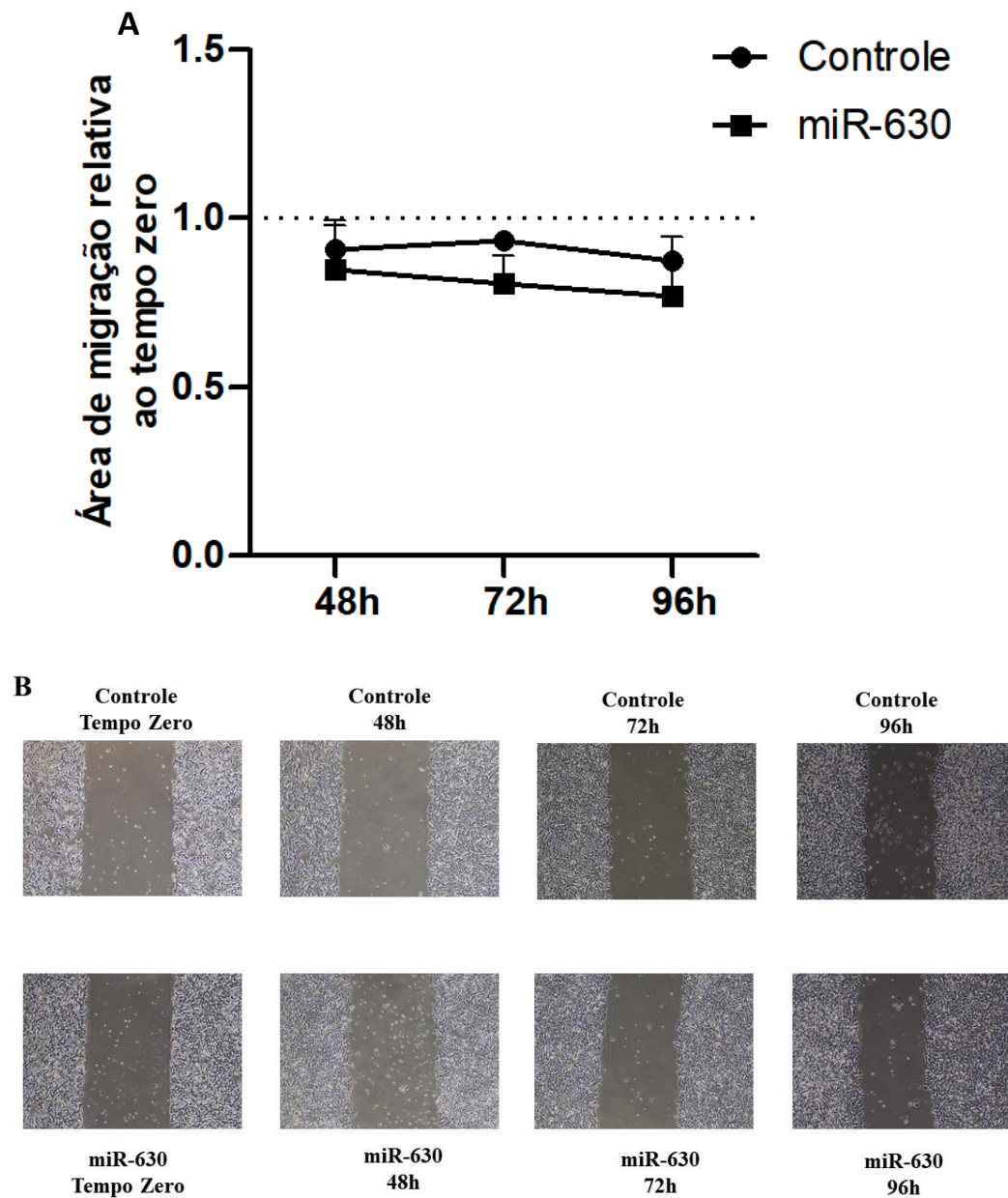


Figura 15 A e B. Análise de migração da linhagem H295R após hiperexpressão do miR-630. Ao realizar o ensaio de migração por Wound Healing, foi observado que não houve diferença significativa na taxa de migração celular para as células com o miR-630 hiperexpresso ($P > 0,05$). Para esses dados foi aplicado o teste one-way ANOVA e foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$.

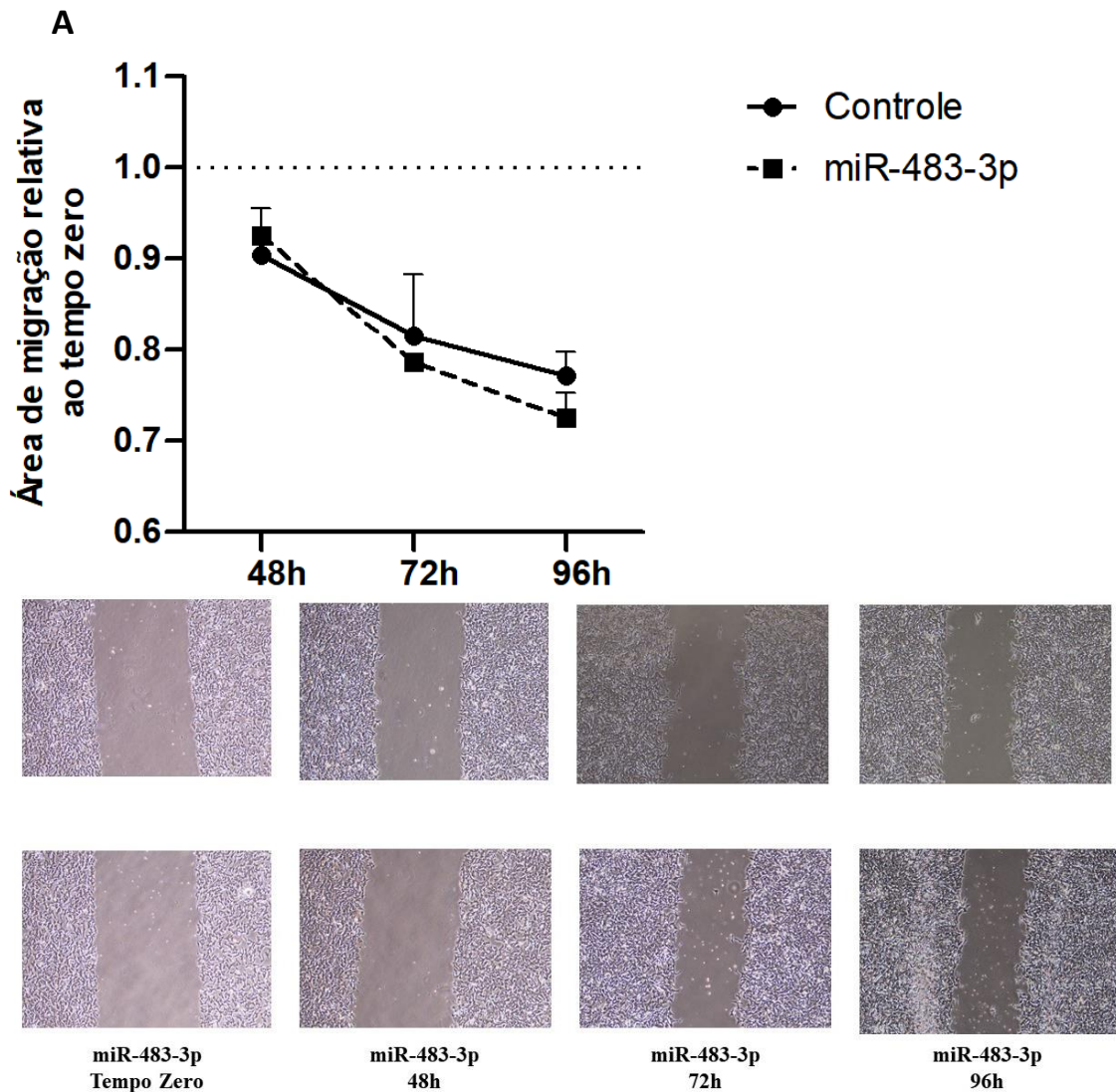


Figura 16 A e B. Análise de migração da linhagem H295R após silenciamento do miR-483-3p. Ao avaliar a capacidade de migração da H295R com o miR-483-3p silenciado, observamos que não houve diferença na taxa de migração celular em relação as células controle ($P > 0,05$). Para esses dados foi aplicado o teste one-way ANOVA e foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$.

7.7. Genes alvos preditos e validados do miR-630 e do miR-483-3p

Após avaliar o comportamento dos miRNAs em ensaios funcionais, buscamos entender como esses miRNAs poderiam agir nessas células, ou seja, quais genes poderiam estar regulando e em quais vias. Assim, utilizamos a ferramenta miRWalk 2.0, para buscar genes alvos preditos e validados de ambos os miRNAs estudados. Foi feita uma seleção para que fossem utilizados os bancos de dados miRWalk, miRanda, miRDB, Pictar2, PITA, RNA22, RNAhybrid e Targetscan; foram considerados os genes que apareciam em pelo menos 4 bancos e foi dado prioridade para buscar genes pertencentes à via de sinalização TGF- β , visto que é uma via muito importante para o desenvolvimento da adrenal. Os resultados encontrados estão representados na Tabela 3.

Tabela 3. Genes alvos do miR-483-3p e do miR-630 obtidos pelo miRWalk 2.0

| miR-483-3p | | miR-630 | |
|----------------|-----------------|----------------|-----------------|
| Alvos Preditos | Alvos Validados | Alvos preditos | Alvos Validados |
| <i>TGFB1</i> | | <i>TGFB2</i> | |
| <i>TGFB2</i> | | <i>TGFB1</i> | |
| <i>SMAD4</i> | | <i>SMAD2</i> | <i>TGFB2</i> |
| <i>SMAD3</i> | | <i>WNT3</i> | |
| <i>SMAD7</i> | <i>SMAD4</i> | <i>GSK3B</i> | |
| <i>WNT3</i> | | | |
| <i>AXIN2</i> | | | |
| <i>GSK3B</i> | | | |
| <i>CTNNB1</i> | | | |
| <i>GLI2</i> | | | |

7.8. Correlação entre expressão gênica e expressão dos miRNAs

Baseado nos resultados obtidos na análise *in silico* (Fedatto, 2014) e dados de expressão de genes das vias TGF- β e Wnt estudados pelo nosso grupo, analisamos a correlação entre as vias TGF- β e Wnt e as expressões do miR-630 e miR-483-3p, nas mesmas amostras tumorais de pacientes pediátricos com TAC aqui utilizadas.

Foram avaliados os genes: *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *SMAD3* e *SMAD7* da via TGF- β e os genes *AXIN2*, *CTNNB1*, *GSK3 β* e *MYC* da via Wnt/ β -catenina. Portanto, através da correlação de *Spearman*, o miR-630 foi correlacionado positivamente com os genes *GSK3 β* e *MYC* e negativamente com o gene *TGFB1*. Enquanto o miR-483-3p foi correlacionado negativamente com os genes *TGFB1*, *SMAD3*, *GSK3 β* , *AXIN2* e *MYC*. Os dados de coeficiente de correlação e valores de P estão indicados na Tabela 4.

Tabela 4. Correlação de expressão entre o miR-483-3p e o miR-630 com genes alvos.

| miR-630 | | |
|---------------|----------------------------|------------|
| | Coefficiente de Correlação | Valor de P |
| <i>GSK3B</i> | 0,411 | 0,000125 |
| <i>MYC</i> | 0,317 | 0,004 |
| <i>TGFBR1</i> | -0,39 | 0,000296 |

| miR-483-3p | | |
|--------------|----------------------------|------------|
| | Coefficiente de Correlação | Valor de P |
| <i>SMAD3</i> | -0,284 | 0,009 |
| <i>TGFBI</i> | -0,338 | 0,002 |
| <i>AXIN2</i> | -0,489 | 0,000003 |
| <i>GSK3B</i> | -0,319 | 0,003 |
| <i>MYC</i> | -0,396 | 0,000212 |

7.9. Expressão de genes e proteínas da via TGF- β nas linhagens celulares após a transdução.

Baseando-se nos resultados encontrados, optamos por investigar o papel da via TGF- β nesse tumor, e a sua relação com os miRNAs aqui estudados. Assim, foi realizada a expressão de genes dessa via, incluindo genes preditos e validados dos miRNAs estudados, nas linhagens celulares com o miR-483-3p silenciado e com o miR-630 hiperexpresso.

Através da técnica de RT-qPCR, foi possível observar que após hiperexpressar o miR-630 na linhagem H295A, apenas o gene *TGFBR1* teve sua expressão aumentada ($P < 0,05$). O *TGFBR2* e o *SMAD7* também tiveram sua expressão aumentada, mas esses dados não foram significativos (Figura 17A). Os genes *TGFBI*, *TGFB2* e *SMAD3* apresentaram diminuição de suas expressões após o aumento da expressão do miR-630, mas também não foi significativo (Figura 17A). Por outro lado, o silenciamento do miR-483-3p permitiu o aumento da expressão de *TGFBR2* e de *SMAD7* ($P < 0,05$). Os genes *TGFB2* e *TGFBR1* também tiveram sua expressão aumentada, porém esses dados não foram significativos (Figura 17B). O gene *SMAD3* quase não apresentou diferenças entre a linhagem transduzida e a linhagem controle; enquanto o gene *TGFBI* apresentou uma diminuição na sua expressão, porém não foi significativo (Figura 17B).

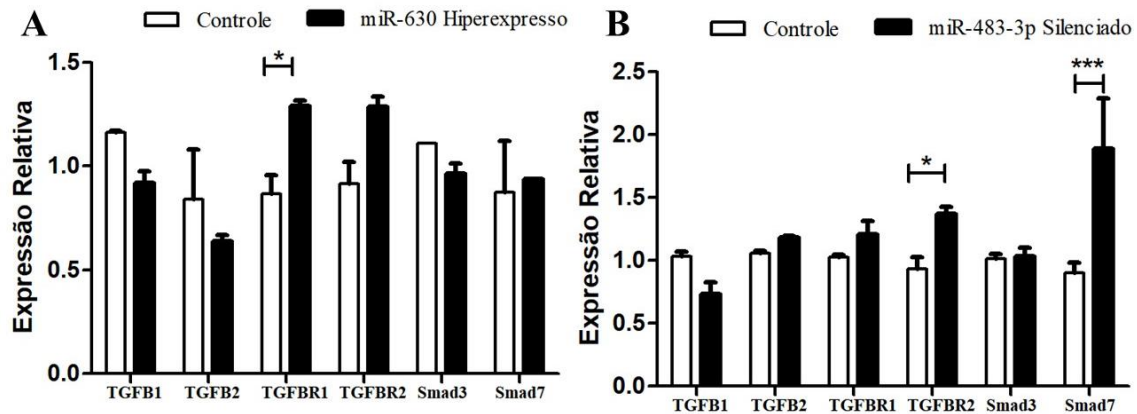


Figura 17. Expressão gênica após a transdução nas linhagens H295A e H295R. Após a transdução lentiviral, a expressão de genes pertencentes à via TGF- β foi investigada. **(A)** Após a hiperexpressão do miR-630 houve aumento no TGFBR1 ($P < 0,05$), assim como do TGFBR2 e SMAD7, porém não foi significativo. Por outro lado, houve diminuição da expressão de TGFB1, TGFB2 e SMAD3, apesar de não ter sido significativo. **(B)** Com o miR-483-3p silenciado houve aumento da expressão do TGFBR2 e SMAD7 ($P < 0,05$), assim como do TGFB2, mas este não foi significativo. Já o gene TGFB1 apresentou uma queda na sua expressão, apesar de não significativo; enquanto o gene Smad3 pareceu não apresentar diferença quando o miR-483-3p está silenciado. Foram realizados 3 experimentos independentes e foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

Ao avaliar a expressão de proteínas após a hiperexpressão do miR-630 na H295A, foi possível observar que houve aumento da expressão de todas as proteínas avaliadas, Smad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina; com exceção do pSmad3, que não foi possível detectar (Figura 18A). Da mesma forma, após o silenciamento do miR-483-3p na H295R, observamos aumento da expressão das mesmas proteínas (Figura 18B). Esses dados, juntamente com os de expressão gênica acima mostrados, indicam uma possível associação entre os miRNAs e essa via de sinalização, mostrando que a expressão desregulada do miR-630 e do miR-483-3p podem contribuir para um desequilíbrio no funcionamento da via TGF- β .

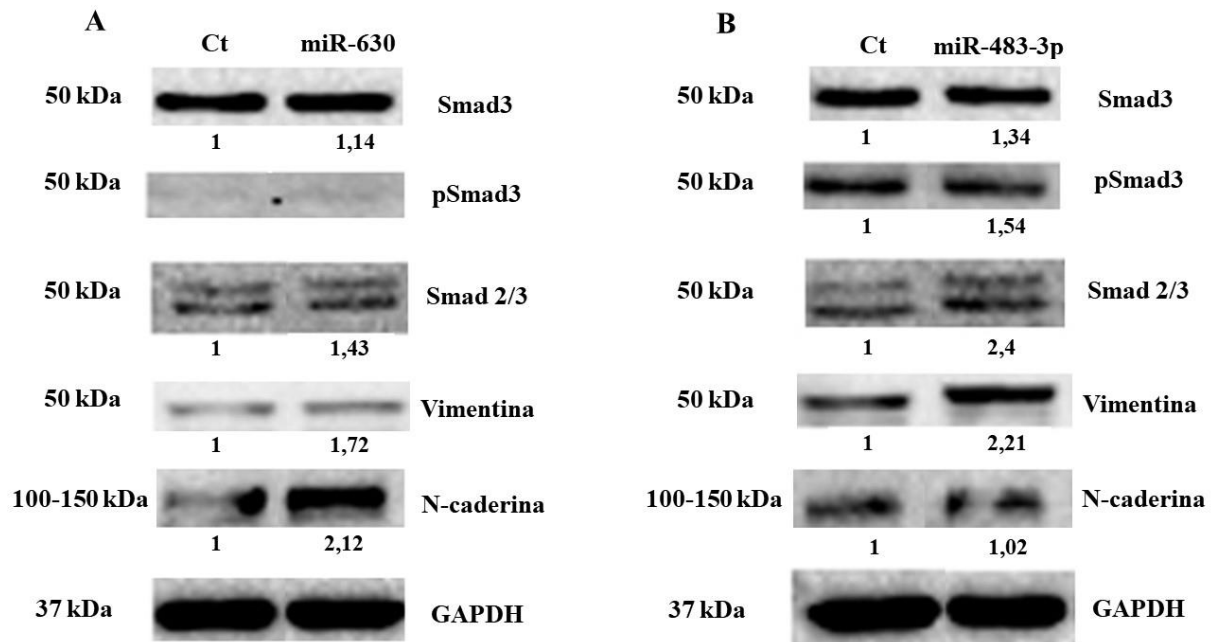


Figura 18. Quantificação de proteínas após transdução dos miRNAs nas linhagens celulares de TAC. (A) Após o aumento da expressão do miR-630, houve aumento da expressão das seguintes proteínas: Smad3, Smad 2/3, Vimentina e N-caderina. (B) Da mesma forma, após silenciamento do miR-483-3p, também houve aumento da expressão das mesmas proteínas citadas, incluindo pSmad3.

7.10. Ensaio de viabilidade celular e capacidade clonogênica após a inibição da via TGF- β

Para melhor compreender os dados obtidos, optamos por investigar os efeitos da modulação dos miRNAs combinada com a inativação da via TGF- β . Para isso, foi utilizado o inibidor SB431542, na dose de 10 μ M (DEREBECKA-HOLYSZ; LEHMANN; HOLYSZ; TRZECIAK, 2009).

Ao aumentar a expressão do miR-630 na H295A e tratar essa linhagem com o inibidor SB431542 foi possível observar que a combinação resultou na diminuição da viabilidade celular, após 96 horas de tratamento ($P < 0,001$) (Figura 19A). Ao avaliar a H295R, o tratamento com o inibidor permitiu uma redução da viabilidade celular tanto na linhagem com o miR-483-3p silenciado quanto na linhagem controle, nos tempos de 24h ($P < 0,05$), 48h ($P < 0,01$) e 72h ($P < 0,001$). No entanto, apenas após 96 horas, a combinação do tratamento com o silenciamento do miR-483-3p permitiu a queda da viabilidade, que não foi encontrada na linhagem controle ($P < 0,05$) (Figura 19B).

Esses resultados indicam que a inibição da via TGF- β e a modulação desses miRNAs parecem contribuir para um comportamento menos agressivo das linhagens H295A e H295R após 96 horas de tratamento. O que nos leva a supor que existe uma relação entre o papel desses miRNAs e a funcionalidade da via TGF- β em TAC.

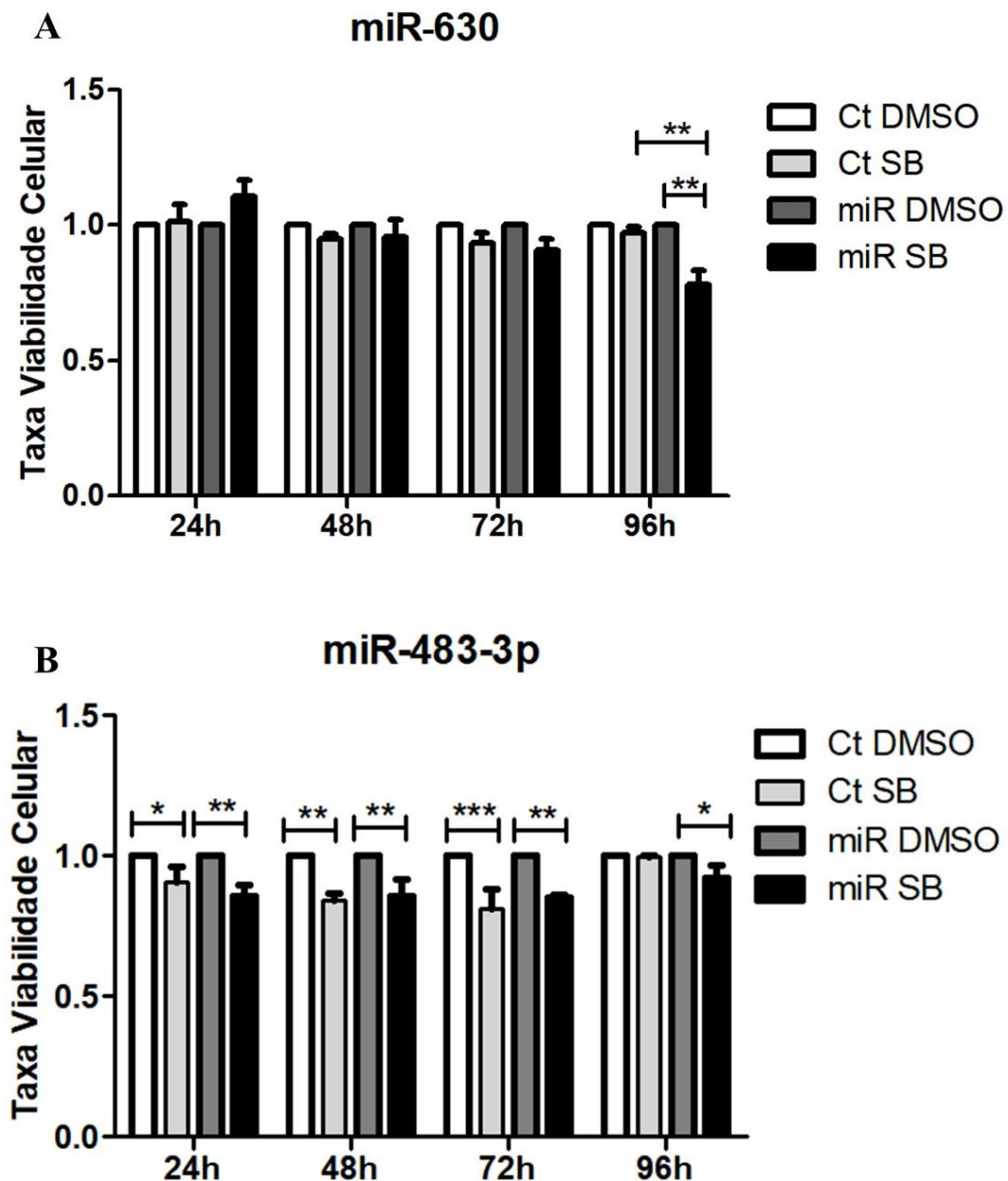


Figura 19. Viabilidade celular após inativação da via TGF- β nas células transduzidas. Ao inibir a via TGF- β com o inibidor SB431542, (A) o aumento do miR-630 na linhagem contribuiu para que houvesse uma queda da viabilidade celular no tempo de 96 horas ($P < 0,001$). (B) O tratamento com o inibidor permitiu queda da viabilidade celular tanto na linhagem controle como naquela com o miR-483-3p silenciado, nos tempos de 24,48 e 72 horas ($P < 0,05$); porém, em 96 horas a combinação do silenciamento do miR-483-3p com o tratamento com inibidor permitiu redução da viabilidade celular ($P < 0,05$). Esses dados foram avaliados através do teste One-way ANOVA, e foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$, representados por *.

Para avaliar o efeito da combinação da inativação da via com a hiperexpressão do miR-630 e silenciamento do miR-483-3p na capacidade de formação de colônias, foi realizado um ensaio de clonogenicidade. Foi observado que a hiperexpressão do miR-630 juntamente com o inibidor Sb431542 permitiu uma menor capacidade de formação de colônias das células em

relação as células também tratadas com o inibidor, mas com os níveis normais do miR-630 ($P=0,034$) (Figura 20A). No entanto, o silenciamento do miR-483-3p em conjunto com o tratamento com o inibidor, SB431542, não apresentou diferenças significativas na capacidade de formação das colônias (Figura 20B). As fotos das colônias estão apresentadas no apêndice 8.

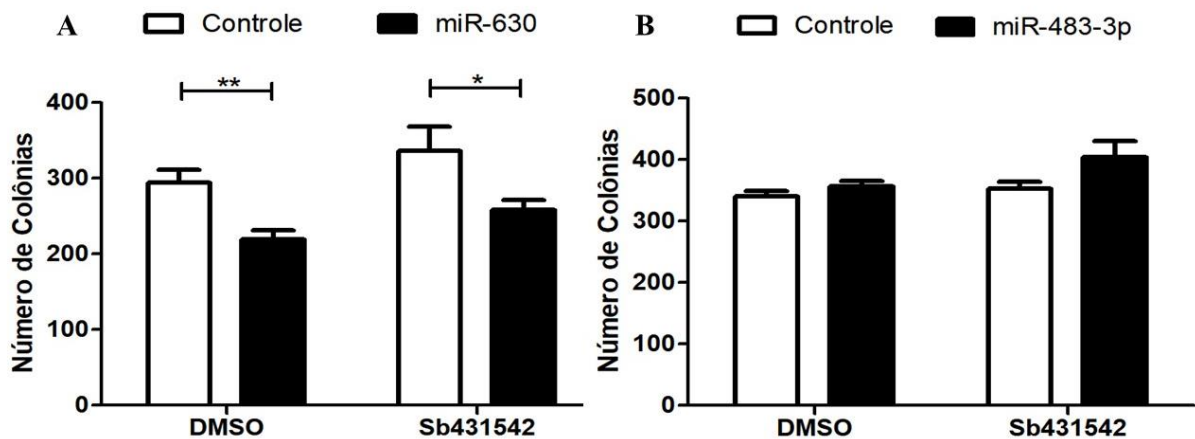


Figura 20. Capacidade clonogênica após inativação da via TGF-β nas células transduzidas. Ao combinar a inativação da via TGF-β com a hiperexpressão do miR-630 foi observado que (A) houve menor capacidade de formação de colônias quando a linhagem está com o mmiR-630 hiperexpresso e tratada com o inibidor ($P=0,034$). (B) Já para o miR-483-3p, não houve diferença na capacidade das células de formarem colônias ($P>0,05$). Esses resultados foram avaliados através do teste Oneway-ANOVA seguido do pós-teste de Bonferroni. Foram realizados 3 experimentos independentes e foram considerados significativos os valores de $P\leq 0,05$.

7.11. Expressão proteica nas linhagens transduzidas e tratadas com inibidor da via TGF-β.

Após perceber que a modificação da expressão dos miRNAs combinada com a inativação da via teve um efeito no comportamento celular, foi investigado como estava a expressão de algumas proteínas da via TGF-β após esses procedimentos. Foram avaliadas as proteínas N-caderina, Vimentina, Smad3, Smad3-fosforilado (pSmad3) e Smad 2/3.

Como podemos observar na Figura 21, o tratamento com o inibidor SB431542 ocasionou aumento da expressão de Smad3, Smad 2/3, Vimentina e N-caderina, na linhagem controle do miR-630. Porém, ao combinar esse tratamento com o aumento da expressão do miR-630, foi possível observar uma inversão desse efeito; ou seja, essas proteínas tiveram sua expressão diminuída, com exceção de Smad3. Não foi possível identificar a marcação da proteína pSmad3 nesse ensaio para essa linhagem.

Ao realizar a mesma análise, na linhagem H295R com o miR-483-3p silenciado, observamos que pSmad3, Smad 2/3 e N-caderina apresentam uma leve diminuição quando tratamos a linhagem com o inibidor, o que não ocorre com Smad3 e Vimentina, que apresenta aumento de sua expressão (Figura 22).

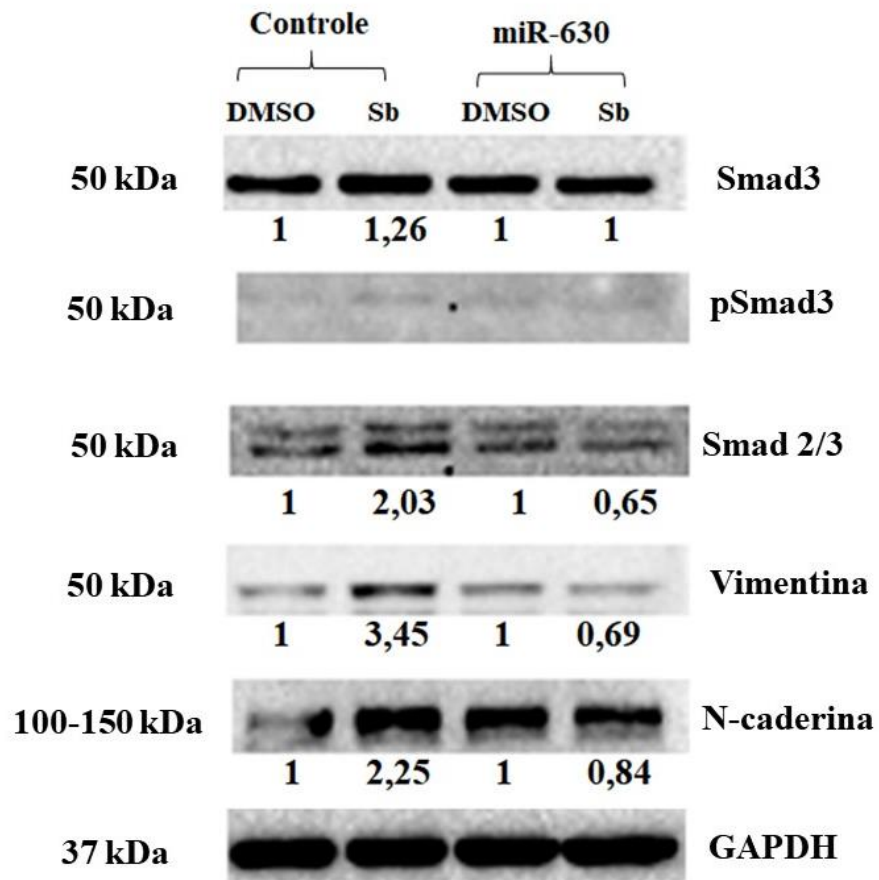


Figura 21. Quantificação de proteínas após inativação da via TGF- β na H295A. Com esse ensaio observamos que o aumento das proteínas observados na linhagem controle após o tratamento com o inibidor Sb431542, foi revertido na linhagem com o miR-630 aumentado, mostrando que a ação desse miRNA contribui para que o inibidor exerça sua função de inativação da via TGF- β .

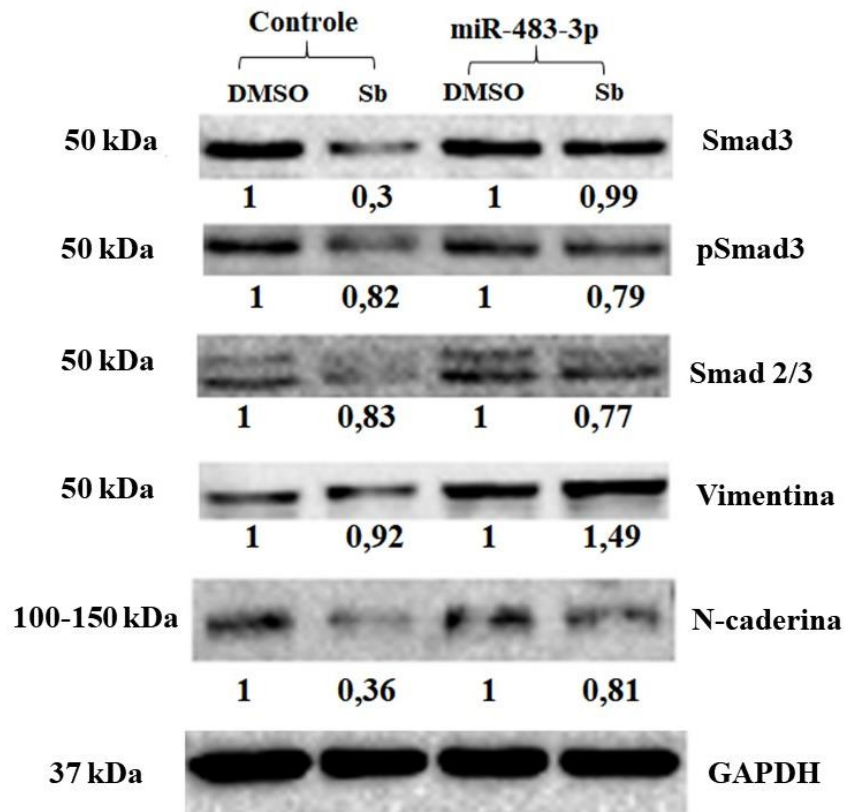


Figura 22. Quantificação de proteínas após inativação da via TGF- β na H295R. Ao tratar a H295R com o inibidor da via TGF- β ocorre diminuição da expressão de todas as proteínas avaliadas. Porém, ao combinar esse tratamento com o silenciamento do miR-483-3p houve aumento de Smad3, N-caderina e Vimentina; enquanto pSmad3 e Smad 2/3 apresentaram uma leve queda na expressão.

8. DISCUSSÃO

O carcinoma adrenocortical é uma doença rara, agressiva, cujos pacientes pediátricos geralmente apresentam um prognóstico desfavorável, alcançando uma taxa de sobrevida livre de eventos em 5 anos de aproximadamente 54-77% (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). A maioria dos pacientes apresenta recidiva local ou metástase em outros tecidos após a cirurgia. Além disso, existe um grande desafio em classificar esses tumores em malignos ou benignos baseando-se em parâmetros histológicos (NAKAMURA; YAMAZAKI; FELIZOLA; ISE *et al.*, 2015; WAJCHENBERG; ALBERGARIA PEREIRA; MEDONCA; LATRONICO *et al.*, 2000; WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003). Tendo em vista que o único tratamento eficiente para esse tipo de tumor é a completa ressecção cirúrgica e que muitos pacientes ainda vêm a óbito devido à essa malignidade (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004), crescem as buscas por novas terapias, que focam no entendimento da biologia tumoral, procurando entender o comportamento dessas células malignas para então impedir ou retardar o crescimento das mesmas. Nesse contexto, o estudo do papel dos miRNAs no câncer e no TAC vem crescendo, visto que já se sabe que essas moléculas exibem um padrão de expressão tecido-específica, podendo assim desempenhar um papel crítico no desenvolvimento, função e manutenção de tecidos e órgãos. Além disso, os miRNAs variam sua expressão de acordo com a progressão da doença, auxiliando na diferenciação dos estágios tumorais (LAN; LU; WANG; JIN, 2015) e nas respostas às terapias (ACUNZO; ROMANO; WERNICKE; CROCE, 2015). Cada miRNA pode ter como alvo centenas de genes, portanto, é de se esperar que eles regulam uma infinidade de mecanismos biológicos básicos, como o controle do ciclo celular, apoptose, proliferação celular, diferenciação, migração, invasão; mecanismos esses que afetam a biologia do câncer (CHERRADI, 2015).

Devido a raridade dos TAC, a compreensão da importância dos miRNAs nessa doença ainda está no início, com o número de genes alvos validados para miRNAs em TAC permanecendo muito limitado (AGOSTA; LAUGIER; GUYON; DENIS *et al.*, 2018; CARAMUTA; LEE; OZATA; AKÇAKAYA *et al.*, 2013; DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010; GLOVER; ZHAO; GILL; WEISS *et al.*, 2015; KWOK; ZHAO; GLOVER; GILL *et al.*, 2019; WU; WANG; HU; XU *et al.*, 2015; ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011). Sendo assim, análises dos mecanismos de desregulação dos miRNAs e seu papel na expressão gênica nesse tipo tumoral ainda precisam ser elucidadas.

Alguns estudos já foram realizados avaliando a expressão de miRNAs em TAC (CHERRADI, 2015) e, inclusive, já foi identificada a expressão desregulada do miR-483-3p nesse tumor (DUREGON; RAPA; VOTTA; GIORCELLI *et al.*, 2014; FEINMESSER; BENBASSAT; MEIRI; BENJAMIN *et al.*, 2015; KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017; WANG; SUN; WU; ZHAO *et al.*, 2014; ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011). No entanto, nenhum desses estudos investigou mais a fundo o papel desse miRNA nos tumores pediátricos, relacionando sua expressão com possíveis genes e vias de desenvolvimento, além do seu possível papel como marcador prognóstico. Por estar localizado na mesma região cromossômica do gene *IGF2*, o gene mais expresso em TAC (SOON; TACON; GILL; BAMBACH *et al.*, 2009), o miR-483-3p demonstra ser um importante alvo para ser melhor compreendido.

Foi mostrado aqui que o miR-483-3p apresenta expressão aumentada em amostras de TAC pediátricos em relação a amostras não neoplásicas, e que essa maior expressão está associada a um melhor prognóstico nesses pacientes avaliados, ou seja, com melhor SLE, estádios iniciais da doença e ausência de metástase. Além disso, o miR-483-3p apresentou correlações negativas com diversos genes que poderiam contribuir para a progressão tumoral, como *TGFBI*, *SMAD3*, *GSK3β*, *AXIN2* e *MYC*. Esses dados, nos levam a supor que o miR-483-3p pode funcionar como um biomarcador na estratificação dos pacientes e que sua desregulação pode contribuir para o valor prognóstico.

O miR-483-3p já foi estudado em alguns tipos de tumores, como por exemplo em adenocarcinoma ductal de pâncreas, no qual esse miRNA foi encontrado com uma expressão aumentada tanto no plasma como no tecido tumoral de pacientes, e apresentou como alvo o gene *SMAD4* (ABUE; YOKOYAMA; SHIBUYA; TAMAI *et al.*, 2015; HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011; WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015). Além disso, embora a hiperexpressão desse miRNA não tenha sido associada a idade, gênero, tamanho tumoral e metástase nos pacientes; essa maior expressão em amostras tumorais de pâncreas foi associada a uma pior sobrevida (WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015), o que não foi visto na nossa casuística de amostras de TAC pediátricos. Em tumor de Wilms, o miR-483-3p também foi descrito com uma expressão aumentada (LIU; ROTH; YU; MORRIS *et al.*, 2013; VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010), assim como em câncer de cólon e fígado (CUI; LIU; JIANG; YANG *et al.*, 2016; VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010). Por outro lado, o único estudo que descreve esse miRNA com uma baixa expressão, foi realizado recentemente em câncer de mama, no qual exerce sua função através da regulação do

oncogene *HDAC8* (MENBARI; RAHIMI; AHMADI; MOHAMMADI-YEGANEH *et al.*, 2020).

Alguns estudos já identificaram uma alta expressão do miR-483-3p em amostras de pacientes adultos com carcinomas adrenal em relação a amostras de adrenal normal ou adenomas (DUREGON; RAPA; VOTTA; GIORCELLI *et al.*, 2014; FEINMESSER; BENBASSAT; MEIRI; BENJAMIN *et al.*, 2015; KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017; WANG; SUN; WU; ZHAO *et al.*, 2014; ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011). Esses estudos mostram que a hiperexpressão do miR-483-3p encontrada em carcinomas adultos parece contribuir para que as células cancerígenas não sofram apoptose, através da repressão da expressão de *PUMA*, um gene pró-apoptótico (WANG; SUN; WU; ZHAO *et al.*, 2014). Além disso, é sugerido que esse miRNA é um bom marcador para o diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas em adultos (KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017; PEREIRA; MONTEIRO; ANTONINI; PIGNATELLI, 2019).

Em pacientes pediátricos, o miR-483-3p também já foi identificado com uma expressão aumentada e sua menor expressão foi associada aos pacientes que apresentaram recidiva (DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010); o que está de acordo com o que foi encontrado na nossa casuística, onde a menor expressão do miR-483-3p foi relacionada com pior SG, presença de metástase, ocorrência de óbito e estadio mais avançado da doença. Dados esses avaliados em 67 amostras tumorais de pacientes, sendo que Doghman e colaboradores utilizaram apenas 25 amostras (DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010). Portanto, nossos achados levam a supor que os pacientes que têm menor expressão desse miRNA, podem ter uma pior evolução da doença.

O miR-630, apesar de não ter apresentado diferença na expressão entre amostras tumorais de TAC e amostras não neoplásicas na nossa casuística, mostramos que esse miRNA também pode ter um papel de marcador prognóstico, visto que sua maior expressão foi associada a pior SLE, estadios mais avançados da doença, presença de recidiva e óbito, além de apresentar correlação positiva com *TGFBR1* e negativa com *GSK3β* e *MYC*. O miR-630 já foi estudado em diversos tumores e exerce papéis diferentes de acordo com o microambiente.

Assim, em câncer gástrico (CHU; ZHAO; LI; LI *et al.*, 2014), câncer colorretal (CHU; ZHENG; LI; LI *et al.*, 2014), câncer renal (CHEN; QIN; LEI; YE *et al.*, 2019; ZHAO; CHEN; DUAN; LI *et al.*, 2014), mieloma múltiplo (BI; CHUNG; HUANG; ZHOU *et al.*, 2015), câncer hepatocelular (ZHANG; LI; ZENG; ZHANG *et al.*, 2015), câncer de ovário (ZHANG; ZHANG; LU; WANG *et al.*, 2017; ZOU; GAO; WANG; WANG *et al.*, 2015) e de bexiga

(WANG; ZHANG; YANG; SONG *et al.*, 2016), esse miRNA já foi descrito como hiperexpresso nas amostras tumorais em relação aos controles. E a hiperexpressão do miR-630 foi associada com maior grau histológico e pior sobrevida dos pacientes com câncer de bexiga (WANG; ZHANG; YANG; SONG *et al.*, 2016) e com maior estágio e tamanho tumoral em cancer de ovário (ZOU; GAO; WANG; WANG *et al.*, 2015) e câncer hepatocelular (ZHANG; LI; ZENG; ZHANG *et al.*, 2015). No câncer renal (ZHAO; CHEN; DUAN; LI *et al.*, 2014), colorretal (CHU; ZHENG; LI; LI *et al.*, 2014) e gástrico (CHU; ZHAO; LI; LI *et al.*, 2014), a hiperexpressão do miR-630 foi associada com maior grau histológico, presença de metástase e pior sobrevida, ou seja, para esses tumores, a associação do miR-630 com o prognóstico dos pacientes parece estar de acordo com os resultados aqui obtidos para o TAC, onde encontramos que a hiperexpressão do mesmo miRNA foi associada com pior prognóstico dos pacientes avaliados.

Por outro lado, o miR-630 também é descrito com menor expressão em câncer de mama (CORCORAN; RANI; BRESLIN; GOGARTY *et al.*, 2014; ZHOU; WANG; YU; WANG *et al.*, 2016), câncer de pulmão de células não pequenas (SONG; HONG; LIU; LIN *et al.*, 2015), carcinoma esofágico de células escamosas (JIN; YI; GAO; HAN *et al.*, 2016), tumor de tireoide (PAN; HE; YANG; JIA *et al.*, 2019) e osteossarcoma (LI; YAN, 2019). Porém, para osteossarcoma e carcinoma esofágico o miR-630 se comporta de maneira diferente do que foi visto para TAC pediátrico, ou seja, sua hipoexpressão foi relacionada com pior prognóstico, englobando presença de metástase, maior tamanho tumoral, estágio mais avançado em câncer esofágico (JIN; YI; GAO; HAN *et al.*, 2016) e presença de metástase e estágios mais avançados em osteossarcoma (LI; YAN, 2019). Mostrando que o miR-630 parece ser um importante marcador de prognóstico tumor-específico, podendo agir como um oncogene ou supressor tumoral dependendo do contexto celular em que está inserido. No entanto, esse miRNA nunca foi avaliado nos tumores adrenocorticais, nem adultos e nem pediátricos. Sendo esse estudo, portanto, o primeiro a avaliar o comportamento do miR-630 nesses tumores.

Assim, observamos que não existem dados ainda que forneçam um melhor entendimento do papel desses miRNAs na biologia do TAC, visto que é importante entender o mecanismo que está sendo alterado devido a expressão desregulada encontrada, assim como entender a cascata de desregulação ocasionada pelo aumento e diminuição da expressão desses miRNAs nos processos celulares. Adicionalmente, nenhum estudo anterior aprofundou suas análises para os possíveis alvos do miR-630 e miR-483-3p e as possíveis implicações em importantes vias de sinalização, como a via TGF- β , para o desenvolvimento dos tumores adrenocorticais. Para que isso fosse possível, utilizamos ensaios de modulação *in vitro*, em

linhagens celulares, para entender o que essa desregulação de miRNAs implica no contexto celular dos tumores de adrenal.

Sabe-se, no entanto, que uma limitação para estudar esses tumores em crianças é a ausência de uma linhagem celular proveniente de pacientes pediátricos; sendo a única linhagem existente, a H295. Essa linhagem foi derivada de uma amostra tumoral de uma mulher de 48 anos, diagnosticada com altos níveis hormonais na urina e no sangue e, grande massa na adrenal. Histologicamente, essa região apresentava aparência típica de tumor maligno. Um ano após esse diagnóstico, a paciente já apresentava metástase no pulmão e fígado. O tratamento utilizado foi o mitotano e acetato de cortisona. Essas células foram cultivadas em meio RPMI 1640, suplementada com ITS (insulina, transferrina e selênio) e 2% de soro fetal bovino; e apresentaram variadas anormalidades cromossômicas, além de manterem a secreção de esteroides (GAZDAR; OIE; SHACKLETON; CHEN *et al.*, 1990).

Alguns anos depois, essa linhagem celular foi adquirida da ATCC (*American Type Culture Collection*), e devido ao *doubling time* de aproximadamente 96 horas e a dificuldade de se trabalhar com essas células, houve uma seleção apenas das células que se aderiam à placa de cultura e que cresciam em uma monocamada (RAINEY; BIRD; MASON, 1994). Essas células selecionadas foram denominadas H295R, para diferenciá-las das originais, H295 (RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004). A H295R é cultivada em meio DMEM-F12, suplementado com 1% de ITS e Nu-Serum e quando comparada a original, apresentou redução do *doubling time* para 48hrs. Essa é a linhagem celular reconhecida e comercializada pela ATCC (RAINEY; SANER; SCHIMMER, 2004). Da mesma maneira, as células aderidas da H295 foram selecionadas por outro grupo de pesquisa para estudo de alguns genes de esteroidogênese, dando origem ao que chamaram de H295A. Os ensaios de expressão gênica que foram realizados, mostraram que não houve diferenças entre a H295 e a H295A quanto as enzimas metabolizadoras de esteroides (RODRIGUEZ; HUM; STAELS; MILLER, 1997). No entanto, foi observado que a H295A produz mais mineralocorticoides, enquanto a H295R produz mais hormônios androgênicos e testosterona, porém a produção de cortisol foi a mesma em ambas (SAMANDARI; KEMPNA; NUOFFER; HOFER *et al.*, 2007).

De acordo com essas descrições, optamos por realizar a modulação de ambos os miRNAs de interesse nas duas linhagens, H295A e H295R. Porém, não foi possível a conclusão da transdução do miR-630 na H295R e do miR-483-3p na H295A. Existem duas estratégias baseadas em miRNAs, que foram utilizadas no presente estudo, conhecidas como terapia de substituição, restauração ou hiperexpressão, pois mimetizam o papel do miRNA; e a terapia de redução, inibição ou regulação negativa, pois antagonizam o papel do miRNA (EBERT;

SHARP, 2010; MITCHELL; PARKIN; KROH; FRITZ *et al.*, 2008). De uma maneira geral, o uso de lentivírus tem mostrado eficácia para aumentar ou diminuir a expressão de miRNAs em células tumorais. No entanto, o uso *in vivo*, deve ser realizado com cautela, pois a replicação viral pode ser um risco para o desenvolvimento de outros distúrbios (MOLLAEI; SAFARALIZADEH; ROSTAMI, 2019).

Portanto, foi mostrado nesse estudo que o silenciamento do miR-483-3p por vetor lentiviral promoveu queda da viabilidade celular após 96 horas e aumento da expressão dos genes *TGFBR2* e *SMAD7*, além do aumento da expressão das proteínas Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. Esses achados indicam que a expressão diferencial do miR-483-3p pode contribuir para a desregulação da via TGF- β , visto que temos um aumento das proteínas envolvidas nessa via de sinalização e também na via de TEM; mas que nem esse miRNA, bem como a via TGF- β , agem sozinhos na progressão dos TAC. Portanto, outros mecanismos não investigados aqui poderiam estar contribuindo para a queda da viabilidade encontrada.

O silenciamento do miR-483-3p já foi realizado em algumas linhagens celulares de tumores de rim, carcinoma hepatocelular e câncer de cólon (VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010), pâncreas (HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011; WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015), carcinoma esofágico de células escamosas (MA; HONG; XU; HAO *et al.*, 2016), câncer colorretal (CUI; LIU; JIANG; YANG *et al.*, 2016) e tumor de Wilms (CHE; GAO; TIAN; HU *et al.*, 2019). Essa inibição foi relacionada a diminuição da viabilidade celular, diminuição do crescimento celular, aumento de apoptose, menor formação de colônias e menor taxa de migração nesses tumores, de uma maneira geral (CHE; GAO; TIAN; HU *et al.*, 2019; CUI; LIU; JIANG; YANG *et al.*, 2016; HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011; MA; HONG; XU; HAO *et al.*, 2016; VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010; WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015).

Ozata e colaboradores também estudaram o silenciamento do miR-483-3p na H295R (ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011) e relatam diminuição na proliferação celular; da mesma forma que observamos queda na viabilidade. No entanto, não abordam outros ensaios funcionais, como a capacidade de formação de colônias e taxa de migração celular, bem como a relação do miR-483-3p com vias de desenvolvimento, como a via TGF- β , em tumores adrenocorticais. Justificando a importância de se fazer mais estudos funcionais com esse miRNA.

Para o miR-630, foi observado que o aumento de sua expressão na H295A foi capaz de reduzir a viabilidade celular já em 24 horas, assim como reduzir a capacidade dessas células de formarem colônias. Além disso, o aumento da expressão do miR-630 promoveu aumento da

expressão de *TGFBR1* e aumento da expressão das proteínas Smad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. Os mesmos efeitos observados com o silenciamento do miR-483-3p, indicando que apesar de serem miRNAs diferentes, podem atuar nos mesmos processos celulares, contribuindo para a progressão tumoral de TAC, quando desregulados. E diferente do miR-483-3p, o miR-630 nunca foi estudado em TAC; embora, estudos foram feitos aumentando sua expressão em linhagens celulares de outros tumores.

Em câncer de pulmão, a hiperexpressão do miR-630 promoveu inibição da proliferação, migração e invasão celular (SONG; HONG; LIU; LIN *et al.*, 2015). O mesmo foi visto em câncer de mama (GONG; YU; TANG; WANG *et al.*, 2018; ZHOU; WANG; YU; WANG *et al.*, 2016), carcinoma esofágico de células escamosas (JIN; YI; GAO; HAN *et al.*, 2016) e câncer gástrico (FENG; WANG; ZHU; CHEN *et al.*, 2017; LI; TIAN; JIN, 2018) onde a hiperexpressão desse miRNA permitiu a queda de migração e invasão celular, assim como menor formação de colônias. No câncer colorretal, o aumento do miR-630 ocasionou aumento da viabilidade e diminuição da apoptose nas linhagens celulares (ZHANG; FENG; ZHANG; DING *et al.*, 2017); assim como no câncer de ovário, no qual houve aumento da proliferação e migração celular (EOH; LEE; KIM; LEE *et al.*, 2018; ZHANG; ZHANG; LU; WANG *et al.*, 2017). Em osteossarcoma, o aumento do miR-630 em linhagens celulares levou a uma inibição do crescimento celular, menor formação de colônias, queda na migração e invasão, maior apoptose e a não ativação da via de TEM (LI; YAN, 2019). No câncer de tireoide, a maior expressão do miR-630 também contribuiu para a queda na proliferação, aumento da apoptose e diminuição da migração e invasão celular (PAN; HE; YANG; JIA *et al.*, 2019).

Em carcinoma hepatocelular foi relatado que a hiperexpressão do miR-630 em linhagens celulares não interferiu no crescimento celular; porém, permitiu a diminuição da migração e invasão, assim como a inativação do processo de TEM (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016), ou seja, houve diminuição de Vimentina e N-caderina após hiperexpressão do miR-630 nessas células (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016); de maneira oposta ao que encontramos em adrenal. Onde foi visto um aumento de Vimentina e N-caderina, após hiperexpressão desse miRNA, caracterizando um fenótipo mesenquimal, apesar de não termos encontrado aumento significativo na taxa de migração dessas células. Além disso, Chen e colaboradores não encontraram queda na viabilidade celular e capacidade de formação de colônias. Todos esses relatos mostram que o miR-630 apresenta funções variadas e específicas, agindo de acordo com microambiente tumoral em que está inserido, tendo sempre que ser avaliado em cada caso especificamente.

Além disso, a expressão diferenciada de genes e proteínas da via TGF- β após a modulação de ambos os miRNAs nos indicam uma possível associação entre os miRNAs e a via; visto que, a regulação gênica exercida pelos miRNAs integra o controle da expressão gênica exercida pela família TGF- β (BLAHNA; HATA, 2012; 2013). Como um único miRNA é capaz de modular mais de 100 mRNAs ao mesmo tempo (BLAHNA; HATA, 2013), a regulação de alguns miRNAs pode afetar a expressão de centenas de genes e contribuir para desfechos biológicos tecido e tempo específicos mediados pela via TGF- β .

Assim, da mesma maneira que relatado aqui, o miR-483-3p também foi relacionado com marcadores de TEM em um estudo com tumor de Wilms (CHE; GAO; TIAN; HU *et al.*, 2019). No entanto, contrariamente, o silenciamento desse miRNA em linhagens celulares ocasionou diminuição na expressão de N-caderina e Vimentina (CHE; GAO; TIAN; HU *et al.*, 2019), enquanto para os TAC encontramos aumento dessas mesmas proteínas. Essas diferenças encontradas são esperadas, visto que são tumores diferentes, e um mesmo miRNA por ter diversos genes alvos, podendo desencadear respostas diferentes, dependendo do tecido avaliado.

Além disso, em câncer de pâncreas, o miR-483-3p tem como alvo o gene *SMAD4*, cuja expressão é inversamente proporcional a expressão desse miRNA em amostras tumorais de pacientes (HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011), indicando que o miR-483-3p pode estar envolvido na desregulação da via TGF- β também em câncer de pâncreas. Da mesma maneira, o miR-630 também influencia no funcionamento dessa via, em câncer hepatocelular, no qual tem como alvo, o gene *SLUG* (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016). O que indica que a desregulação de ambos os miRNAs influenciam no funcionamento da via TGF- β .

De uma maneira geral, a via TGF- β também pode regular a expressão de miRNAs através da atividade do complexo de Smads que se liga ao DNA; e também, através da ligação desse mesmo complexo ao próprio miRNA (HATA; CHEN, 2016). Além disso, as proteínas Smads promovem o processamento de um grupo de miRNAs, auxiliando na sua expressão (BLAHNA; HATA, 2012; DAVIS; HILYARD; LAGNA; HATA, 2008; DAVIS; HILYARD; NGUYEN; LAGNA *et al.*, 2010). Esses relatos nos levam a hipótese de que os TAC podem apresentar essas expressões diferenciadas de miRNAs por uma alteração no funcionamento da via TGF- β , sendo, portanto, um processo de mão dupla, onde um mecanismo pode interferir no outro. Com as investigações apresentadas aqui, não podemos concluir que a via TGF- β interfere no funcionamento do miR-483-3p e miR-630; sendo necessárias maiores investigações para indicar essa interação. No entanto, sabemos que as células apresentam diversas cascatas de sinalização e regulações exercidas por genes, RNAs não codificadores de proteínas, pelas

próprias proteínas e influências do meio ambiente, o que nos faz pensar que todos esses processos podem ocorrer simultaneamente, ou seja, é possível que a expressão alterada de miRNAs desencadeie alterações em vias de desenvolvimento; assim como, a desregulação de vias pode alterar a expressão dos miRNAs.

Em seguida, para melhor entender essas relações em TAC, optamos por utilizar um inibidor da via TGF- β , o SB431542, responsável por inibir a ação do TGFBR1 (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016; INMAN; NICOLÁS; CALLAHAN; HARLING *et al.*, 2002; SILJAMÄKI; RAPPU; RIIHILÄ; NISSINEN *et al.*, 2019).

Primeiramente observamos que a combinação da hiperexpressão do miR-630 com a inibição da via promoveu queda na viabilidade celular e menor capacidade de formação de colônias; o que nos leva a hipótese de que, se feita uma estratificação dos pacientes, aqueles que tem maior expressão do miR-630, poderiam apresentar melhora no prognóstico, caso sejam tratados com um inibidor da via TGF- β . Porém, são investigações iniciais, necessitando de mais estudos para concluir essa relação. O único estudo que relaciona a ação do miR-630 com este inibidor, foi realizado em carcinoma hepatocelular, no qual a expressão do miR-630 é aumentada em linhagens celulares de carcinoma hepatocelular tratadas com o SB431542 (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016), no entanto, não foi feita essa investigação no presente estudo. Já a combinação do silenciamento do miR-483-3p com a inativação da via não parece ser tão eficaz, visto que promoveu diferença apenas na viabilidade celular, mas não na capacidade de formação de colônias. A ação do miR-483-3p nunca foi relacionada ao composto SB431542, sendo essa relação descrita aqui pela primeira vez. Comparando os resultados obtidos dessa combinação de terapias, o miR-630 aumentado parece responder melhor ao tratamento com o SB431542, do que o silenciamento do miR-483-3p. Não podemos esquecer, no entanto, que cada um deles foi estudado em uma linhagem, H295A e H295R, respectivamente.

Somado a isso, a expressão de proteínas da via TGF- β e de TEM parece sofrer alterações após a combinação dessas terapias. Assim, o aumento da expressão do miR-630 juntamente com a inibição da via TGF- β promove queda de Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. Indicando mais uma vez um efeito satisfatório dessa combinação. Para o silenciamento do miR-483-3p, no entanto, apesar de haver diminuição de pSmad, Smad 2/3 e N-caderina, após o tratamento com inibidor, essa diminuição não parece ser tão satisfatória; além de haver aumento de Vimentina.

Embora a inibição da via TGF- β resulte em redução de metástase em alguns modelos, clinicamente os efeitos não são tão óbvios assim. Sugerindo que uma combinação de terapias

pode aumentar o efeito da inibição dessa via (GU; FENG, 2018). Assim, grandes esforços podem envolver a combinação de medicamentos com radiação, quimioterapia, terapias alvo-específicas e imunoterapias. Ainda assim, levando em consideração que as respostas terapêuticas e toxicológicas entre os pacientes são muito variáveis, o desenvolvimento de biomarcadores preditivos é de extrema importância (GU; FENG, 2018). Portanto, baseado nos nossos achados, podemos sugerir que o miR-630 está mais envolvido na desregulação da via TGF- β , do que o miR-483-3p.

Por fim, ao observarmos a inibição da via TGF- β , independente dos miRNAs, encontramos que o tratamento ocasionou aumento de Smad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina na linhagem H295A. Uma hipótese para explicar esses achados seria que, apenas a inativação da via com o inibidor SB431542 pode desencadear algum mecanismo compensatório na via TGF- β que pode explicar o aumento das proteínas encontradas, como por exemplo, a ativação de vias não canônicas, independentes de Smads. No entanto, ao aumentar a expressão do miR-630 nessas células, esse mecanismo de escape é perdido, visto que temos diminuição dessas mesmas proteínas. Porém, maiores investigações devem ser feitas para confirmar esses achados.

De maneira contrária, o tratamento da linhagem H295R promoveu diminuição de Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina; não tendo intensificação do efeito ao silenciar essa linhagem com o miR-483-3p. Além disso, esses dados mostram que ambas as linhagens, H295A e H295R, podem apresentar comportamentos diferentes e respostas diferentes frente aos mesmos estímulos. Embora já tenha havido um estudo cuja linhagem H295R foi tratada com o mesmo inibidor, SB431542, não houve investigação da via TGF- β e sua relação com TEM; apenas com a expressão do gene *CYP17* (DEREBECKA-HOLYSZ; LEHMANN; HOLYSZ; TRZECIAK, 2009).

Em muitos cânceres, TGF- β induz a TEM regulando E-caderina, N-caderina e Vimentina (MOUSTAKAS; HELDIN, 2016; MOUSTAKAS; HELDIN, 2014). Essa via é responsável por promover características mesenquimais e progressão tumoral em câncer de mama (VERVOORT; LOURENÇO; VAN BOXTEL; COFFER, 2013) e, também está relacionada com motilidade celular, disseminação e metástase regulando a expressão de integrinas em câncer de mama e de pulmão (BAE; HONG; PARK; KWON *et al.*, 2016; PARVANI; GUJRATI; MACK; SCHIEMANN *et al.*, 2015). Em cancer de próstata, TGF- β desencadeia metástase através da repressão de E-caderina e promoção da expressão de N-caderina (SHIOTA; ZARDAN; TAKEUCHI; KUMANO *et al.*, 2012; THAKUR; GUDEY; MARCUSSON; FU *et al.*, 2014).

Já o tratamento com SB431542 promove diminuição de N-caderina e Vimentina em linhagens celulares de câncer esofágico (PANG; LI; WEI; ZOU *et al.*, 2014), câncer colorretal (LI; ZONG; SHI; LI *et al.*, 2016; WANG, 2015), câncer de fígado (PARK; CHA; JANG; BAE *et al.*, 2016), câncer de pulmão (WANG; WANG; SUN; REN *et al.*, 2017), câncer de mama (LU; WANG; LI; LI *et al.*, 2017), câncer de bexiga (ZHOU; LIU; DENG; XIE *et al.*, 2019) e melanoma (FENG; JIA; GAO; TANG *et al.*, 2019). Também promove a diminuição de pSmad2 e pSmad3 em câncer de mama (GONG; SUN; SUN; ZHAO *et al.*, 2017; LU; WANG; LI; LI *et al.*, 2017) e de pSmad2 em câncer esofágico (PANG; LI; WEI; ZOU *et al.*, 2014) e carcinoma cutâneo de células escamosas (SILJAMÄKI; RAPPU; RIIHILÄ; NISSINEN *et al.*, 2019). Além disso, esse inibidor foi capaz de diminuir a proliferação celular em osteossarcoma (MATSUYAMA; IWADATE; KONDO; SAITOH *et al.*, 2003), em mieloma (XI; SHUAI; SHAO, 2017) e melanoma (FENG; JIA; GAO; TANG *et al.*, 2019) e em câncer de mama, a inativação de TGF- β em linhagens celulares não afeta a tumorigênese, mas impede o desenvolvimento de metástase (TANG; VU; BOOKER; SANTNER *et al.*, 2003).

Esse estudo mostra que existe uma relação entre o papel do miR-483-3p e do miR-630 na via TGF- β e no processo de TEM. A via TGF- β regula uma grande quantidade de processos fisiológicos que variam desde o desenvolvimento embrionário e morfogênese tecidual, diferenciação e sobrevivência celular, e ainda a homeostase celular e de órgãos. Também é responsável pela inibição da proliferação de células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas (TIAN; NEIL; SCHIEMANN, 2011; WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012). Portanto, por ser uma via tão importante em tantos processos, qualquer desregulação na sua sinalização está relacionada com a iniciação, desenvolvimento e progressão de várias doenças, como doenças autoimunes e câncer (MASSAGUÉ, 2008).

No entanto, é preciso levar em consideração o contexto celular e microambiente para dizer se essa via está agindo como supressor tumoral ou se está apresentando um papel oncogênico. À medida que os carcinomas evoluem e adquirem fenótipos metastáticos, as funções de supressor tumoral de TGF- β são invertidas, e a via passa a exercer um papel oncogênico, favorecendo o crescimento, invasão e metástase. Esse fenômeno, conhecido como paradoxo do TGF- β , parece estar relacionado a habilidade dessa via em induzir a TEM (TAYLOR; LEE; SCHIEMANN, 2011; TAYLOR; PARVANI; SCHIEMANN, 2010; TIAN; NEIL; SCHIEMANN, 2011; WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012). Esse paradoxo pode também ser explicado pela regulação que essa via exerce na expressão de miRNAs e na ação dos próprios miRNAs na expressão de genes da via TGF- β ; além disso, a desregulação dos miRNAs pode impactar no funcionamento de diversas vias de desenvolvimento diferentes,

devido aos diversos genes que um mesmo miRNA pode regular, além da própria interação entre a via TGF- β e outras vias de sinalização; visto que já foi mostrado que a ligação e interferência entre vias de sinalização exerce um grande impacto durante a embriogênese e aos processos de homeostase e geram respostas biológicas contexto-dependentes (MASSAGUÉ, 2012; MOUSTAKAS; HELDIN, 2009; WEISS; ATTISANO, 2013).

O câncer é uma doença multifatorial e diversos estudos demonstram a expressão desregulada de miRNAs em tumores, sendo assim, o estudo do comportamento dessas moléculas em tumores é de grande importância para entender processos biológicos importantes que contribuem para a desregulação de vias de sinalização que remetem a progressão tumoral. Apesar dos desafios ainda existentes, o impacto dos miRNAs na biologia do câncer é enorme, visto que em duas décadas seu conceito mudou rapidamente desde a sua descoberta inicial para candidatos clínicos promissores. Embora um número considerável de estudos pré-clínicos envolvendo terapêutica com miRNA tenha sido realizado ao longo dos anos, apenas um pequeno número de terapêuticas com miRNA até agora evoluiu para o desenvolvimento clínico (RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Muitas barreiras ainda precisam ser vencidas, no entanto, estudos como esse mostram que os miRNAs são importantes biomarcadores de prognóstico, podendo interferir na resposta ao tratamento, na agressividade tumoral e sobrevida dos pacientes. Demonstramos aqui alguns indícios de que o miR-483-3p e miR-630 influenciam na progressão dos TAC, assim como uma possível associação com a via TGF- β e de TEM. A partir disso, são necessárias maiores investigações para definir e compreender com exatidão o papel desses miRNAs nos TAC para que essa compreensão auxilie no desenvolvimento de novas estratégias de terapias mais eficientes para o tratamento dessas doenças.

9. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos nesse estudo foi possível concluir que o miR-483-3p apresentou expressão aumentada nas amostras de pacientes pediátricos com TAC e nas linhagens celulares H295A e H295R, enquanto o miR-630 não apresentou diferença de expressão entre amostras tumorais e não neoplásicas; mas apresentou expressão diminuída nas linhagens celulares H295A e H295R. Além disso, a expressão de ambos os miRNAs permitiu separar os pacientes conforme alguns parâmetros clínicos, ou seja, a maior expressão do miR-630 foi associada a pior SLE dos pacientes, a estadios mais agressivos, presença de recidiva e óbito; enquanto a menor expressão do miR-483-3p foi associada a pior sobrevida SG, estadios mais avançados, presença de metástase e óbito dos pacientes. A restauração da expressão do miR-630 e o silenciamento da expressão do miR-483-3p induziu a diminuição da viabilidade celular de ambas as linhagens avaliadas, além de promover a expressão diferencial de alguns genes da via TGF- β , entre eles, *TGFBR1*, *TGFBR2* e *SSMAD7*, assim como proteínas dessa mesma via, como Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. E por fim, a inibição da via TGF- β , somada a hiperexpressão do miR-630 e ao silenciamento do miR-483-3p, também contribuiu para a diminuição da viabilidade celular, mas apenas a hiperexpressão do miR-630 promoveu queda na capacidade de formação de colônias, indicando que a combinação da hiperexpressão do miR-630 com a inibição da via TGF- β pode ser uma boa estratégia a ser utilizada, necessitando, porém, de maiores investigações. A inibição da via em combinação com a modulação de ambos os miRNAs, no entanto, contribuiu para a diminuição das proteínas Smad3, pSmad, Smad 2/3, N-caderina e Vimentina. Esses dados sugerem que o miR-483-3p e miR-630 são importantes biomarcadores de prognóstico para esses pacientes, interferindo na expressão de genes envolvidos com a progressão e desenvolvimento tumoral da glândula adrenal. No entanto, maiores investigações e outros estudos são necessários para melhor entender o papel desses miRNAs na biologia desse tumor.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABIVEN, G.; COSTE, J.; GROUSSIN, L.; ANRACT, P. *et al.* Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **J Clin Endocrinol Metab**, 91, n. 7, p. 2650-2655, Jul 2006.
- ABUE, M.; YOKOYAMA, M.; SHIBUYA, R.; TAMAI, K. *et al.* Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. **Int J Oncol**, 46, n. 2, p. 539-547, Feb 2015.
- ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 12, Dec 2016.
- ACUNZO, M.; ROMANO, G.; WERNICKE, D.; CROCE, C. M. MicroRNA and cancer--a brief overview. **Adv Biol Regul**, 57, p. 1-9, Jan 2015.
- ADAM, P.; HAHNER, S.; HARTMANN, M.; HEINRICH, B. *et al.* Epidermal growth factor receptor in adrenocortical tumors: analysis of gene sequence, protein expression and correlation with clinical outcome. **Mod Pathol**, 23, n. 12, p. 1596-1604, Dec 2010.
- AGOSTA, C.; LAUGIER, J.; GUYON, L.; DENIS, J. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. **Int J Cancer**, 143, n. 4, p. 944-957, 08 2018.
- ALLES, J.; FEHLMANN, T.; FISCHER, U.; BACKES, C. *et al.* An estimate of the total number of true human miRNAs. **Nucleic Acids Res**, 47, n. 7, p. 3353-3364, 04 2019.
- ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. **J Clin Endocrinol Metab**, 91, n. 6, p. 2027-2037, Jun 2006.
- ALMEIDA, M. Q.; FRAGOSO, M. C.; LOTFI, C. F.; SANTOS, M. G. *et al.* Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, n. 9, p. 3524-3531, Sep 2008.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431, n. 7006, p. 350-355, Sep 2004.
- ASSIÉ, G.; LETOUZÉ, E.; FASSNACHT, M.; JOUINOT, A. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nat Genet**, 46, n. 6, p. 607-612, Jun 2014.
- ASSUMPÇÃO, J. G.; SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; RIBEIRO, R. C. *et al.* Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer**, 8, p. 357, Dec 2008.
- AUBERT, S.; WACRENIER, A.; LEROY, X.; DEVOS, P. *et al.* Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, 26, n. 12, p. 1612-1619, Dec 2002.

- AYALA-RAMIREZ, M.; JASIM, S.; FENG, L.; EJAZ, S. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. **Eur J Endocrinol**, 169, n. 6, p. 891-899, Dec 2013.
- BAE, G. Y.; HONG, S. K.; PARK, J. R.; KWON, O. S. *et al.* Chronic TGF β stimulation promotes the metastatic potential of lung cancer cells by Snail protein stabilization through integrin β 3-Akt-GSK3 β signaling. **Oncotarget**, 7, n. 18, p. 25366-25376, May 2016.
- BERGADÁ, I.; VENARA, M.; MAGLIO, S.; CIACCIO, M. *et al.* Functional adrenal cortical tumors in pediatric patients: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a long term follow-up series. **Cancer**, 77, n. 4, p. 771-777, Feb 1996.
- BERRUTI, A.; BAUDIN, E.; GELDERBLOM, H.; HAAK, H. R. *et al.* Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, 23 Suppl 7, p. vii131-138, Oct 2012.
- BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; PIA, A.; ANGELI, A. *et al.* Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. **Cancer**, 83, n. 10, p. 2194-2200, Nov 1998.
- BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; SPERONE, P.; PIA, A. *et al.* Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocr Relat Cancer**, 12, n. 3, p. 657-666, Sep 2005.
- BERRUTI, A. E. A. Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients With Radically Resected Adrenocortical Carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 102, n. 4, p. 1358-1365, Apr 2017.
- BI, C.; CHUNG, T. H.; HUANG, G.; ZHOU, J. *et al.* Genome-wide pharmacologic unmasking identifies tumor suppressive microRNAs in multiple myeloma. **Oncotarget**, 6, n. 28, p. 26508-26518, Sep 2015.
- BLAHNA, M. T.; HATA, A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. **FEBS Lett**, 586, n. 14, p. 1906-1912, Jul 2012.
- BLAHNA, M. T.; HATA, A. Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling. **Curr Opin Cell Biol**, 25, n. 2, p. 233-240, Apr 2013.
- BOULLE, N.; LOGIÉ, A.; GICQUEL, C.; PERIN, L. *et al.* Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, n. 5, p. 1713-1720, May 1998.
- BRACKEN, C. P.; LI, X.; WRIGHT, J. A.; LAWRENCE, D. M. *et al.* Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion. **EMBO J**, 33, n. 18, p. 2040-2056, Sep 2014.

- CALIN, G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 24, p. 15524-15529, Nov 2002.
- CALIN, G. A.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, C. D.; HYSLOP, T. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 9, p. 2999-3004, Mar 2004.
- CAO, M. X.; JIANG, Y. P.; TANG, Y. L.; LIANG, X. H. The crosstalk between lncRNA and microRNA in cancer metastasis: orchestrating the epithelial-mesenchymal plasticity. **Oncotarget**, 8, n. 7, p. 12472-12483, Feb 2017.
- CARAMUTA, S.; LEE, L.; OZATA, D. M.; AKÇAKAYA, P. *et al.* Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, 20, n. 4, p. 551-564, Aug 2013.
- CHABRE, O.; LIBÉ, R.; ASSIE, G.; BARREAU, O. *et al.* Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. **Endocr Relat Cancer**, 20, n. 4, p. 579-594, Aug 2013.
- CHE, G.; GAO, H.; TIAN, J.; HU, Q. *et al.* MicroRNA-483-3p Promotes Proliferation, Migration, and Invasion and Induces Chemoresistance of Wilms' Tumor Cells. **Pediatr Dev Pathol**, p. 1093526619873491, Sep 2019.
- CHEN, L.; QIN, Z.; LEI, J.; YE, S. *et al.* Upregulation of miR-489-3p and miR-630 inhibits oxaliplatin uptake in renal cell carcinoma by targeting OCT2. **Acta Pharm Sin B**, 9, n. 5, p. 1008-1020, Sep 2019.
- CHEN, W. X.; ZHANG, Z. G.; DING, Z. Y.; LIANG, H. F. *et al.* MicroRNA-630 suppresses tumor metastasis through the TGF- β - miR-630-Slug signaling pathway and correlates inversely with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 7, n. 16, p. 22674-22686, Apr 2016.
- CHERRADI, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 6, p. 195, 2015.
- CHU, D.; ZHAO, Z.; LI, Y.; LI, J. *et al.* Increased microRNA-630 expression in gastric cancer is associated with poor overall survival. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90526, 2014.
- CHU, D.; ZHENG, J.; LI, J.; LI, Y. *et al.* MicroRNA-630 is a prognostic marker for patients with colorectal cancer. **Tumour Biol**, 35, n. 10, p. 9787-9792, Oct 2014.
- CHUDLER, R. M.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. **Urol Clin North Am**, 16, n. 3, p. 469-479, Aug 1989.

CIFTCI, A. O.; SENOCAK, M. E.; TANYEL, F. C.; BÜYÜKPAMUKÇU, N. Adrenocortical tumors in children. **J Pediatr Surg**, 36, n. 4, p. 549-554, Apr 2001.

CORCORAN, C.; RANI, S.; BRESLIN, S.; GOGARTY, M. *et al.* miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. **Mol Cancer**, 13, p. 71, Mar 2014.

COSTA, T. E. J.; GERBER, V. K. Q.; IBANÑEZ, H. C.; MELANDA, V. S. *et al.* Penetrance of the. **Cancers (Basel)**, 11, n. 11, Nov 2019.

COULTER, C. L. Functional biology of the primate fetal adrenal gland: advances in technology provide new insight. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 31, n. 8, p. 475-484, Aug 2004.

CUI, H.; LIU, Y.; JIANG, J.; YANG, Z. *et al.* IGF2-derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. **Oncotarget**, 7, n. 30, p. 48456-48466, Jul 2016.

CUSTODIO, G.; TAQUES, G. R.; FIGUEIREDO, B. C.; GUGELMIN, E. S. *et al.* Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. **PLoS One**, 6, n. 3, p. e18015, Mar 2011.

CUSTÓDIO, G.; PARISE, G. A.; KIESEL FILHO, N.; KOMECHEN, H. *et al.* Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol**, 31, n. 20, p. 2619-2626, Jul 2013.

DATTO, M. B.; YU, Y.; WANG, X. F. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. **J Biol Chem**, 270, n. 48, p. 28623-28628, Dec 1995.

DAVIS, B. N.; HILYARD, A. C.; LAGNA, G.; HATA, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. **Nature**, 454, n. 7200, p. 56-61, Jul 2008.

DAVIS, B. N.; HILYARD, A. C.; NGUYEN, P. H.; LAGNA, G. *et al.* Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. **Mol Cell**, 39, n. 3, p. 373-384, Aug 2010.

DE FRAIPONT, F.; EL ATIFI, M.; CHERRADI, N.; LE MOIGNE, G. *et al.* Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. **J Clin Endocrinol Metab**, 90, n. 3, p. 1819-1829, Mar 2005.

DEHNER, L. P. Pediatric adrenocortical neoplasms: on the road to some clarity. **Am J Surg Pathol**, 27, n. 7, p. 1005-1007, Jul 2003.

- DEREBECKA-HOLYSZ, N.; LEHMANN, T. P.; HOLYSZ, M.; TRZECIAK, W. H. TGF-beta inhibits CYP17 transcription in H295R cells acting via activin receptor-like kinase 5. **Endocr Res**, 34, n. 3, p. 68-79, 2009.
- DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, 29, n. 2, p. 117-129, Oct 2001.
- DOGHMAN, M.; EL WAKIL, A.; CARDINAUD, B.; THOMAS, E. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 70, n. 11, p. 4666-4675, Jun 2010.
- DUREGON, E.; RAPA, I.; VOTTA, A.; GIORCELLI, J. *et al.* MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. **Hum Pathol**, 45, n. 8, p. 1555-1562, Aug 2014.
- DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nat Methods**, 12, n. 8, p. 697, Aug 2015.
- DWEEP, H.; STICHT, C.; GRETZ, N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. **Curr Genomics**, 14, n. 2, p. 127-136, Apr 2013.
- DWEEP, H.; STICHT, C.; PANDEY, P.; GRETZ, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform**, 44, n. 5, p. 839-847, Oct 2011.
- EBERT, M. S.; SHARP, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. **RNA**, 16, n. 11, p. 2043-2050, Nov 2010.
- ELSE, T.; KIM, A. C.; SABOLCH, A.; RAYMOND, V. M. *et al.* Adrenocortical carcinoma. **Endocr Rev**, 35, n. 2, p. 282-326, Apr 2014.
- EOH, K. J.; LEE, S. H.; KIM, H. J.; LEE, J. Y. *et al.* MicroRNA-630 inhibitor sensitizes chemoresistant ovarian cancer to chemotherapy by enhancing apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 497, n. 2, p. 513-520, 03 2018.
- FASSNACHT, M.; ALLOLIO, B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 23, n. 2, p. 273-289, Apr 2009.
- FASSNACHT, M.; DEKKERS, O. M.; ELSE, T.; BAUDIN, E. *et al.* European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **Eur J Endocrinol**, 179, n. 4, p. G1-G46, 10 2018.

FASSNACHT, M.; JOHANSEN, S.; QUINKLER, M.; BUCSKY, P. *et al.* Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. **Cancer**, 115, n. 2, p. 243-250, Jan 2009.

FASSNACHT, M.; LIBÉ, R.; KROISS, M.; ALLOLIO, B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 6, p. 323-335, Jun 2011.

FASSNACHT, M.; TERZOLO, M.; ALLOLIO, B.; BAUDIN, E. *et al.* Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. **N Engl J Med**, 366, n. 23, p. 2189-2197, Jun 2012.

FEDATTO, P. F. **Papel dos microRNAs nos tumores adrenocorticais pediátricos**. 2014. 149 f. - Departamento de Puericultura e Pediatria, Universidade de São Paulo.

FEIGE, J. J.; VILGRAIN, I.; BRAND, C.; BAILLY, S. *et al.* Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. **J Endocrinol**, 158, n. 1, p. 7-19, Jul 1998.

FEINMESSER, M.; BENBASSAT, C.; MEIRI, E.; BENJAMIN, H. *et al.* Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 23, n. 7, p. 522-531, Aug 2015.

FENG, H.; JIA, X. M.; GAO, N. N.; TANG, H. *et al.* Overexpressed VEPH1 inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of human cutaneous melanoma cells through inactivating the TGF- β signaling pathway. **Cell Cycle**, 18, n. 21, p. 2860-2875, Nov 2019.

FENG, J.; WANG, X.; ZHU, W.; CHEN, S. *et al.* MicroRNA-630 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Regulating FoxM1 in Gastric Cancer Cells. **Biochemistry (Mosc)**, 82, n. 6, p. 707-714, Jun 2017.

FENG, X. H.; LIANG, Y. Y.; LIANG, M.; ZHAI, W. *et al.* Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). **Mol Cell**, 9, n. 1, p. 133-143, Jan 2002.

FIGUEIREDO, B. C.; CAVALLI, L. R.; PIANOVSKI, M. A.; LALLI, E. *et al.* Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 90, n. 2, p. 615-619, Feb 2005.

FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, 43, n. 1, p. 91-96, Jan 2006.

FIGUEIREDO, B. C.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, 84, n. 3, p. 1116-1121, Mar 1999.

FIORENTINI, C.; GRISANTI, S.; COSENTINI, D.; ABATE, A. *et al.* Molecular Drivers of Potential Immunotherapy Failure in Adrenocortical Carcinoma. **J Oncol**, 2019, p. 6072863, 2019.

FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, 19, n. 1, p. 92-105, Jan 2009.

FU, H.; TIE, Y.; XU, C.; ZHANG, Z. *et al.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. **FEBS Lett**, 579, n. 17, p. 3849-3854, Jul 2005.

GARRITANO, S.; GEMIGNANI, F.; PALMERO, E. I.; OLIVIER, M. *et al.* Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat**, 31, n. 2, p. 143-150, Feb 2010.

GATTA-CHERIFI, B.; CHABRE, O.; MURAT, A.; NICCOLI, P. *et al.* Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines database. **Eur J Endocrinol**, 166, n. 2, p. 269-279, Feb 2012.

GAUJOUX, S.; GRABAR, S.; FASSNACHT, M.; RAGAZZON, B. *et al.* β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. **Clin Cancer Res**, 17, n. 2, p. 328-336, Jan 2011.

GAZDAR, A. F.; OIE, H. K.; SHACKLETON, C. H.; CHEN, T. R. *et al.* Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Res**, 50, n. 17, p. 5488-5496, Sep 1990.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 20, n. 1, p. 21-37, 01 2019.

GIACOMAZZI, J.; KOEHLER-SANTOS, P.; PALMERO, E. I.; GRAUDENZ, M. S. *et al.* A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. **Virchows Arch**, 463, n. 1, p. 17-22, Jul 2013.

GIACOMAZZI, J.; SELISTRE, S. G.; ROSSI, C.; ALEMAR, B. *et al.* Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. **Cancer**, 119, n. 24, p. 4341-4349, Dec 2013.

GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; GASTON, V.; COSTE, J. *et al.* Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 61, n. 18, p. 6762-6767, Sep 2001.

GICQUEL, C.; RAFFIN-SANSON, M. L.; GASTON, V.; BERTAGNA, X. *et al.* Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 8, p. 2559-2565, Aug 1997.

- GIORDANO, T. J.; THOMAS, D. G.; KUICK, R.; LIZYNESS, M. *et al.* Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol**, 162, n. 2, p. 521-531, Feb 2003.
- GLOVER, A. R.; ZHAO, J. T.; GILL, A. J.; WEISS, J. *et al.* MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. **Oncotarget**, 6, n. 34, p. 36675-36688, Nov 2015.
- GONG, W.; SUN, B.; SUN, H.; ZHAO, X. *et al.* Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells. **Am J Cancer Res**, 7, n. 3, p. 503-517, 2017.
- GONG, X. F.; YU, A. L.; TANG, J.; WANG, C. L. *et al.* MicroRNA-630 inhibits breast cancer progression by directly targeting BMI1. **Exp Cell Res**, 362, n. 2, p. 378-385, 01 2018.
- GREGORY, P. A.; BERT, A. G.; PATERSON, E. L.; BARRY, S. C. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat Cell Biol**, 10, n. 5, p. 593-601, May 2008.
- GU, S.; FENG, X. H. TGF- β signaling in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 50, n. 10, p. 941-949, Oct 2018.
- GUNDGURTHI, A.; KHARB, S.; DUTTA, M. K.; GARG, M. K. *et al.* Childhood adrenocortical carcinoma: Case report and review. **Indian J Endocrinol Metab**, 16, n. 3, p. 431-435, May 2012.
- GUPTA, N.; RIVERA, M.; NOVOTNY, P.; RODRIGUEZ, V. *et al.* Adrenocortical Carcinoma in Children: A Clinicopathological Analysis of 41 Patients at the Mayo Clinic from 1950 to 2017. **Horm Res Paediatr**, 90, n. 1, p. 8-18, 2018.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 8, p. 509-524, Aug 2014.
- HAHN, S. A.; SCHUTTE, M.; HOQUE, A. T.; MOSKALUK, C. A. *et al.* DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. **Science**, 271, n. 5247, p. 350-353, Jan 1996.
- HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; KIM, Y. K. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev**, 18, n. 24, p. 3016-3027, Dec 2004.
- HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, 371, n. 6494, p. 257-261, Sep 1994.
- HAO, J.; ZHANG, S.; ZHOU, Y.; HU, X. *et al.* MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. **FEBS Lett**, 585, n. 1, p. 207-213, Jan 2011.
- HASSAN, N.; ZHAO, J. T.; SIDHU, S. B. The role of microRNAs in the pathophysiology of adrenal tumors. **Mol Cell Endocrinol**, Dec 2016.

HATA, A.; CHEN, Y. G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 9, Sep 2016.

HEINE, U.; MUNOZ, E. F.; FLANDERS, K. C.; ELLINGSWORTH, L. R. *et al.* Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. **J Cell Biol**, 105, n. 6 Pt 2, p. 2861-2876, Dec 1987.

HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Role of Smads in TGF β signaling. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 21-36, Jan 2012.

HISADA, M.; GARBER, J. E.; FUNG, C. Y.; FRAUMENI, J. F. *et al.* Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst**, 90, n. 8, p. 606-611, Apr 1998.

HOTTA, M.; BAIRD, A. Differential effects of transforming growth factor type beta on the growth and function of adrenocortical cells in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 20, p. 7795-7799, Oct 1986.

ICARD, P.; GOUDET, P.; CHARPENAY, C.; ANDREASSIAN, B. *et al.* Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. **World J Surg**, 25, n. 7, p. 891-897, Jul 2001.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 6, p. 415-424, Jun 2010.

IMLIMTHAN, S.; CORREIA, A.; FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K. *et al.* Systematic in vitro biocompatibility studies of multimodal cellulose nanocrystal and lignin nanoparticles. **J Biomed Mater Res A**, 108, n. 3, p. 770-783, Mar 2020.

INMAN, G. J.; NICOLÁS, F. J.; CALLAHAN, J. F.; HARLING, J. D. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. **Mol Pharmacol**, 62, n. 1, p. 65-74, Jul 2002.

JIN, L.; YI, J.; GAO, Y.; HAN, S. *et al.* MiR-630 inhibits invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 48, n. 9, p. 810-819, Sep 2016.

JOHNSON, D. H.; GRECO, F. A. Treatment of metastatic adrenal cortical carcinoma with cisplatin and etoposide (VP-16). **Cancer**, 58, n. 10, p. 2198-2202, Nov 1986.

KEMPNÁ, P.; FLÜCK, C. E. Adrenal gland development and defects. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 22, n. 1, p. 77-93, Feb 2008.

KERKHOF, T. M.; VERHOEVEN, R. H.; VAN DER ZWAN, J. M.; DIELEMAN, J. *et al.* Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. **Eur J Cancer**, 49, n. 11, p. 2579-2586, Jul 2013.

KLEIN, J. D.; TURNER, C. G.; GRAY, F. L.; YU, D. C. *et al.* Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome. **J Pediatr Surg**, 46, n. 6, p. 1201-1207, Jun 2011.

KOPERSKI, Ł.; KOTLAREK, M.; ŚWIERNIAK, M.; KOLANOWSKA, M. *et al.* Next-generation sequencing reveals microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. **Oncotarget**, 8, n. 30, p. 49191-49200, Jul 2017.

KOSCHKER, A. C.; FASSNACHT, M.; HAHNER, S.; WEISMANN, D. *et al.* Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 114, n. 2, p. 45-51, Feb 2006.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D155-D162, Jan 2019.

KWOK, G. T. Y.; ZHAO, J. T.; GLOVER, A. R.; GILL, A. J. *et al.* microRNA-431 as a Chemosensitizer and Potentiator of Drug Activity in Adrenocortical Carcinoma. **Oncologist**, 24, n. 6, p. e241-e250, 06 2019.

LABELLE, M.; BEGUM, S.; HYNES, R. O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer Cell**, 20, n. 5, p. 576-590, Nov 2011.

LAN, H.; LU, H.; WANG, X.; JIN, H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. **Biomed Res Int**, 2015, p. 125094, 2015.

LEAL, L. F.; MERMEJO, L. M.; RAMALHO, L. Z.; MARTINELLI, C. E. *et al.* Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 96, n. 10, p. 3106-3114, Oct 2011.

LEBOULLEUX, S.; DEANDREIS, D.; AL GHUZLAN, A.; AUPÉRIN, A. *et al.* Adrenocortical carcinoma: is the surgical approach a risk factor of peritoneal carcinomatosis? **Eur J Endocrinol**, 162, n. 6, p. 1147-1153, Jun 2010.

LEITE, F. A.; LIRA, R. C.; FEDATTO, P. F.; ANTONINI, S. R. *et al.* Low expression of HLA-DRA, HLA-DPA1, and HLA-DPB1 is associated with poor prognosis in pediatric adrenocortical tumors (ACT). **Pediatr Blood Cancer**, 61, n. 11, p. 1940-1948, Nov 2014.

LI, D.; TIAN, B.; JIN, X. miR-630 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway in Gastric Cancer Cells. **Oncol Res**, 27, n. 1, p. 9-17, Dec 2018.

LI, G. W.; YAN, X. Lower miR-630 expression predicts poor prognosis of osteosarcoma and promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PSMC2. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, n. 5, p. 1915-1925, Mar 2019.

- LI, W.; ZONG, S.; SHI, Q.; LI, H. *et al.* Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in human colorectal cancer cells: Involvement of HIF-1 α , Claudin-4, and E-cadherin and Vimentin. **Sci Rep**, 6, p. 37534, 11 2016.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, 2, n. 2, p. 329-333, 2007.
- LIBÈ, R.; GROUSSIN, L.; TISSIER, F.; ELIE, C. *et al.* Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. **Clin Cancer Res**, 13, n. 3, p. 844-850, Feb 2007.
- LIMA, L. E. O.; LERARIO, A. M.; ALENCAR, G. A.; BRITO, L. P. *et al.* Clinical and molecular aspects of a pediatric metachronous adrenocortical tumor. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 55, n. 1, p. 72-77, Feb 2011.
- LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 6, p. 321-333, Jun 2015.
- LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, 305, n. 5689, p. 1437-1441, Sep 2004.
- LIU, M.; ROTH, A.; YU, M.; MORRIS, R. *et al.* The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. **Genes Dev**, 27, n. 23, p. 2543-2548, Dec 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.
- LOREA, C. F.; MORENO, D. A.; BORGES, K. S.; MARTINELLI, C. E. *et al.* Expression profile of apoptosis-related genes in childhood adrenocortical tumors: low level of expression of BCL2 and TNF genes suggests a poor prognosis. **Eur J Endocrinol**, 167, n. 2, p. 199-208, Aug 2012.
- LU, Y.; WANG, L.; LI, H.; LI, Y. *et al.* SMAD2 Inactivation Inhibits CLDN6 Methylation to Suppress Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. **Int J Mol Sci**, 18, n. 9, Aug 2017.
- LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, 77, n. 4, p. 481-490, May 1994.
- MA, J.; HONG, L.; XU, G.; HAO, J. *et al.* miR-483-3p plays an oncogenic role in esophageal squamous cell carcinoma by targeting tumor suppressor EI24. **Cell Biol Int**, 40, n. 4, p. 448-455, Apr 2016.
- MACFARLANE, L. A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Curr Genomics**, 11, n. 7, p. 537-561, Nov 2010.

MANSMANN, G.; LAU, J.; BALK, E.; ROTHBERG, M. *et al.* The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. **Endocr Rev**, 25, n. 2, p. 309-340, Apr 2004.

MARKOWITZ, S.; WANG, J.; MYEROFF, L.; PARSONS, R. *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. **Science**, 268, n. 5215, p. 1336-1338, Jun 1995.

MASSAGUÉ, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. **Cell**, 49, n. 4, p. 437-438, May 1987.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, 6, p. 597-641, 1990.

MASSAGUÉ, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, 134, n. 2, p. 215-230, Jul 2008.

MASSAGUÉ, J. TGFβ signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 10, p. 616-630, Oct 2012.

MASSAGUÉ, J.; KELLY, B.; MOTTOLA, C. Stimulation by insulin-like growth factors is required for cellular transformation by type beta transforming growth factor. **J Biol Chem**, 260, n. 8, p. 4551-4554, Apr 1985.

MASTELLARO, M. J.; RIBEIRO, R. C.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; SEIDINGER, A. L. *et al.* Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. **J Pediatr (Rio J)**, 94, n. 4, p. 432-439, 2018 Jul - Aug 2018.

MATSUYAMA, S.; IWADATE, M.; KONDO, M.; SAITOH, M. *et al.* SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. **Cancer Res**, 63, n. 22, p. 7791-7798, Nov 2003.

MCATEER, J. P.; HUACO, J. A.; GOW, K. W. Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study. **J Pediatr Surg**, 48, n. 5, p. 1025-1031, May 2013.

MENBARI, M. N.; RAHIMI, K.; AHMADI, A.; MOHAMMADI-YEGANEH, S. *et al.* miR-483-3p suppresses the proliferation and progression of human triple negative breast cancer cells by targeting the HDAC8 oncogene. **J Cell Physiol**, 235, n. 3, p. 2631-2642, Mar 2020.

MESIANO, S.; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr Rev**, 18, n. 3, p. 378-403, Jun 1997.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E. C. *et al.* Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, 22, n. 5, p. 838-845, Mar 2004.

- MILLER, B. S.; AMMORI, J. B.; GAUGER, P. G.; BROOME, J. T. *et al.* Laparoscopic resection is inappropriate in patients with known or suspected adrenocortical carcinoma. **World J Surg**, 34, n. 6, p. 1380-1385, Jun 2010.
- MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 30, p. 10513-10518, Jul 2008.
- MIYAZONO, K. TGF-beta signaling by Smad proteins. **Cytokine Growth Factor Rev**, 11, n. 1-2, p. 15-22, 2000 Mar-Jun 2000.
- MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P.; HELDIN, C. H. TGF-beta signaling by Smad proteins. **Adv Immunol**, 75, p. 115-157, 2000.
- MOLLAELI, H.; SAFARALIZADEH, R.; ROSTAMI, Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. **J Cell Physiol**, 234, n. 8, p. 12369-12384, Aug 2019.
- MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 5, May 2016.
- MORRISON, C. D.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs. **Cancer Lett**, 341, n. 1, p. 30-40, Nov 2013.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. **Development**, 136, n. 22, p. 3699-3714, Nov 2009.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. **J Clin Med**, 5, n. 7, Jun 2016.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, P. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. **Biochim Biophys Acta**, 1840, n. 8, p. 2621-2634, Aug 2014.
- MU, Y.; GUDEY, S. K.; LANDSTRÖM, M. Non-Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 11-20, Jan 2012.
- NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, Y.; FELIZOLA, S. J.; ISE, K. *et al.* Adrenocortical carcinoma: review of the pathologic features, production of adrenal steroids, and molecular pathogenesis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 44, n. 2, p. 399-410, Jun 2015.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HEITZ, P. U. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. **Int J Cancer**, 54, n. 3, p. 408-410, May 1993.
- OLIVETO, S.; MANCINO, M.; MANFRINI, N.; BIFFO, S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. **World J Biol Chem**, 8, n. 1, p. 45-56, Feb 2017.

PAN, X. M.; HE, X. Y.; YANG, Y. L.; JIA, W. J. *et al.* MiR-630 inhibits papillary thyroid carcinoma cell growth, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition by suppressing JAK2/STAT3 signaling pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, n. 6, p. 2453-2460, Mar 2019.

PANG, L.; LI, Q.; WEI, C.; ZOU, H. *et al.* TGF- β 1/Smad signaling pathway regulates epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma: in vitro and clinical analyses of cell lines and nomadic Kazakh patients from northwest Xinjiang, China. **PLoS One**, 9, n. 12, p. e112300, 2014.

PAPOTTI, M.; DUREGON, E.; VOLANTE, M.; MCNICOL, A. M. Pathology of the adrenal cortex: a reappraisal of the past 25 years focusing on adrenal cortical tumors. **Endocr Pathol**, 25, n. 1, p. 35-48, Mar 2014.

PAPOTTI, M.; LIBÈ, R.; DUREGON, E.; VOLANTE, M. *et al.* The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. **Horm Cancer**, 2, n. 6, p. 333-340, Dec 2011.

PARAGLIOLA, R. M.; TORINO, F.; PAPI, G.; LOCANTORE, P. *et al.* Role of Mitotane in Adrenocortical Carcinoma - Review and State of the art. **Eur Endocrinol**, 14, n. 2, p. 62-66, Sep 2018.

PARK, N. R.; CHA, J. H.; JANG, J. W.; BAE, S. H. *et al.* Synergistic effects of CD44 and TGF- β 1 through AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 477, n. 4, p. 568-574, 09 2016.

PARK, S. M.; GAUR, A. B.; LENGYEL, E.; PETER, M. E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes Dev**, 22, n. 7, p. 894-907, Apr 2008.

PARKER, C. R.; STANKOVIC, A. K.; HARLIN, C.; CARDEN, L. Adrenocorticotropin interferes with transforming growth factor-beta-induced growth inhibition of neocortical cells from the human fetal adrenal gland. **J Clin Endocrinol Metab**, 75, n. 6, p. 1519-1521, Dec 1992.

PARVANI, J. G.; GUJRATI, M. D.; MACK, M. A.; SCHIEMANN, W. P. *et al.* Silencing β 3 Integrin by Targeted ECO/siRNA Nanoparticles Inhibits EMT and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Res**, 75, n. 11, p. 2316-2325, Jun 2015.

PASKULIN, D. D.; GIACOMAZZI, J.; ACHATZ, M. I.; COSTA, S. *et al.* Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLoS One**, 10, n. 11, p. e0143262, 2015.

PATTERSON, E. E.; HOLLOWAY, A. K.; WENG, J.; FOJO, T. *et al.* MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. **Cancer**, 117, n. 8, p. 1630-1639, Apr 2011.

PEIXOTO LIRA, R. C.; FEDATTO, P. F.; MARCO ANTONIO, D. S.; LEAL, L. F. *et al.* IGF2 and IGF1R in pediatric adrenocortical tumors: roles in metastasis and steroidogenesis. **Endocr Relat Cancer**, 23, n. 6, p. 481-493, 06 2016.

PEREIRA, S. S.; MONTEIRO, M. P.; ANTONINI, S. R.; PIGNATELLI, D. Apoptosis regulation in adrenocortical carcinoma. **Endocr Connect**, 8, n. 5, p. R91-R104, May 2019.

PEREIRA, T. C.; CORRÊA, C. A. P. **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto: 2017. 64 p.

PETR, E. J.; ELSE, T. Genetic predisposition to endocrine tumors: Diagnosis, surveillance and challenges in care. **Semin Oncol**, 43, n. 5, p. 582-590, Oct 2016.

PIANOVSKI, M. A.; CAVALLI, L. R.; FIGUEIREDO, B. C.; SANTOS, S. C. *et al.* SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, 42, n. 8, p. 1040-1043, May 2006.

PINTO, E. M.; BILLERBECK, A. E.; VILLARES, M. C.; DOMENICE, S. *et al.* Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 48, n. 5, p. 647-650, Oct 2004.

PINTO, E. M.; CHEN, X.; EASTON, J.; FINKELSTEIN, D. *et al.* Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nat Commun**, 6, p. 6302, Mar 2015.

POLYAK, K.; KATO, J. Y.; SOLOMON, M. J.; SHERR, C. J. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes Dev**, 8, n. 1, p. 9-22, Jan 1994.

RAINEY, W. E.; BIRD, I. M.; MASON, J. I. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. **Mol Cell Endocrinol**, 100, n. 1-2, p. 45-50, Apr 1994.

RAINEY, W. E.; SANER, K.; SCHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Mol Cell Endocrinol**, 228, n. 1-2, p. 23-38, Dec 2004.

RAPPOLEE, D. A.; BRENNER, C. A.; SCHULTZ, R.; MARK, D. *et al.* Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. **Science**, 241, n. 4874, p. 1823-1825, Sep 1988.

RAYMOND, V. M.; ELSE, T.; EVERETT, J. N.; LONG, J. M. *et al.* Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 1, p. E119-125, Jan 2013.

RAYMOND, V. M.; EVERETT, J. N.; FURTADO, L. V.; GUSTAFSON, S. L. *et al.* Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer. **J Clin Oncol**, 31, n. 24, p. 3012-3018, Aug 2013.

REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. H.; MASTORAKOS, G. *et al.* p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 78, n. 3, p. 790-794, Mar 1994.

RIBEIRO, R. C.; FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, 40, n. 8, p. 1117-1126, May 2004.

RIBEIRO, R. C.; MICHALKIEWICZ, E. L.; FIGUEIREDO, B. C.; DELACERDA, L. *et al.* Adrenocortical tumors in children. **Braz J Med Biol Res**, 33, n. 10, p. 1225-1234, Oct 2000.

RIBEIRO, R. C.; PINTO, E. M.; ZAMBETTI, G. P.; RODRIGUEZ-GALINDO, C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Mol Cell Endocrinol**, 351, n. 1, p. 37-43, Mar 2012.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.; ZAMBETTI, G. P. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 16, p. 9330-9335, Jul 2001.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI NETO, R. S.; SCHELL, M. J.; LACERDA, L. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J Clin Oncol**, 8, n. 1, p. 67-74, Jan 1990.

RIOPEL, L.; BRANCHAUD, C. L.; GOODYER, C. G.; ADKAR, V. *et al.* Growth-inhibitory effect of TGF-B on human fetal adrenal cells in primary monolayer culture. **J Cell Physiol**, 140, n. 2, p. 233-238, Aug 1989.

ROBERTS, A. B.; ANZANO, M. A.; WAKEFIELD, L. M.; ROCHE, N. S. *et al.* Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82, n. 1, p. 119-123, Jan 1985.

ROBERTS, A. B.; FLANDERS, K. C.; KONDAIAH, P.; THOMPSON, N. L. *et al.* Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. **Recent Prog Horm Res**, 44, p. 157-197, 1988.

RODRIGUEZ, H.; HUM, D. W.; STAELS, B.; MILLER, W. L. Transcription of the human genes for cytochrome P450scc and P450c17 is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 2, p. 365-371, Feb 1997.

RODRIGUEZ-GALINDO, C.; FIGUEIREDO, B. C.; ZAMBETTI, G. P.; RIBEIRO, R. C. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatr Blood Cancer**, 45, n. 3, p. 265-273, Sep 2005.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 3, p. 203-222, Mar 2017.

SADOVSKY, Y.; CRAWFORD, P. A.; WOODSON, K. G.; POLISH, J. A. *et al.* Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 24, p. 10939-10943, Nov 1995.

SAMANDARI, E.; KEMPNA, P.; NUOFFER, J. M.; HOFER, G. *et al.* Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. **J Endocrinol**, 195, n. 3, p. 459-472, Dec 2007.

SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 7, p. 2027-2031, Jul 1997.

SBIERA, S.; SCHMULL, S.; ASSIE, G.; VOELKER, H. U. *et al.* High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 95, n. 10, p. E161-171, Oct 2010.

SCHIMMER, B. P.; WHITE, P. C. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. **Mol Endocrinol**, 24, n. 7, p. 1322-1337, Jul 2010.

SCHMITZ, K. J.; HELWIG, J.; BERTRAM, S.; SHEU, S. Y. *et al.* Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. **J Clin Pathol**, 64, n. 6, p. 529-535, Jun 2011.

SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; PASCHOAL FORTES, F.; GODOY ASSUMPÇÃO, J. *et al.* Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer**, 117, n. 10, p. 2228-2235, May 2011.

SEVIGNANI, C.; CALIN, G. A.; SIRACUSA, L. D.; CROCE, C. M. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. **Mamm Genome**, 17, n. 3, p. 189-202, Mar 2006.

SHIOTA, M.; ZARDAN, A.; TAKEUCHI, A.; KUMANO, M. *et al.* Clusterin mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. **Cancer Res**, 72, n. 20, p. 5261-5272, Oct 2012.

SILJAMÄKI, E.; RAPPU, P.; RIIHILÄ, P.; NISSINEN, L. *et al.* H-Ras activation and fibroblast-induced TGF- β signaling promote laminin-332 accumulation and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. **Matrix Biol**, Oct 2019.

SONG, J. H.; CHAUDHRY, F. S.; MAYO-SMITH, W. W. The incidental adrenal mass on CT: prevalence of adrenal disease in 1,049 consecutive adrenal masses in patients with no known malignancy. **AJR Am J Roentgenol**, 190, n. 5, p. 1163-1168, May 2008.

SONG, Y. F.; HONG, J. F.; LIU, D. L.; LIN, Q. A. *et al.* miR-630 targets LMO3 to regulate cell growth and metastasis in lung cancer. **Am J Transl Res**, 7, n. 7, p. 1271-1279, 2015.

SOON, P. S.; TACON, L. J.; GILL, A. J.; BAMBACH, C. P. *et al.* miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. **Clin Cancer Res**, 15, n. 24, p. 7684-7692, Dec 2009.

SPENCER, S. J.; MESIANO, S.; LEE, J. Y.; JAFFE, R. B. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrinol Metab**, 84, n. 3, p. 1110-1115, Mar 1999.

SPENCER, S. J.; RABINOVICI, J.; MESIANO, S.; GOLDSMITH, P. C. *et al.* Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. **J Clin Invest**, 90, n. 1, p. 142-149, Jul 1992.

SPERONE, P.; FERRERO, A.; DAFFARA, F.; PRIOLA, A. *et al.* Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. **Endocr Relat Cancer**, 17, n. 2, p. 445-453, Jun 2010.

STANKOVIC, A. K.; DION, L. D.; PARKER, C. R. Effects of transforming growth factor-beta on human fetal adrenal steroid production. **Mol Cell Endocrinol**, 99, n. 2, p. 145-151, Mar 1994.

STEWART, P. M.; WALKER, B. R.; HOLDER, G.; O'HALLORAN, D. *et al.* 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 80, n. 12, p. 3617-3620, Dec 1995.

SUCHESTON, M. E.; CANNON, M. S. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. **J Morphol**, 126, n. 4, p. 477-491, Dec 1968.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. **Cancer Res**, 76, n. 13, p. 3666-3670, 07 2016.

TADJINE, M.; LAMPRON, A.; OUADI, L.; BOURDEAU, I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 68, n. 2, p. 264-270, Feb 2008.

TANG, B.; VU, M.; BOOKER, T.; SANTNER, S. J. *et al.* TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. **J Clin Invest**, 112, n. 7, p. 1116-1124, Oct 2003.

TAYLOR, M. A.; LEE, Y. H.; SCHIEMANN, W. P. Role of TGF- β and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. **Gene Expr**, 15, n. 3, p. 117-132, 2011.

TAYLOR, M. A.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 15, n. 2, p. 169-190, Jun 2010.

TERZOLO, M.; BAUDIN, A. E.; ARDITO, A.; KROISS, M. *et al.* Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. **Eur J Endocrinol**, 169, n. 3, p. 263-270, Sep 2013.

TERZOLO, M.; DAFFARA, F.; ARDITO, A.; ZAGGIA, B. *et al.* Management of adrenal cancer: a 2013 update. **J Endocrinol Invest**, 37, n. 3, p. 207-217, Mar 2014.

THAKUR, N.; GUDEY, S. K.; MARCUSSEON, A.; FU, J. Y. *et al.* TGF β -induced invasion of prostate cancer cells is promoted by c-Jun-dependent transcriptional activation of Snail1. **Cell Cycle**, 13, n. 15, p. 2400-2414, 2014.

THILLAINADESAN, G.; CHITILIAN, J. M.; ISOVIC, M.; ABLACK, J. N. *et al.* TGF- β -dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. **Mol Cell**, 46, n. 5, p. 636-649, Jun 2012.

THOMPSON, N. L.; FLANDERS, K. C.; SMITH, J. M.; ELLINGSWORTH, L. R. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. **J Cell Biol**, 108, n. 2, p. 661-669, Feb 1989.

TIAN, M.; NEIL, J. R.; SCHIEMANN, W. P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. **Cell Signal**, 23, n. 6, p. 951-962, Jun 2011.

TISSIER, F.; CAVARD, C.; GROUSSIN, L.; PERLEMOINE, K. *et al.* Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 65, n. 17, p. 7622-7627, Sep 2005.

TUCCI, S.; MARTINS, A. C.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J. *et al.* The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. **J Urol**, 174, n. 6, p. 2338-2342, discussion 2342, Dec 2005.

TUCKER, R. F.; SHIPLEY, G. D.; MOSES, H. L.; HOLLEY, R. W. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. **Science**, 226, n. 4675, p. 705-707, Nov 1984.

TÖMBÖL, Z.; SZABÓ, P. M.; MOLNÁR, V.; WIENER, Z. *et al.* Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. **Endocr Relat Cancer**, 16, n. 3, p. 895-906, Sep 2009.

VANDER ARK, A.; CAO, J.; LI, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. **Cell Signal**, 52, p. 112-120, 12 2018.

VARGHESE, J.; HABRA, M. A. Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, 24, n. 3, p. 208-214, Jun 2017.

VATRANO, S.; VOLANTE, M.; DUREGON, E.; GIORCELLI, J. *et al.* Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas. **Mod Pathol**, 31, n. 8, p. 1257-1269, 08 2018.

VERONESE, A.; LUPINI, L.; CONSIGLIO, J.; VISIONE, R. *et al.* Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. **Cancer Res**, 70, n. 8, p. 3140-3149, Apr 2010.

VERVOORT, S. J.; LOURENÇO, A. R.; VAN BOXTEL, R.; COFFER, P. J. SOX4 mediates TGF- β -induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e53238, 2013.

VOLANTE, M.; BUTTIGLIERO, C.; GRECO, E.; BERRUTI, A. *et al.* Pathological and molecular features of adrenocortical carcinoma: an update. **J Clin Pathol**, 61, n. 7, p. 787-793, Jul 2008.

WAJCHENBERG, B. L.; ALBERGARIA PEREIRA, M. A.; MEDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, 88, n. 4, p. 711-736, Feb 2000.

WANG, C.; SUN, Y.; WU, H.; YU, S. *et al.* Elevated miR-483-3p expression is an early event and indicates poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Tumour Biol**, 36, n. 12, p. 9447-9456, Dec 2015.

WANG, C.; SUN, Y.; WU, H.; ZHAO, D. *et al.* Distinguishing adrenal cortical carcinomas and adenomas: a study of clinicopathological features and biomarkers. **Histopathology**, 64, n. 4, p. 567-576, Mar 2014.

WANG, D.; LONG, J.; DAI, F.; LIANG, M. *et al.* BCL6 represses Smad signaling in transforming growth factor-beta resistance. **Cancer Res**, 68, n. 3, p. 783-789, Feb 2008.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **J Cell Physiol**, 231, n. 1, p. 25-30, Jan 2016.

WANG, J.; WANG, Y.; SUN, D.; REN, F. *et al.* CUTL1 induces epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. **Oncol Rep**, 37, n. 5, p. 3068-3074, May 2017.

WANG, P. Suppression of DACH1 promotes migration and invasion of colorectal cancer via activating TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. **Biochem Biophys Res Commun**, 460, n. 2, p. 314-319, May 2015.

WANG, T.; RAINEY, W. E. Human adrenocortical carcinoma cell lines. **Mol Cell Endocrinol**, 351, n. 1, p. 58-65, Mar 2012.

WANG, Z. Y.; ZHANG, W.; YANG, J. J.; SONG, D. K. *et al.* Expression of miRNA-630 in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 36, n. 5, p. 705-709, Oct 2016.

WASSERMAN, J. D.; NOVOKMET, A.; EICHLER-JONSSON, C.; RIBEIRO, R. C. *et al.* Prevalence and functional consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: a children's oncology group study. **J Clin Oncol**, 33, n. 6, p. 602-609, Feb 2015.

WASZUT, U.; SZYSZKA, P.; DWORAKOWSKA, D. Understanding mitotane mode of action. **J Physiol Pharmacol**, 68, n. 1, p. 13-26, Feb 2017.

WEISS, A.; ATTISANO, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 2, n. 1, p. 47-63, 2013 Jan-Feb 2013.

WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, 8, n. 3, p. 163-169, Mar 1984.

WEISS, L. M.; MEDEIROS, L. J.; VICKERY, A. L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 13, n. 3, p. 202-206, Mar 1989.

WEN, D.; DANQUAH, M.; CHAUDHARY, A. K.; MAHATO, R. I. Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: Promises and obstacles. **J Control Release**, 219, p. 237-247, Dec 2015.

WENDT, M. K.; TIAN, M.; SCHIEMANN, W. P. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 85-101, Jan 2012.

WIEDEMANN, H. R.; BURGIO, G. R.; ALDENHOFF, P.; KUNZE, J. *et al.* The proteus syndrome. Partial gigantism of the hands and/or feet, nevi, hemihypertrophy, subcutaneous tumors, macrocephaly or other skull anomalies and possible accelerated growth and visceral affections. **Eur J Pediatr**, 140, n. 1, p. 5-12, Mar 1983.

WIENEKE, J. A.; THOMPSON, L. D.; HEFFESS, C. S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **Am J Surg Pathol**, 27, n. 7, p. 867-881, Jul 2003.

WU, Y.; WANG, W.; HU, W.; XU, W. *et al.* MicroRNA-205 suppresses the growth of adrenocortical carcinoma SW-13 cells via targeting Bcl-2. **Oncol Rep**, 34, n. 6, p. 3104-3110, Dec 2015.

XI, H.; SHUAI, Q. G.; SHAO, L. L. Involvement of the TGF β 1/Smad2/MMP3 signaling pathway in SB431542-induced inhibition of cell invasion in multiple myeloma RPMI 8226 cells. **Oncol Lett**, 14, n. 1, p. 541-546, Jul 2017.

ZAMBETTI, G. P. The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. **J Cell Physiol**, 213, n. 2, p. 370-373, Nov 2007.

ZANCANELLA, P.; PIANOVSKI, M. A.; OLIVEIRA, B. H.; FERMAN, S. *et al.* Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol**, 28, n. 8, p. 513-524, Aug 2006.

ZHANG, J. W.; LI, Y.; ZENG, X. C.; ZHANG, T. *et al.* miR-630 overexpression in hepatocellular carcinoma tissues is positively correlated with alpha-fetoprotein. **Med Sci Monit**, 21, p. 667-673, Mar 2015.

ZHANG, L.; FENG, G.; ZHANG, X.; DING, Y. *et al.* microRNA-630 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in the HCT116 human colorectal cancer cell line. **Mol Med Rep**, 16, n. 4, p. 4843-4848, Oct 2017.

ZHANG, S.; ZHANG, J. Y.; LU, L. J.; WANG, C. H. *et al.* MiR-630 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via targeting KLF6. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 21, n. 20, p. 4542-4547, Oct 2017.

ZHAO, J. J.; CHEN, P. J.; DUAN, R. Q.; LI, K. J. *et al.* Up-regulation of miR-630 in clear cell renal cell carcinoma is associated with lower overall survival. **Int J Clin Exp Pathol**, 7, n. 6, p. 3318-3323, 2014.

ZHENG, S.; CHERNIACK, A. D.; DEWAL, N.; MOFFITT, R. A. *et al.* Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. **Cancer Cell**, 30, n. 2, p. 363, 08 2016.

ZHOU, C. X.; WANG, C. L.; YU, A. L.; WANG, Q. Y. *et al.* MiR-630 suppresses breast cancer progression by targeting metadherin. **Oncotarget**, 7, n. 2, p. 1288-1299, Jan 2016.

ZHOU, H. Q.; LIU, M. S.; DENG, T. B.; XIE, P. B. *et al.* The TGF- β /Smad Pathway Inhibitor SB431542 Enhances The Antitumor Effect Of Radiofrequency Ablation On Bladder Cancer Cells. **Onco Targets Ther**, 12, p. 7809-7821, 2019.

ZOU, Y. T.; GAO, J. Y.; WANG, H. L.; WANG, Y. *et al.* Downregulation of microRNA-630 inhibits cell proliferation and invasion and enhances chemosensitivity in human ovarian carcinoma. **Genet Mol Res**, 14, n. 3, p. 8766-8777, Jul 2015.

ÖZATA, D. M.; CARAMUTA, S.; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, D.; AKÇAKAYA, P. *et al.* The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, 18, n. 6, p. 643-655, Oct 2011.

11. APÊNDICES

11.1. Apêndice 1. Dados Clínicos Pacientes Pediátricos com TAC

| Amostra | Idade | Gênero | Sintomas | R337H | Sandrini | Metástase | Recidiva | Evento | Des fecho | miR 483-3p | miR 630 |
|---------|---------|--------|----------|--------|----------|-----------|----------|-----------|-----------|------------|----------|
| TU 1 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 2 | >3 anos | F | Viril. | S | 2 | Ñ | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 3 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 4 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 5 | >3 anos | F | S/Sint. | S/Inf. | 3 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | X |
| TU 6 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | S | Rec/Óbito | Vivo | √ | √ |
| TU 7 | >3 anos | F | S/Sint. | Ñ | 2 | Ñ | S | Rec/Óbito | Vivo | √ | √ |
| TU 8 | >3 anos | F | Misto | S | 4 | S | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 9 | >3 anos | F | Viril. | S | 4 | S | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 10 | <3 anos | M | Viril. | Ñ | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 11 | >3 anos | F | Viril. | Ñ | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 12 | <3 anos | F | Misto | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 13 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 14 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 15 | >3 anos | M | Cush | S | 1 | Ñ | Ñ | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 16 | <3 anos | M | Cush | S | 4 | S | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 17 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 18 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 19 | >3 anos | F | Cush | Ñ | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 20 | >3 anos | F | Misto | S | 4 | S | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 21 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 22 | <3 anos | F | Viril. | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 23 | >3 anos | F | Viril. | Ñ | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 24 | >3 anos | M | Misto | S | 2 | Ñ | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 25 | <3 anos | F | Viril. | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 26 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 27 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 28 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 29 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 30 | >3 anos | F | S/Sint. | Ñ | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |

| Amostra | Idade | Gênero | Sintomas | R337H | Sandrini | Metástase | Recidiva | Evento | Desfecho | miR 483-3p | miR 630 |
|---------|---------|--------|----------|-------|----------|-----------|----------|-----------|----------|------------|----------|
| TU 31 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 32 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | X | √ |
| TU 33 | <3 anos | F | S/Sint. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 34 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 35 | <3 anos | F | Misto | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 36 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 37 | <3 anos | M | Viril. | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 38 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 39 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 40 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 41 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 42 | <3 anos | M | S/Sint. | Ñ | 4 | S | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 43 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 44 | >3 anos | F | Viril. | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 45 | <3 anos | M | Misto | S | 4 | S | S | Rec/Óbito | Vivo | √ | √ |
| TU 46 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 47 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 48 | <3 anos | F | Misto | S | 2 | Ñ | Ñ | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 49 | >3 anos | F | Misto | S | 2 | Ñ | S | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 50 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 51 | >3 anos | F | Viril. | Ñ | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 52 | <3 anos | F | Misto | S | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | X |
| TU 53 | <3 anos | F | Misto | S | 1 | Ñ | S | Rec/Óbito | Vivo | √ | √ |
| TU 54 | <3 anos | F | Viril. | S | 3 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 55 | <3 anos | F | Misto | S | 3 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | X |
| TU 56 | <3 anos | F | Viril. | S | 3 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 57 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | S | Rec/Óbito | Vivo | √ | √ |
| TU 58 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 59 | <3 anos | F | Viril. | Ñ | 2 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 60 | <3 anos | F | Misto | S | 4 | S | Ñ | Rec/Óbito | Óbito | √ | √ |
| TU 61 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 62 | <3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |

| Amostra | Idade | Gênero | Sintomas | R337H | Sandrini | Metástase | Recidiva | Evento | Des fecho | miR 483-3p | miR 630 |
|---------|---------|--------|----------|-------|----------|-----------|----------|--------|-----------|------------|---------|
| TU 63 | >3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 64 | >3 anos | M | Viril. | S | 3 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 65 | <3 anos | M | Misto | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 66 | <3 anos | M | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | X |
| TU 67 | >3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |
| TU 68 | >3 anos | F | Viril. | S | 1 | Ñ | Ñ | Vivo | Vivo | √ | √ |

Legenda: Idade: Idade Diagnóstico. Gênero: M- Masculino, F- Feminino. Sintomas: Viril - Virilizante, Cushing, S/ Sint. - Sem hormônio. R337H: Mutação no TP53: S- Sim, Ñ- Não. Sandrini: Classificação Sandrini: 1 e 2- prognóstico favorável, 3 e 4- prognóstico desfavorável. Metástase: S- Sim, Ñ- Não. Quimioterapia: S- Sim, Ñ- Não. Recidiva: S-Sim, Ñ-Não. Evento: Rec/Óbito - Recidiva e/ou Óbito. S/ INF: Sem informação disponível. √ - Amostra utilizada na expressão do miRNA. X - Amostra não utilizada na expressão do miRNA.

Sobrevida Livre de Eventos e Global

| | Sobrevida livre de Eventos | Sobrevida Global |
|--------------------|---|---|
| miRNA 630 | 87,1 ± 6,0 versus 62,8 ± 9,0 (P=0,045) | 87,1 ± 6,0 versus 76,8 ± 7,7 (P=0,313) |
| miRNA 483-3p | 71,3 ± 8,1 versus 81,5 ± 6,8 (P=0,393) | 72,2 ± 7,9 versus 94,0 ± 4,1 (P=0,028) |
| Idade | 83,1 ± 5,5 versus 60,6 ± 11,6 (P=0,072) | 91,6 ± 4,0 versus 63,2 ± 11,1 (P=0,007) |
| Gênero | 66,7 ± 12,2 versus 79,5 ± 5,8 (P=0,281) | 80,0 ± 10,3 versus 83,8 ± 5,3 (P=0,643) |
| Sintomas Hormonais | 90,0 ± 4,7 versus 53,3 ± 10,6 (P=0,001) | 92,5 ± 4,2 versus 67,2 ± 9,6 (P=0,003) |
| Tamanho Tumoral | 85,8 ± 5,0 versus 50,0 ± 14,4 (P=0,008) | 91,7 ± 4,0 versus 58,3 ± 14,2 (P=0,003) |
| R337H | 73,5 ± 6,3 versus 87,5 ± 11,7 (P=0,361) | 79,7 ± 5,8 versus 0 (P=0,179) |
| Sandrini | 87,8 ± 5,1 versus 60,2 ± 14,0 versus 16,7 ± 15,2 (P=0,000012) | 95,1 ± 3,4 versus 68,8 ± 13,1 versus 28,6 ± 11,1 (P=0,000022) |
| Metástase | 16,7 ± 15,2 versus 82,6 ± 5,0 (P=0,000008) | 28,6 ± 17,1 versus 89,8 ± 4,0 (P=0,000008) |

11.2. Apêndice 2. Dados Clínicos Pacientes Pediátricos sem TAC

| Amostra | Idade | Gênero | miR-483-3p | miR-630 |
|-----------|----------|--------|------------|---------|
| Normal 1 | < 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 2 | < 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 3 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 4 | < 3 anos | M | √ | √ |
| Normal 5 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 6 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 7 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 8 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 9 | > 3 anos | F | √ | √ |
| Normal 10 | | | √ | √ |
| Normal 11 | | | √ | √ |
| Normal 12 | | | √ | √ |
| Normal 13 | | | √ | √ |
| Normal 14 | | | √ | √ |
| Normal 15 | | | √ | √ |
| Normal 16 | | | √ | √ |
| Normal 17 | | | √ | √ |
| Normal 18 | | | √ | √ |
| Normal 19 | | | √ | √ |

Legenda: Idade: Idade Diagnóstico. Gênero: M- Masculino, F- Feminino. √ - Amostra utilizada na expressão do miRNA

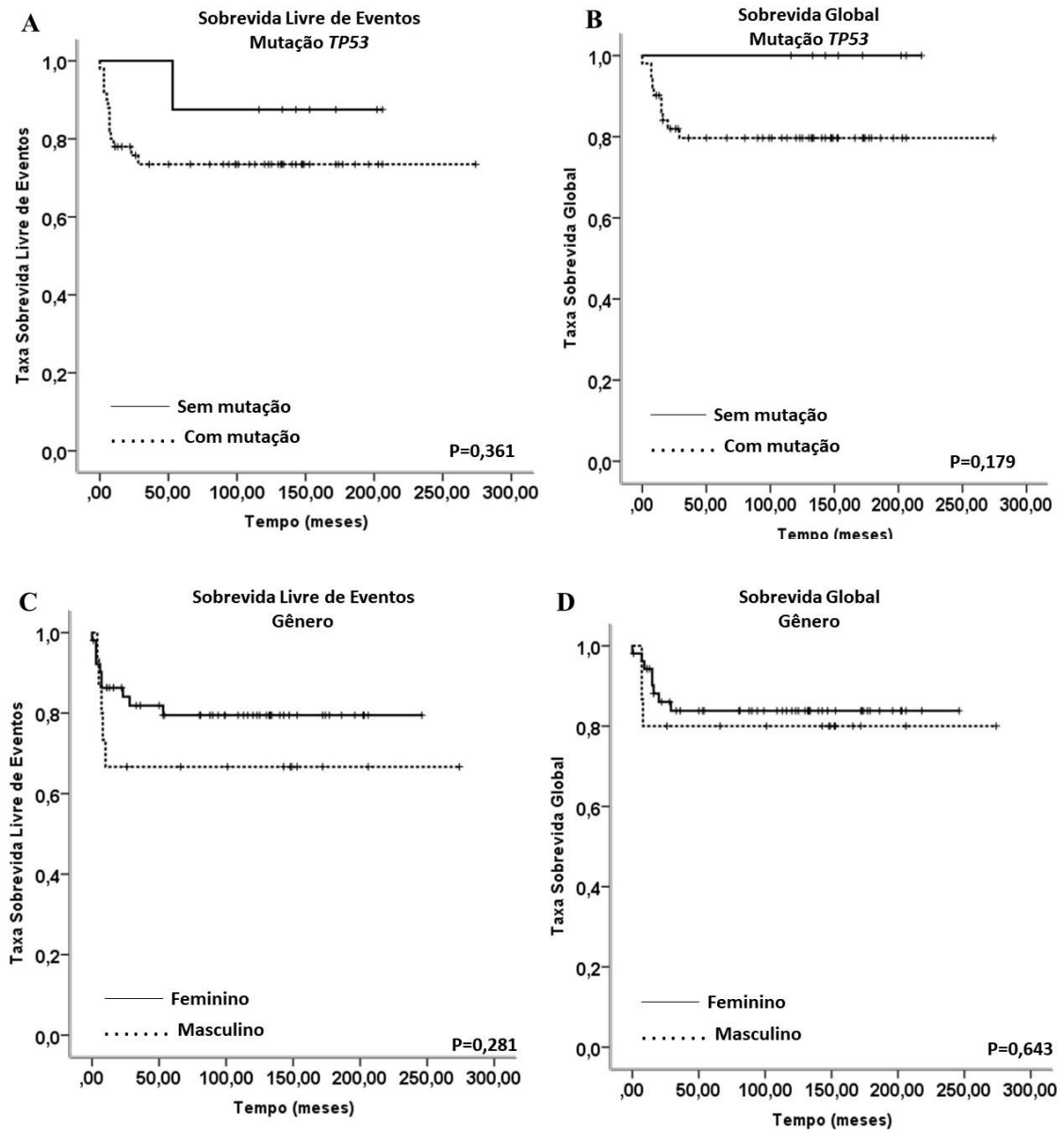
11.3. Apêndice 3. Tabela com sondas dos miRNAs e genes utilizados

| Gene / miRNA | Código | Catálogo | Empresa |
|-----------------------|---------------|-----------------|----------------|
| Hsa-miR-630 | 001563 | #4427975 | ThermoFisher |
| Hsa-miR-483-3p | 002339 | #4427975 | ThermoFisher |
| RNU6B | 001093 | #4427975 | ThermoFisher |
| RNU48 | 001006 | #4427975 | ThermoFisher |
| TGFB1 | Hs00998133_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFB2 | Hs00234244_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFBR1 | Hs00610320_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFBR2 | Hs00234253_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Smad3 | Hs00969210_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Smad7 | Hs00998193_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Gus | Hs00939627_m1 | #4331182 | ThermoFisher |

11.4. Apêndice 4. Tabela com os anticorpos utilizados

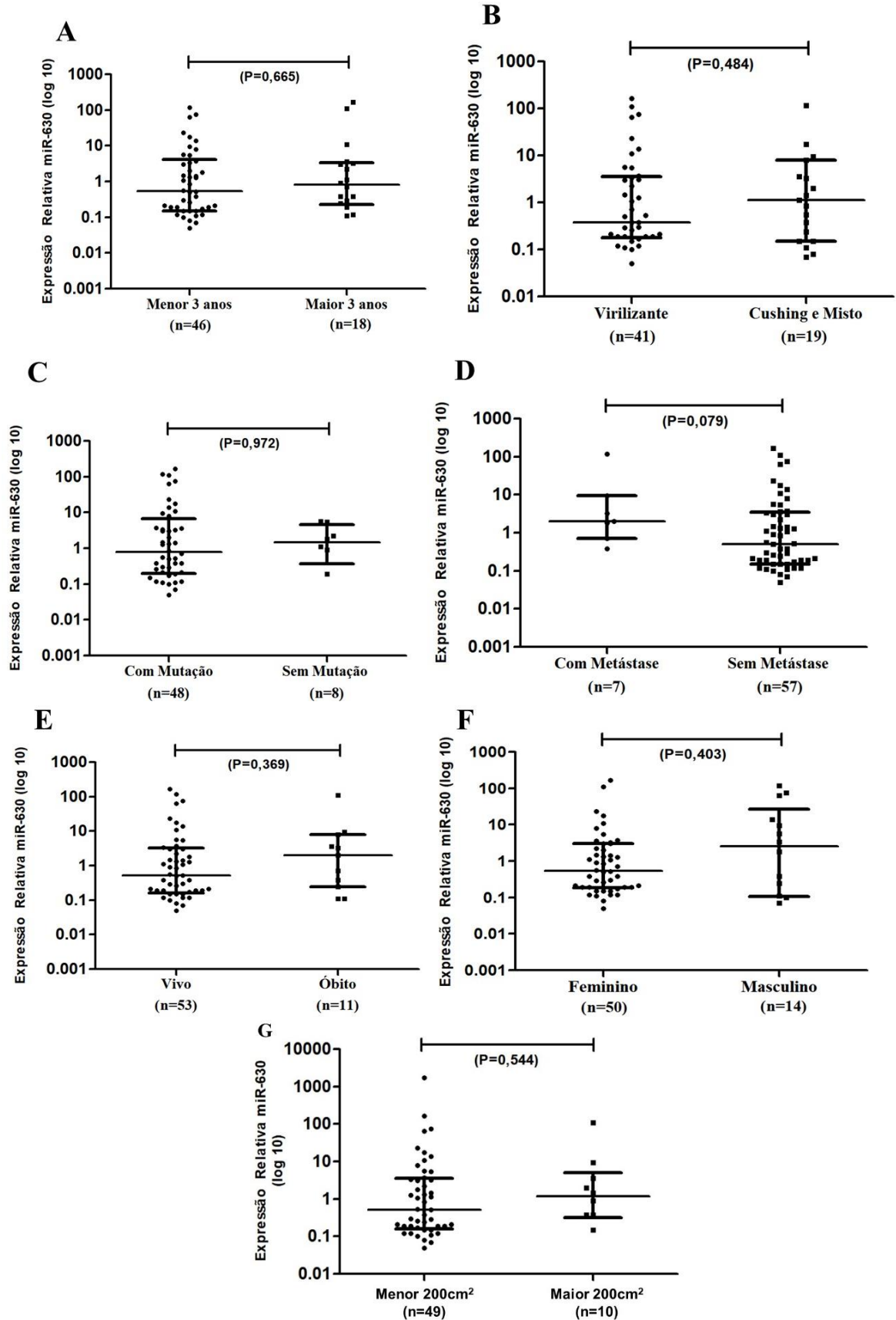
| Anticorpo | Código | Empresa |
|--------------------------|---------------|-----------------|
| Smad3-Total | Ab122028 | Abcam |
| Smad3-Fosforilado | Ab63403 | Abcam |
| Smad 2/3 | D7G7 | Cell Signalling |
| Vimentina | Ab16700 | Abcam |
| N-caderina | Ab18203 | Abcam |
| Slug | C1967 | Cell Signalling |
| GAPDH | Sc47724 | Santa Cruz |

11.5. Apêndice 5. Sobrevida Global e Livre de Eventos associadas com mutação no TP53 e Gênero



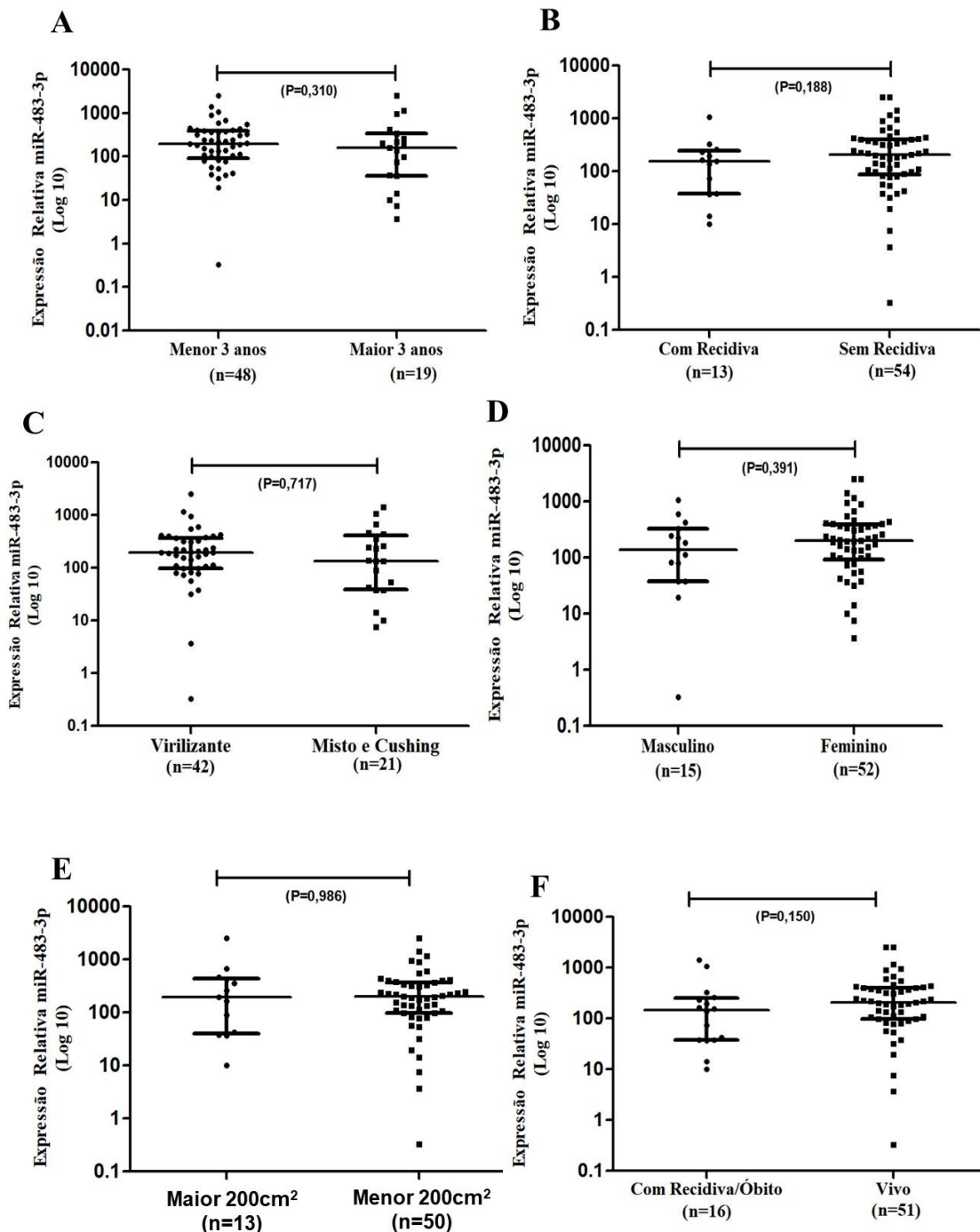
Associa o da sobrevida dos pacientes com suas condi es clínicas. Avaliando cada parâmetro clínico, dois parâmetros não apresentaram dados significativos. Como a muta o do TP53 (**A e B**), onde os pacientes que apresentaram muta o tiveram pior sobrevida global e livre de eventos; e o gênero (**C e D**), que indica uma sobrevida mais baixa para os meninos, em rela o as meninas. Esses dados foram obtidos após aplicar o teste Log-Rank e as curvas foram construídas de acordo com Kaplan-Meier. Foram considerados significativos os valores de $P \leq 0,05$.

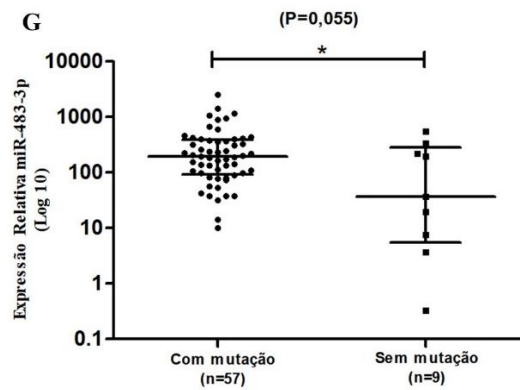
11.6. Apêndice 6. Expressão miR-630 de acordo com dados clínicos dos pacientes (dados não significativos).



Associação da expressão do miR-630 e as características clínicas dos pacientes. Através da técnica de RT-qPCR foi avaliado o nível de expressão do miR-630 e feitas associações com o comportamento clínico dos pacientes avaliados. As características (A) idade ao diagnóstico; (B) produção hormonal; (C) mutação no TP53; (D) metástase; (E) desfecho clínico – se o paciente foi à óbito ou não; (F) gênero e (G) tamanho tumoral, não apresentaram resultados significativos para a expressão do miR-630. Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$, obtidos através do teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

11.7. Apêndice 7. Expressão do miR-483-3p de acordo com dados clínicos dos pacientes (dados não significativos).

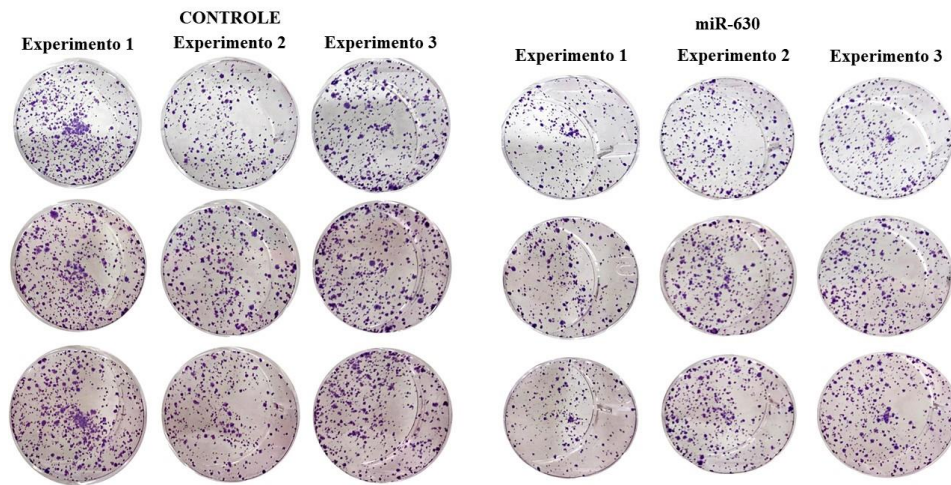




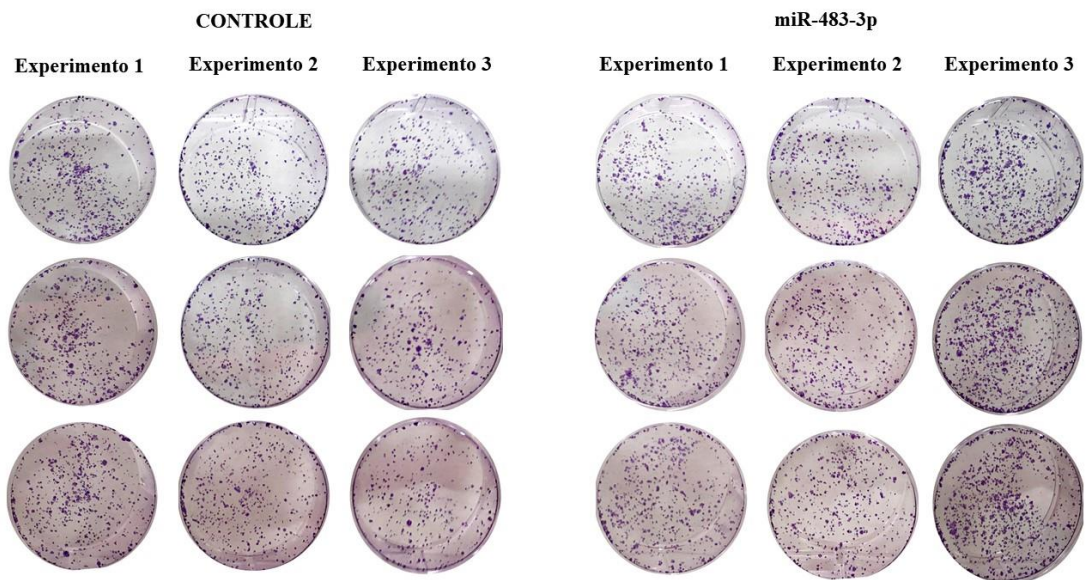
Associação da expressão do miR-483-3p e as características clínicas dos pacientes. Através da técnica de RT-qPCR foi avaliado o nível de expressão do miR-483-3p e feitas associações com o comportamento clínico dos pacientes avaliados. As características (A) idade ao diagnóstico; (B) recidiva; (C) produção hormonal; (D) gênero; (E) tamanho tumoral, (F) presença de algum evento (recidiva ou óbito) e (G) mutação no *TP53* não apresentaram dados significativos. Cada amostra foi amplificada em duplicata, sendo consideradas para análise as amostras cujo desvio não excedeu um ciclo ($d < 1,0$) e considerou-se como significativo os valores de $P \leq 0,05$, obtidos através do teste de Mann-Whitney. As amostras cujo valor da expressão foi igual a zero não estão representadas no gráfico, mas foram consideradas para a análise estatística.

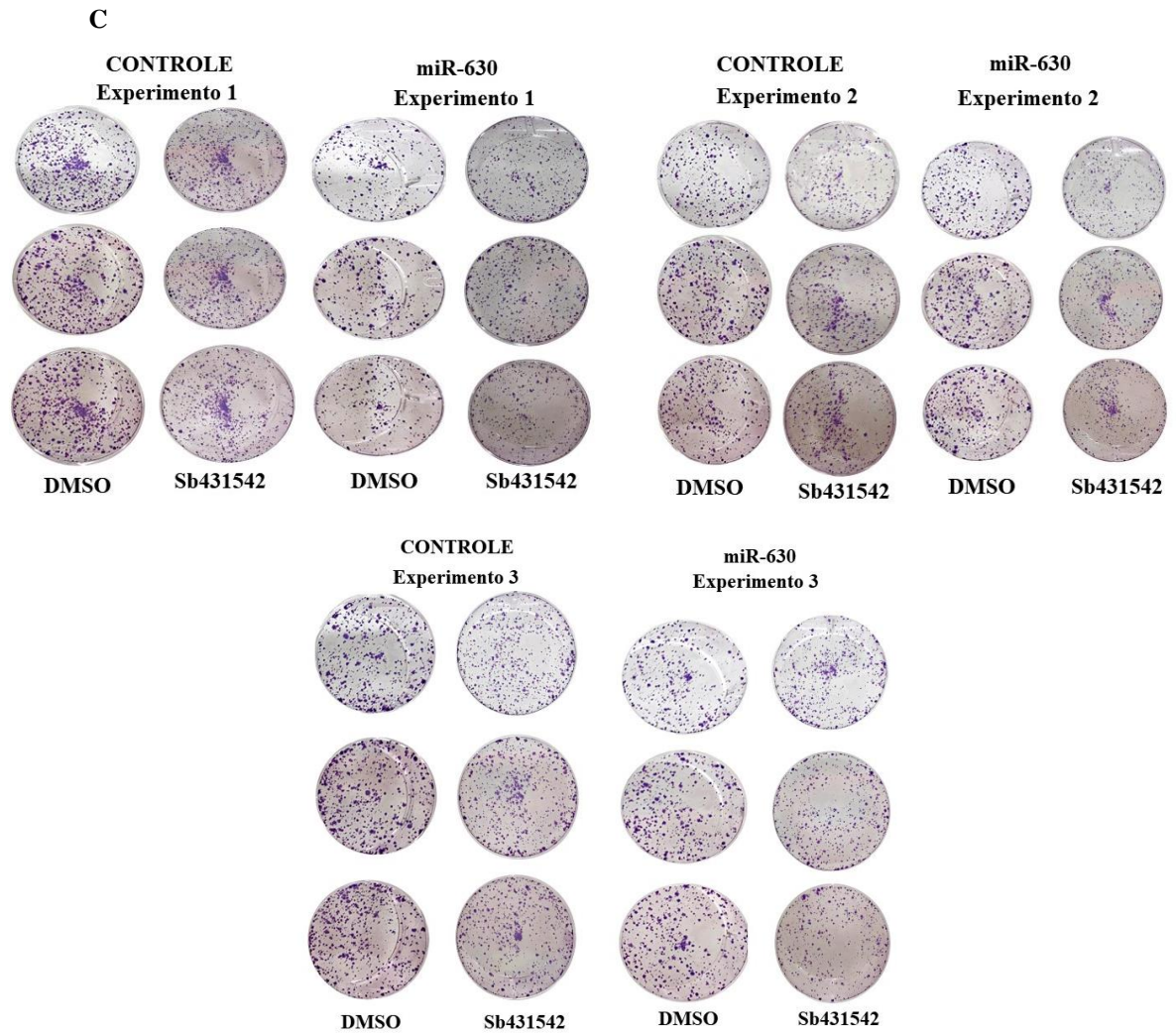
11.8. Apêndice 8. Ensaio de formação de colônias

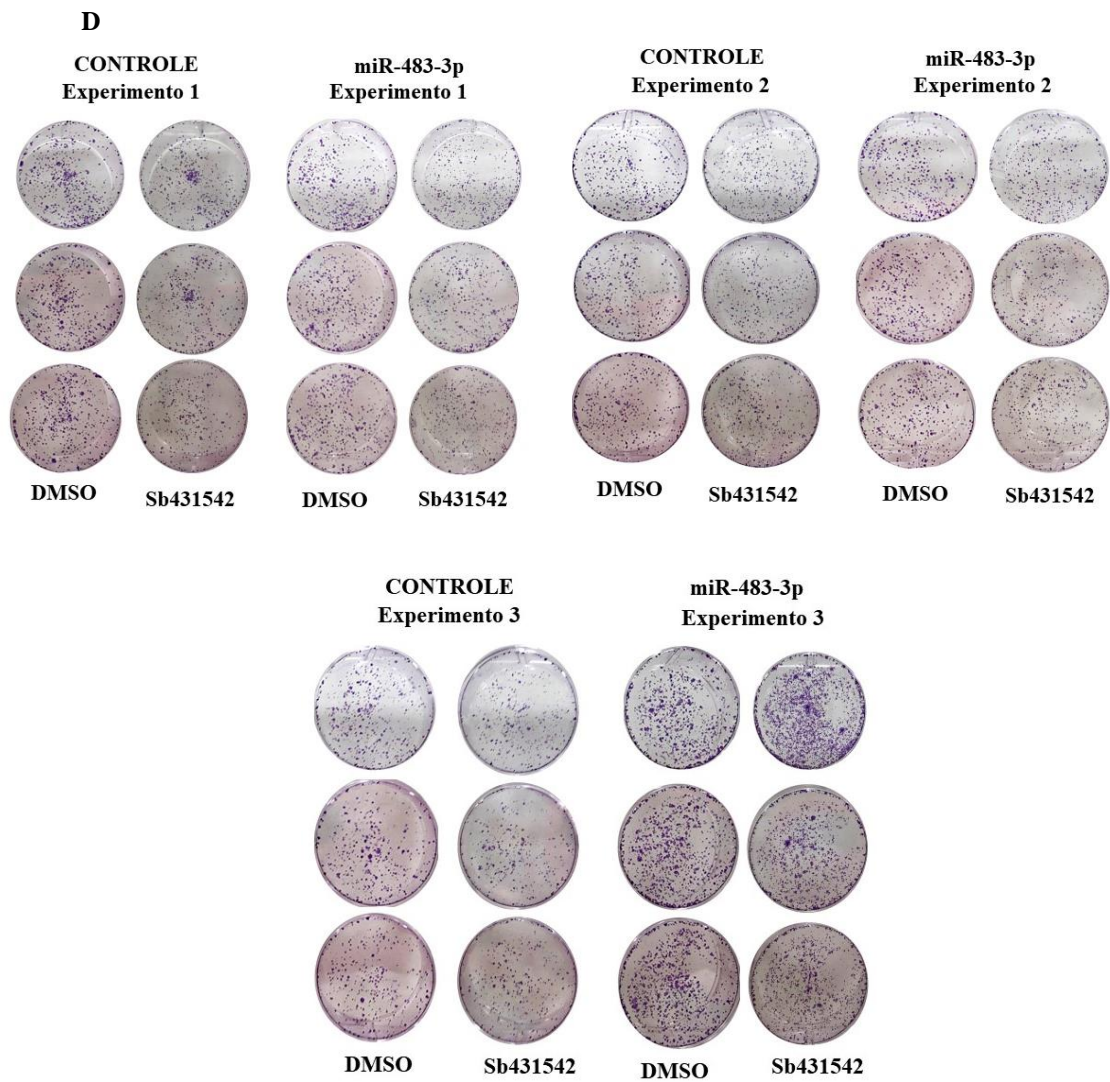
A



B







Ensaio de formação de colônias. Fotos representativas dos três experimentos realizados em triplicata para (A) o miR-630; (B) para o miR-483-3p; (C) para o miR-630 juntamente com o tratamento com o inibidor, SB431542, e (D) para o miR-483-3p juntamente com o tratamento com o inibidor.

12. ANEXOS

12.1. ANEXO 1 - Termo de consentimento livre e esclarecido

Eu, _____
 , RG. _____ li e entendi toda a informação que me foi fornecida sobre
 minha participação no estudo “**ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA
 CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS
 FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO**” e tive a oportunidade de
 discutir e tirar minhas dúvidas.

Todas as minhas perguntas foram respondidas satisfatoriamente e concordo em
 participar voluntariamente do presente estudo.

Entendo que receberei uma cópia desse termo de consentimento livre e esclarecido
 assinado. Autorizo a divulgação dos resultados dos meus exames ou da criança ou adolescente
 sob minha responsabilidade legal em revistas médicas nacionais e internacionais. Entendi que
 todas as informações que fornecidas serão processadas e analisadas de maneira confidencial.

Nome do paciente:

Nome do responsável:

Assinatura

Data: ____/____/____

Responsável pelo estudo: Prof Dr Carlos Alberto Scrideli, Professor Associado,
 Departamento de Puericultura e Pediatria, FMRP-USP

Assinatura

Data: ____/____/____

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Grupo com neoplasia

Nome da Pesquisa: ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO.

Pesquisador Responsável: Carlos Alberto Scrideli

Informações e Esclarecimentos

Prezado paciente e responsável,

O (a) senhor (a) está sendo convidado (a) para participar de um estudo clínico, coordenado por Carlos Alberto Scrideli, docente do Departamento de Puericultura e Pediatria da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Hospital das Clínicas.

Antes de decidir se quer participar, é importante que o (a) senhor (a) entenda a razão deste estudo e os possíveis benefícios, riscos e desconforto.

Por favor, leia atentamente todas as informações deste folheto e faça perguntas se tiver qualquer dúvida.

Qual o objetivo deste estudo?

O objetivo deste estudo é buscar novas possibilidades para identificar genes que possam estar associados ao desenvolvimento e agressividade dos principais tipos de câncer da criança e do adolescente.

Sabemos que nas células do câncer, estes genes que serão estudados produzem substâncias (proteínas) com função alterada que podem ser responsáveis pelo desenvolvimento da doença e agressividade da mesma.

Por isto, este trabalho pretende encontrar alterações nas células tumorais que possa ajudar no entendimento de como o câncer ocorre, abrindo perspectivas de novos tratamentos.

A criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal irá retirar um pedaço do tumor ou da medula óssea que será utilizada para fazer o diagnóstico anátomo-patológico. Depois dos testes, grande parte da amostra do tumor retirada ou medula óssea fica guardada como arquivo no laboratório. Esta parte guardada é a que gostaríamos de utilizar. Para este estudo, este material retirado será útil para sabermos como se comporta o tumor para assim estudarmos o que está errado no tecido doente.

Como será o estudo?

O estudo será feito com o material retirado na hora da cirurgia ou biópsia de tratamento do tumor. Neste pedaço iremos estudar o comportamento de diversas moléculas que estão no interior das células com câncer e se estas moléculas podem ter importância no tratamento da doença.

Preciso participar?

A sua participação no estudo é voluntária e depende só do (a) senhor (a). Se decidir participar, o senhor deve assinar este documento chamado de Consentimento Livre e Esclarecido. Mesmo decidindo participar, poderá desistir a qualquer momento.

Se o (a) senhor (a) não participar do estudo ou desistir de participar, isso em nada afetará o atendimento neste hospital e continuará recebendo do seu médico o melhor tratamento que ele pode oferecer.

O que devo fazer?

Você não deverá fazer nada e o estudo será realizado com o material que será retirado devido ao tratamento de sua doença ou da doença que a criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal, não sendo necessária a coleta de nenhum material adicional.

Quais são os possíveis benefícios?

Os benefícios serão os de entender melhor este tipo de câncer e da possibilidade da descoberta de novos tipos de tratamento para estas doenças.

A informação obtida será confidencial?

As informações sobre as condições de saúde serão arquivadas, mas seu nome não será incluído. A identificação será por um número, mantendo-se confidencial. Somente seus médicos saberão que as informações estão relacionadas com o (a) senhor(a) ou da criança ou adolescente sob sua responsabilidade legal.

O resultado deste estudo será publicado em revistas médicas nacionais e internacionais, mas sua identidade será preservada.

E se eu tiver dúvidas?

Se o (a) senhor (a) tiver alguma dúvida sobre o estudo, por favor, entre em contato com:

Carlos Scrideli – Telefones (16) 3602-2651 ou (16) 8119-3449, E-mail:

scrideli@fmrp.usp.br

12.2. ANEXO 2 - Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMRP-USP



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.usp.br



Ribeirão Preto, 23 de julho de 2010

Ofício nº 2436/2010
CEP/MGV

Prezado Professor,

O trabalho intitulado **“ESTUDOS MOLECULARES EM NEOPLASIAS DA CRIANÇA E DO ADOLESCENTE: ASSINATURA DE MICRORNAS E ESTUDOS FUNCIONAIS DE GENES CANDIDATOS A TERAPIA ALVO”** foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 8380/2010.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DR^a MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimo Senhor
PROF. DR. CARLOS ALBERTO SCRIDELI
Depto. de Puericultura e Pediatria

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA – 0000 2733; IRB – 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

MANUSCRITO DO PRESENTE ESTUDO

Analysis of the expression profile of miR-483-3p and miR-630 in adrenocortical tumors and the effect of this modulation on adrenal tumorigenesis.

Carolina Alves Pereira Corrêa¹, Augusto Faria Andrade², Luciana Chain Veronez³, Ketheryne Rodrigues da Silva¹, Mirella Baroni¹, Veridiana Kill Suazo³, Rosane de Paula Gomes Queiroz³, Silvia Regina Brandalise⁴, José Andres Yunes⁴, Sonir Roberto Rauber Antonini³ Luiz Gonzaga Tone^{1,3}, Carlos Alberto Scrideli^{1,3}.

¹Department of Genetics - FMRP, USP, Ribeirão Preto, Brazil.

²Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada

³Department of Childcare and Pediatrics - FMRP, USP, Ribeirão Preto, Brazil.

⁴Boldrini Children's Center, Campinas, Brazil

Corresponding author: Carolina Alves Pereira Corrêa, Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes 3900, 14048-900 Ribeirão Preto, SP, Brazil. Fone: +55 16 3602-2651 Fax: Email: carolinaalves@usp.br

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

Support and Financial Disclosure Declaration

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, process number 2010/07020-9), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, process number 140956/2016-6). Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo is also acknowledged.

ABSTRACT

The pediatric adrenocortical tumor (ACT) is rare cancer, with low incidence, and overall 5-year survival ranging from 54-77%. In the south/southeast of Brazil, this incidence is 10-15 times higher than in the rest of the world, possibly due to the presence of a germline mutation in the TP53 gene. Current treatment consists of surgical resection and, in more advanced cases, the use of mitotane associated or not with chemotherapy. Despite this treatment, about 50% of patients experience recurrence. There is great difficulty in classifying these tumors according to their histological grade and malignancy, and so far, there is no precise characterization of molecular subgroups associated with clinical outcome. For the prognostic definition, clinical staging has been used, but not always with a good correlation with the outcome of the disease. Therefore, there is a great need to better understand the biology of ACT, so that the prognosis and therapy of these patients are better targeted. Among the alterations described for this tumor, little is known about the action of miRNAs in pediatric ACT, as well as the relationship between this dysregulation and the TGF- β development pathway. The aim of this study was to investigate the expression of miR-483-3p and miR-630 in ACT cell lines, tumor samples from pediatric patients and non-neoplastic controls, the effects of their modulations and their relationship with the functioning of the TGF- β . It was observed that miR-483-3p show greater expression in tumor samples compared to non-neoplastic samples, while miR-630 showed no difference, but the dysregulation of both was associated with patients' prognosis, as they are related to survival, stages advanced, with relapse, metastasis, and death. In addition, when modifying the expression of miR-483-3p and miR-630 in vitro, a decrease in cell viability and colony formation was observed, as well as changes in the expression of some genes of the TGF- β pathway, such as TGFBR1, TGFBR2, and SMAD7; in addition to changes in the expression of the Smad3, pSmad3, Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin proteins. Besides that, the combination of inhibition of the TGF- β pathway with increased expression of miR-630 or silencing of miR-483-3p promoted a decrease in cell viability, colony formation, and altering protein expression the pathway in question. All the data together indicate that both miRNAs can be potential markers to predict the prognosis of patients with ACT since they are involved with the TGF- β pathway.

Keywords: Adrenocortical Tumor, miRNA, TGF- β

INTRODUCTION

Pediatric adrenocortical tumor (ACT) is a rare disease, with a worldwide incidence of 0.3 cases per million children per year (ELSE; KIM; SABOLCH; RAYMOND *et al.*, 2014); with an overall survival rate in 5 years between 54-77% (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). An exception occurs in the South of Brazil, which has an incidence 10-15 times higher (RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004; SANDRINI; RIBEIRO; DELACERDA, 1997), possibly related to a germline mutation in the *TP53* gene (RIBEIRO; SANDRINI; FIGUEIREDO; ZAMBETTI *et al.*, 2001).

The treatment used for these patients is a combination of mitotane, cisplatin, etoposide and doxorubicin (BERRUTI; TERZOLO; PIA; ANGELI *et al.*, 1998; RODRIGUEZ-GALINDO; FIGUEIREDO; ZAMBETTI; RIBEIRO, 2005; ZANCANELLA; PIANOVSKI; OLIVEIRA; FERMAN *et al.*, 2006). Complete resection of the tumor is recommended as the only effective treatment, showing a 80% chance of cure for those with small tumors (MASTELLARO; RIBEIRO; OLIVEIRA-FILHO; SEIDINGER *et al.*, 2018). However, 30-50% of patients have local or distant recurrences (JOHNSON; GRECO, 1986; MASTELLARO; RIBEIRO; OLIVEIRA-FILHO; SEIDINGER *et al.*, 2018).

The genetic characterization of pediatric tumors is very precarious, studies suggest the involvement of IGF, WNT and apoptosis pathways in pediatric ACT (LEAL; MERMEJO; RAMALHO; MARTINELLI *et al.*, 2011; LOREA; MORENO; BORGES; MARTINELLI *et al.*, 2012; PEIXOTO LIRA; FEDATTO; MARCO ANTONIO; LEAL *et al.*, 2016), as well as the involvement of steroidogenesis genes, such as *SFI* (FIGUEIREDO; CAVALLI; PIANOVSKI; LALLI *et al.*, 2005; PIANOVSKI; CAVALLI; FIGUEIREDO; SANTOS *et al.*, 2006).

Little is known, however, about the involvement of the TGF- β pathway in pediatric ACT, a pathway involved in the correct functioning and maturation of the adrenal gland (MASSAGUÉ, 1990), whose effect is variable and seems to be dependent on cell type. Because of this, it plays an important role in cancer, having activities of both tumor suppressor oncogenic (IKUSHIMA; MIYAZONO, 2010; MASSAGUÉ, 2008). In general, TGF- β pathway stimulates the proliferation of mesenchymal cells and inhibits the proliferation of epithelial cells (ROBERTS; FLANDERS; KONDAIAH; THOMPSON *et al.*, 1988); in addition it modulates cell differentiation and is related to the hormonal production of steroid cells (MESIANO; JAFFE, 1997).

Also, studies indicate that microRNAs (miRNAs) are associated with the progression of ACT (HASSAN; ZHAO; SIDHU, 2016), where the abnormal expression of miRNAs was

associated with clinical and pathological characteristics in this tumor (NAKAMURA; YAMAZAKI; FELIZOLA; ISE *et al.*, 2015). However, the understanding of miRNAs in the pathogenesis of this disease is still poorly studied (CHERRADI, 2015).

It has been shown that the expression of TGF- β and Smads receptors and ligands is also under the control of miRNAs (BLAHNA; HATA, 2012). The deregulation of miRNA expression can even promote uncontrolled TGF- β signaling activity and contribute to numerous pathogenesis, such as tumorigenesis (BLAHNA; HATA, 2012).

Therefore, further studies are needed to identify miRNAs that can be used as molecular markers of worse prognosis in pediatric patients.

Here, this study aimed to characterize the expression of miR-483-3p and miR-630 in samples from patients with ACT and their non-neoplastic counterpart and to investigate how deregulation of these miRNAs can contribute to the development and progression of those tumors.

MATERIAL AND METHODS

Biological samples

Sixty-seven tumor samples and nineteen control samples from the adrenal gland of pediatric patients without a diagnosis of ACT were used. Each of these samples was obtained at two reference centers in southeastern Brazil: Ribeirão Preto Medical School - FMRP / USP and the Centro Infantil Boldrini - UNICAMP. The data regarding the patients are shown in **Table 1**.

RNA extraction and cDNA synthesis

The patients' samples and cell lines had their total RNA extracted using the TRIZOL® reagent (Invitrogen Inc, Carsdab, CA, USA) according to the manufacturer's specifications. The synthesis of cDNA was performed according to the protocol provided by the manufacturer, using primers specific for miRNAs and the High Capacity® kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), according to the protocol suggested by the manufacturer.

Cell lines and culture conditions.

Two ACT cell lines were used, H295R and H295A, kindly provided by Prof. Dr. Sonir Atonini of the Department of Endocrinology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto. Both are derived from the same strain, H295, from the cortex of the adrenal gland of a 48-year-old woman. H295R was maintained in DMEM-F12 medium (Gibco BRL, ThermoFisher) supplemented

with 2% NuSerum (Corning™) and 1% ITS (BD Biosciences); H295A was maintained in RPMI medium (Gibco BRL, ThermoFisher) supplemented with 2% SBF (Gibco BRL, ThermoFisher) and 1% ITS (Gibco BRL, ThermoFisher). Both with the addition of 60mg / mL of penicillin and 100µg / mL of streptomycin, in a humid atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. The authenticity of the strains was tested through the STR marker profile (Short Tandem Repeats) using the methodology standardized by the ATCC (ANSI / ATCC-0002-2011).

Evaluation of miRNAs and mRNA expression in TAC samples and cell lines.

The expression level of miR-483-3p, miR-630, endogenous miRNAs (RNU6B and RNU48), *TGFB1*, *TGFB2*, *TGFB1*, *TGFB2*, *SMAD3* and *SMAD7* genes and endogenous, *GUS*, were quantified using the real-time PCR technique (RT-qPCR). The TaqMan® probes were purchased using Applied Biosystems' on-demand system (**Supplementary 1**) and the Universal PCR Master Mix (GoTaq® Probe qPCR Master Mix, Promega) was used. Each sample was amplified in duplicate and the quantification of the miRNA and / or target gene normalized with the endogenous genes and in relation to the calibrator was obtained by the formula: $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Inhibition of miR-483-3p expression and increased miR-630 expression in ACT cell lines.

Both cell lines, H295A and H295R, underwent lentiviral transduction. To inhibit miR-483-3p expression, MISSION® Lenti microRNA Inhibitor lentiviral vectors (HLTUD0592 - hsa-miR-483-3p and the negative control HLTUD001C - Negative Control 1 - Sigma-Aldrich) were used; and to increase the expression of miR-630 lentiviral vectors MISSION® Lenti microRNA mimic (HLMIR0861 - hsa-miR-630 and the negative control NCLMIR001 - Negative Control 1 - Sigma-Aldrich) were also used. The cells were seeded in a 96-well plate at a density of 3.5×10^4 and 24 hours later, transduction was performed, adding the lentiviruses in the appropriate concentrations in each well. The MOI (multiplicity of infection) used for the miR-483-3p was 5 and for the negative control, 0.5; and for miR-630 the MOI used was 1.0 and for its negative control, the MOI was 1.5. MOI is the number of lentiviral particles, calculated based on the number of cells per well and the product stock concentration. Five days later, the cells started to be selected using Puromycin (5µg / mL) (P8833 - 25mg - Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA). The efficiency of miRNA silencing and hyperexpression was confirmed using RT-qPCR.

Table 1. Clinical data of pediatric patients with Adrenocortical Tumors.

| Category | Variable | Quantity (in %) |
|-----------------------------------|--------------------|------------------------|
| Age | < 3 years | 72,1% |
| | > 3 years | 27,90% |
| Gender | Female | 77,90% |
| | Male | 22,1% |
| Metastasis | Yes | 10,30% |
| | No | 89,70% |
| Relapse | Yes | 19,10% |
| | No | 80,90% |
| Event | Recurrence / Death | 23,50% |
| | Live | 76,50% |
| Outcome | Death | 16,20% |
| | Live | 83,80% |
| TP53 Mutation | Yes | 85,29% |
| | No | 13,23% |
| | No information | 1,48% |
| Chemotherapy | Yes | 20,5% |
| | No | 78% |
| | No information | 1,50% |
| Hormone | Cushing | 4,4% |
| | Virilizing | 61,80% |
| | Mixed | 26,50% |
| | none | 7,3% |
| Classification of Sandrini | I | 61,80% |
| | II | 20,60% |
| | III | 7,3% |
| | IV | 10,30% |

Cell viability assay.

The Cell Titer-Glo® cell viability kit (Promega) was used, according to the manufacturer's instructions. For this, cells were seeded at initial densities of 2×10^4 in 96-well plates in triplicate and maintained in culture conditions. The analyzes were performed at 24, 48, 72 and 96 hours. In each time interval, 30 μ L of the Cell Titer Glo® reagent was added, kept in agitation for 5 minutes and then 100 μ L of the content was transferred to a luminescence plate, also 96 wells, which was read on the SpectraMax device ® L Microplate Reader. Three independents in triplicate experiments were carried out and the results are expressed as mean \pm standard deviation.

Colony formation assay.

The cells were seeded in 12-well plates at a density of 2.5×10^3 and maintained in culture until the colonies were visible, but not confluent. After 15-20 days, the medium was removed, the cells were washed with PBS, fixed with methanol and stained with Giemsa. Cell counting was performed using the ImageJ 1.51j8 software (NIH, USA). Three independent experiments were carried out and the results are expressed as mean \pm standard deviation.

Migration Assay (Wound healing).

The protocol described by Liang et al. (2007) with some modifications (LIANG; PARK; GUAN, 2007). Briefly, the cells were seeded in 6-well plates at a density of 1×10^6 . After the cells reached confluence, a horizontal cell-free zone was created in the center of the plate, which was then photographed and used as zero time. These plates were maintained in adequate culture conditions and after 48, 72 and 96 hours the same wells were photographed to check whether the cells had migrated into the cell-free zone. The images were acquired by the Imaging NIS Elements V 5.11 software. The analysis was carried out according to the area, in relation to time zero, using the software ImageJ 1.51j8 (NIH, USA). Three independent experiments were carried out in triplicate.

Treatment with TGF- β pathway inhibitor, Sb431542

To inhibit the activity of the TGF- β pathway, the inhibitor SB431542 (5mg - Sigma-Aldrich) was used. A 10mM stock solution of the inhibitor was dissolved in DMSO, and the 10 μ M dose was used for the treatment of cells, according to previously describe (DEREBECKA-HOLYSZ; LEHMANN; HOLYSZ; TRZECIAK, 2009).

Western Blotting

Proteins were extracted from cell lines using RIPA Lysis and Extraction Buffer[®] reagent (Pierce Biotechnology, IL, USA), according to the manufacturer's instructions. Then, the quantification of these proteins was performed by Bradford method and each sample was subjected to separation by SDS-PAGE electrophoresis. The membranes were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (**Supplementary 2**) of the proteins of interest, diluted according to the manufacturer's instructions and for 60 minutes with the secondary antibody. The bands were detected by chemiluminescence by the ChemiDoc system (BioRad Laboratories, CA, USA) using the ECLTM Western Blotting System Kit (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Quantification of the bands for protein expression was performed using the ImageJ 1.51j8 software (NIH, USA).

Statistical analysis

The statistical analysis of the data was performed with the support of the SPSS 20.0 for Windows program (SPSS, Chicago, IL, USA) and GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The Mann-Whitney test was used for the analysis of gene expression. To analyze overall 5-year survival (OS) (with death from any cause as an unfavorable event) and event-free survival at 5 years (EFS) (with recurrence or death as an unfavorable event), a univariate analysis was performed where the Log-Rank test was applied and constructed Kaplan-Meier curves. The median of expression of each miRNA in the tumor samples were considered as the cutoff value for underexpression or overexpression. For the functional tests of cell viability, clonogenicity and migration, t-student tests, One Way Anova and post-test of Bonferroni were used. At least three independent experiments were performed, in triplicate, and results with $P \leq 0.05$ were considered statistically significant.

RESULTS

miR-483-3p and miR-630 expression are associated with a worse prognosis.

From previously results obtained in the microarray performed by our research group (FEDATTO, 2014), the expression of miR-483-3p and miR-630, were evaluated by RT-qPCR and it was possible to observe that miR-483-3p showed high expression in tumor samples compared to non-neoplastic samples ($P < 0.001$) (Figure 1A), while miR-630 showed no difference in expression between the two groups evaluated, as shown in figure 2A.

Patients with lower miR-483-3p expression had a worse OS ($P = 0.028$) (Figure 1B). The lowest expression was also found in patients who were classified as stage IV ($P = 0.014$) (Figure 1C); in patients with metastasis ($P = 0.012$) (Figure 1D) and who died ($P = 0.039$) (Figure 1E). In contrast, patients with higher miR-630 expression had worse EFS ($P = 0.045$) (Figure 2B); tumors classified as stage IV ($P = 0.022$) (Figure 2C); recurrence ($P = 0.012$) (Figure 2D) and died ($P = 0.014$) (Figure 2E). The other parameters evaluated did not show significant results (Supplementary 3 and 4). Therefore, in general, the higher expression of miR-630 and the lower expression of miR-483-3p seem to be associated with a worse prognosis for these patients

Silencing of miR-483-3p caused a decreasing in cell viability in ACT cell line.

To verify the effects of miR-483-3p on adrenal tumorigenesis, the miR-483-3p was silenced in the H295R cell line (87% silencing efficiency – Figure 3A) and cell viability, colony formation capacity and migration were evaluated. A decrease in cell viability was observed after 96 hours ($P < 0.01$) (Figure 3B). However, there was no difference in colony formation capacity ($P = 0.2002$) (Figure 3C), neither in the migration of these cells ($P > 0.05$) (Figure 3D). Suggesting that miR-483-3p can interfere with the tumor proliferation of ACT.

The increase in miR-630 expression reduced cell viability and colony formation.

When overexpressing miR-630 in the H295A cell line (Figure 4A), we observed a decrease in cell viability after 24h ($P < 0.001$) (Figure 4B), and colony formation capacity of these cells ($P = 0, 0028$) (Figure 4C). However, there was also no difference in cell migration compared to non-overexpressing miR-630 cells ($P > 0.05$) (Figure 4D). These data could be that miR-630 is important for tumor maintenance and growth.

miR-483-3p and miR-630 target genes from the TGF- β pathway

Trying to further understand the genes and/or pathways these miRNAs could be regulating, we used the miRWalk 2.0 database (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/>), to search for predicted and/or validated target genes of both studied miRNAs. Among several genes regulated by miR-483-3p and miR-630, a great number belonged to the TGF- β development pathway. The miR483-3p was related to *TGFBRI*, *TGFBR2*, *SMAD3*, *SMAD4*, *SMAD7*; and similarly, *TGFBRI*, *TGFBR2*, and *SMAD2* was associated to miR-630.

From this, we chose to investigate the role of the TGF- β pathway in this tumor, and its relationship with the miRNAs studied here. Thus, expression of genes belonging to this pathway was carried out in ACT cell lines with the silenced miR-483-3p and the upregulated miR-630. It was possible to observe that miR-630 overexpression, increased *TGFBR1* gene expression ($P < 0.05$) (Figure 5A), as well as the proteins Smad3, Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin (Figure 5B). On the other hand, the silencing of miR-483-3p induced an increase in the expression of *TGFBR2* and *SMAD7* ($P < 0.05$) (Figure 5C) and an increase in the expression of the same proteins (Figure 5D).

The inhibition of TGF- β pathway together with the differentiated expression of miRNAs allowed a decrease in cell viability and the capacity of colony formation.

To better understand the data obtained, we chose to investigate the effects of miRNA modulation combined with the inactivation of the TGF- β pathway. For this, the inhibitor SB431542 was used, at a dose of 10 μ M (DEREBECKA-HOLYSZ; LEHMANN; HOLYSZ; TRZECIAK, 2009)

By increasing the expression of miR-630 and treating the cells with the inhibitor SB431542, it was possible to observe that the combination resulted in a decrease in cell viability, after 96 hours of treatment ($P < 0.001$) (Figure 6A), as well as, less ability to form colonies in relation to cells only treated with the inhibitor, but with normal levels of miR-630 ($P = 0.034$) (Figure 6B).

The treatment with the inhibitor reduced cell viability for both cells with the miR-483-3p silenced and the control (only inhibitor) ($P < 0.05$). Only after 96 hours, the combination of TGF- β inhibitor and the silencing of miR-483-3p allowed a decreased in viability, which was not found in the control cells ($P < 0.05$) (Figure 7A). However, the silencing of miR-483-3p in conjunction with inhibitor, SB431542, did not show significant differences in colony formation capacity (Figure 7B). These results indicate that TGF- β pathway inhibition and the modulation of these miRNAs seem to contribute to the less aggressive behavior of cells.

The Smad3, pSmad3, Smad2 / 3, N-cadherin and Vimentin proteins are altered after inhibition with SB431542 and modulation of miRNAs.

As we can see in figure 8A, the treatment with the SB431542 inhibitor caused an increase in the expression of Smad3, Smad 2/3, Vimentin, and N-cadherin, in the control cells. However, when combining this treatment with increased expression of miR-630, it was possible to

observe an inversion of this effect, i.e., these proteins had their expression decreased, except Smad3.

When performing the same analysis, on the cells with the silenced miR-483-3p, we observed that pSmad3, Smad 2/3 and N-cadherin show a small decrease when we treat the cell line with the inhibitor, which does not occur with Smad3 and Vimentin (Figure 8B). Indicating that the differentiated expression of these miRNAs may interfere with the expression of the components of the TGF- β pathway, specially to miR-630.

DISCUSSION

Adrenocortical carcinoma is a rare, aggressive disease and pediatric patients with advanced stages of the disease generally have an unfavorable prognosis (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004). There is a great challenge in classifying these tumors as malignant or benign based on histological parameters (NAKAMURA; YAMAZAKI; FELIZOLA; ISE *et al.*, 2015; WAJCHENBERG; ALBERGARIA PEREIRA; MEDONCA; LATRONICO *et al.*, 2000; WIENEKE; THOMPSON; HEFFESS, 2003). As the only efficient treatment for this type of tumor is complete surgical resection and patients still die due to this malignancy (MICHALKIEWICZ; SANDRINI; FIGUEIREDO; MIRANDA *et al.*, 2004), searches for new therapies are growing, which focus on understanding of tumor biology and the behavior of these malignant cells to then prevent or decrease their growth.

In this context, the study of the role of miRNAs in cancer and ACT has been growing (CHERRADI, 2015); since it is known that these molecules exhibit a tissue-specific expression pattern, being able to play a critical role in the development, function, and maintenance of tissues and organs. Besides, miRNAs expression changes according to disease progression, helping to differentiate tumor stages (LAN; LU; WANG; JIN, 2015) and therapies response (ACUNZO; ROMANO; WERNICKE; CROCE, 2015).

It was shown here that miR-483-3p has increased expression in pediatric ACT samples compared to non-neoplastic samples, and that this higher expression is associated with a better prognosis in these evaluated patients. These data lead us to think that miR-483-3p can function as a biomarker in the stratification of patients and that its deregulation can contribute to the prognostic value. miR-483-3p has already been studied in some types of tumors, such as in pancreatic ductal adenocarcinoma (ABUE; YOKOYAMA; SHIBUYA; TAMAI *et al.*, 2015; HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011; WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015), in Wilms tumor (LIU; ROTH; YU; MORRIS *et al.*, 2013; VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010), as well as in colon cancer, liver (CUI; LIU; JIANG; YANG *et al.*, 2016;

VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010) and in breast cancer (MENBARI; RAHIMI; AHMADI; MOHAMMADI-YEGANEH *et al.*, 2020). And it is suggested that this miRNA is a good marker for the differential diagnosis between carcinomas and adenomas in adults (KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017; PEREIRA; MONTEIRO; ANTONINI; PIGNATELLI, 2019).

Although the deregulated expression of miR-483-3p in this tumor has been identified (DUREGON; RAPA; VOTTA; GIORCELLI *et al.*, 2014; FEINMESSER; BENBASSAT; MEIRI; BENJAMIN *et al.*, 2015; KOPERSKI; KOTLAREK; ŚWIERNIAK; KOLANOWSKA *et al.*, 2017; WANG; SUN; WU; ZHAO *et al.*, 2014; ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011), its fully function in ACT, relating its expression to possible genes/developmental pathways or its role as a prognostic marker has not been describe yet. Because it is located in the same chromosomal region as the IGF2 gene, the most expressed gene in the ACT (SOON; TACON; GILL; BAMBACH *et al.*, 2009), miR-483-3p has potencial to be an important target to be better understood.

In ACT pediatric patients, the underexpression of miR-483-3p has been associated with patients who have had a recurrence (DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010); which is in agreement with the findings in our data, where a lower expression of miR-483-3p was related to a worse prognosis. Doghman and colleagues used a smaller cohort compared to the present study (25 vs 67 samples) (DOGHMAN; EL WAKIL; CARDINAUD; THOMAS *et al.*, 2010). Therefore, our findings indicate that patients who show a decreased expression of this miRNA, may have a worse evolution of this disease.

We also demonstrated that the silencing of miR-483-3p decreased cell viability after 96 hours and increased the expression of TGFBR2 and Smad7 genes and the Smad3, p-Smad3, Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin proteins. These findings indicate that the differential expression of miR-483-3p can contribute to the deregulation of the TGF- β pathway

The silencing of miR-483-3p and a decreased cell viability has already been shown in some tumor types, such as hepatocellular carcinoma (VERONESE; LUPINI; CONSIGLIO; VISIONE *et al.*, 2010), pancreas (HAO; ZHANG; ZHOU; HU *et al.*, 2011; WANG; SUN; WU; YU *et al.*, 2015), esophageal squamous cell carcinoma (MA; HONG; XU; HAO *et al.*, 2016) and Wilms' tumor (CHE; GAO; TIAN; HU *et al.*, 2019), presenting the same result found in this study,

Ozata and colleagues also studied the silencing of miR-483-3p in H295R (ÖZATA; CARAMUTA; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ; AKÇAKAYA *et al.*, 2011) and also reported a

decrease in cell proliferation. However, they do not address other functional assays, such as the ability to form colonies and the rate of cell migration, as well as the relationship of miR-483-3p with developmental pathways, such as the TGF- β pathway, in adrenocortical tumors.

To better understand these relationships in ACT, we chose to use an inhibitor of the TGF- β pathway, SB431542, responsible for inhibiting the action of TGFBR1 (CHEN; ZHANG; DING; LIANG *et al.*, 2016; INMAN; NICOLÁS; CALLAHAN; HARLING *et al.*, 2002; SILJAMÄKI; RAPPU; RIIHILÄ; NISSINEN *et al.*, 2019). And when combining the silencing of miR-483-3p with the inactivation of the TGF- β pathway, we found no difference in cell viability or colony formation capacity. However, the silencing of miR-483-3p, promotes a decrease in pSmad, Smad 2/3 and N-cadherin, after treatment with inhibitor of the TGF- β pathway. Indicating a possible relationship between this pathway and the action of this miRNA, which still needs to be further investigated

The miR-630 may also play a role as a prognostic marker, since its higher expression has been associated with a worse prognosis for ACT patients that is, with advanced stage of the tumor, worse event-free survival, recurrence and death; and has also been studied in other tumors, such as gastric (CHU; ZHAO; LI; LI *et al.*, 2014), kidney (CHEN; QIN; LEI; YE *et al.*, 2019; ZHAO; CHEN; DUAN; LI *et al.*, 2014), multiple myeloma (BI; CHUNG; HUANG; ZHOU *et al.*, 2015), hepatocellular (ZHANG; LI; ZENG; ZHANG *et al.*, 2015), ovarian (ZHANG; ZHANG; LU; WANG *et al.*, 2017; ZOU; GAO; WANG; WANG *et al.*, 2015) and bladder (WANG; ZHANG; YANG; SONG *et al.*, 2016). However, this miRNA has never been evaluated in adrenocortical tumors, neither adult nor pediatric. This study, therefore, is the first to assess the behavior of miR-630 in these tumors.

Increasing the expression of miR-630 was also able to reduce cell viability as early as 24 hours, as well as reducing the ability of these cells to form colonies. Besides, the increased expression of miR-630 increased the expression of TGFBR1 and Smad3, Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin proteins. The same effects observed with the silencing of miR-483-3p, indicating that despite being different miRNAs, they can act in the same cellular processes, contributing to the tumor progression of ACT, when deregulated. Studies have analyzed the increased expression of miR-630 on other tumors types: lung (SONG; HONG; LIU; LIN *et al.*, 2015), esophageal squamous cell carcinoma (JIN; YI; GAO; HAN *et al.*, 2016), osteosarcoma (LI; YAN, 2019), thyroid cancer (PAN; HE; YANG; JIA *et al.*, 2019); and present results similar to ours.

When combining the upregulation of miR-630 with TGF- β inhibition, we observed a decrease in cell viability and a lower capacity for colony formation; which leads us to the

hypothesis that, if patients are stratified, those with greater expression of miR-630, could present an improvement in prognosis, if they are treated with an inhibitor of the TGF- β pathway. However, they are initial investigations, requiring further studies to complete these findings. Comparing the results obtained from both miRNAs modulations, the increased miR-630 expression seems to respond better to treatment with SB431542, than the silencing of miR-483-3p. Also, the increasing of miR-630 expression together with the TGF- β pathway inhibition promotes a decreasing on Smad 2/3, N-cadherin and Vimentin. Once again indicating a satisfactory effect of this combination.

Here, we show that there is a relationship between the role of miR-483-3p and miR-630 in the TGF- β pathway and the EMT process. The TGF- β pathway regulates many physiological processes ranging from embryonic development and tissue morphogenesis, cell differentiation and survival, as well as cellular and organ homeostasis. It is also responsible for inhibiting the epithelial, endothelial and hematopoietic cell proliferation (TIAN; NEIL; SCHIEMANN, 2011; WENDT; TIAN; SCHIEMANN, 2012). Besides, since cancer is a multifactorial disease and several studies demonstrate the deregulated expression of miRNAs in tumors, further studies focusing on the behavior of these molecules, in tumors, are of great importance to understand important biological processes that contribute to the deregulation of signaling pathways that refer to tumor progression.

Many barriers still need to be overcome; however, our study reinforces that miRNAs are important prognostic biomarkers, which can interfere with treatment response, tumor aggressiveness and patient survival. Here we show some evidence that miR-483-3p and miR-630 influence the progression of TACs, as well as a possible association with the TGF- β and TEM pathways. From this, further investigations are needed to define and accurately understand the role of these miRNAs in TACs so that this understanding helps in the development of new strategies for more efficient therapies for the treatment of this disease.

CONCLUSION

These data suggest that miR-483-3p and miR-630 are prognostic biomarkers for pediatric patients with ACT, interfering with the expression of genes involved in the TGF- β pathway. However, further functional studies are needed to better understand the role of these miRNAs in the biology of this tumor.

BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- ABIVEN, G.; COSTE, J.; GROUSSIN, L.; ANRACT, P. *et al.* Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. **J Clin Endocrinol Metab**, 91, n. 7, p. 2650-2655, Jul 2006.
- ABUE, M.; YOKOYAMA, M.; SHIBUYA, R.; TAMAI, K. *et al.* Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. **Int J Oncol**, 46, n. 2, p. 539-547, Feb 2015.
- ACHATZ, M. I.; ZAMBETTI, G. P. The Inherited p53 Mutation in the Brazilian Population. **Cold Spring Harb Perspect Med**, 6, n. 12, Dec 2016.
- ACUNZO, M.; ROMANO, G.; WERNICKE, D.; CROCE, C. M. MicroRNA and cancer--a brief overview. **Adv Biol Regul**, 57, p. 1-9, Jan 2015.
- ADAM, P.; HAHNER, S.; HARTMANN, M.; HEINRICH, B. *et al.* Epidermal growth factor receptor in adrenocortical tumors: analysis of gene sequence, protein expression and correlation with clinical outcome. **Mod Pathol**, 23, n. 12, p. 1596-1604, Dec 2010.
- AGOSTA, C.; LAUGIER, J.; GUYON, L.; DENIS, J. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. **Int J Cancer**, 143, n. 4, p. 944-957, 08 2018.
- ALLES, J.; FEHLMANN, T.; FISCHER, U.; BACKES, C. *et al.* An estimate of the total number of true human miRNAs. **Nucleic Acids Res**, 47, n. 7, p. 3353-3364, 04 2019.
- ALLOLIO, B.; FASSNACHT, M. Clinical review: Adrenocortical carcinoma: clinical update. **J Clin Endocrinol Metab**, 91, n. 6, p. 2027-2037, Jun 2006.
- ALMEIDA, M. Q.; FRAGOSO, M. C.; LOTFI, C. F.; SANTOS, M. G. *et al.* Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 93, n. 9, p. 3524-3531, Sep 2008.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, 431, n. 7006, p. 350-355, Sep 2004.
- ASSIÉ, G.; LETOUZÉ, E.; FASSNACHT, M.; JOUINOT, A. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nat Genet**, 46, n. 6, p. 607-612, Jun 2014.
- ASSUMPÇÃO, J. G.; SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; RIBEIRO, R. C. *et al.* Association of the germline TP53 R337H mutation with breast cancer in southern Brazil. **BMC Cancer**, 8, p. 357, Dec 2008.
- AUBERT, S.; WACRENIER, A.; LEROY, X.; DEVOS, P. *et al.* Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, 26, n. 12, p. 1612-1619, Dec 2002.

- AYALA-RAMIREZ, M.; JASIM, S.; FENG, L.; EJAZ, S. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. **Eur J Endocrinol**, 169, n. 6, p. 891-899, Dec 2013.
- BAE, G. Y.; HONG, S. K.; PARK, J. R.; KWON, O. S. *et al.* Chronic TGF β stimulation promotes the metastatic potential of lung cancer cells by Snail protein stabilization through integrin β 3-Akt-GSK3 β signaling. **Oncotarget**, 7, n. 18, p. 25366-25376, May 2016.
- BERGADÁ, I.; VENARA, M.; MAGLIO, S.; CIACCIO, M. *et al.* Functional adrenal cortical tumors in pediatric patients: a clinicopathologic and immunohistochemical study of a long term follow-up series. **Cancer**, 77, n. 4, p. 771-777, Feb 1996.
- BERRUTI, A.; BAUDIN, E.; GELDERBLUM, H.; HAAK, H. R. *et al.* Adrenal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Ann Oncol**, 23 Suppl 7, p. vii131-138, Oct 2012.
- BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; PIA, A.; ANGELI, A. *et al.* Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. **Cancer**, 83, n. 10, p. 2194-2200, Nov 1998.
- BERRUTI, A.; TERZOLO, M.; SPERONE, P.; PIA, A. *et al.* Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocr Relat Cancer**, 12, n. 3, p. 657-666, Sep 2005.
- BERRUTI, A. E. A. Long-Term Outcomes of Adjuvant Mitotane Therapy in Patients With Radically Resected Adrenocortical Carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 102, n. 4, p. 1358-1365, Apr 2017.
- BI, C.; CHUNG, T. H.; HUANG, G.; ZHOU, J. *et al.* Genome-wide pharmacologic unmasking identifies tumor suppressive microRNAs in multiple myeloma. **Oncotarget**, 6, n. 28, p. 26508-26518, Sep 2015.
- BLAHNA, M. T.; HATA, A. Smad-mediated regulation of microRNA biosynthesis. **FEBS Lett**, 586, n. 14, p. 1906-1912, Jul 2012.
- BLAHNA, M. T.; HATA, A. Regulation of miRNA biogenesis as an integrated component of growth factor signaling. **Curr Opin Cell Biol**, 25, n. 2, p. 233-240, Apr 2013.
- BORGES, K. S.; MORENO, D. A.; MARTINELLI, C. E.; ANTONINI, S. R. *et al.* Spindle assembly checkpoint gene expression in childhood adrenocortical tumors (ACT): Overexpression of Aurora kinases A and B is associated with a poor prognosis. **Pediatr Blood Cancer**, 60, n. 11, p. 1809-1816, Nov 2013.
- BOULLE, N.; LOGIÉ, A.; GICQUEL, C.; PERIN, L. *et al.* Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 83, n. 5, p. 1713-1720, May 1998.

BRACKEN, C. P.; LI, X.; WRIGHT, J. A.; LAWRENCE, D. M. *et al.* Genome-wide identification of miR-200 targets reveals a regulatory network controlling cell invasion. **EMBO J**, 33, n. 18, p. 2040-2056, Sep 2014.

CALIN, G. A.; DUMITRU, C. D.; SHIMIZU, M.; BICHI, R. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 99, n. 24, p. 15524-15529, Nov 2002.

CALIN, G. A.; SEVIGNANI, C.; DUMITRU, C. D.; HYSLOP, T. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 101, n. 9, p. 2999-3004, Mar 2004.

CAO, M. X.; JIANG, Y. P.; TANG, Y. L.; LIANG, X. H. The crosstalk between lncRNA and microRNA in cancer metastasis: orchestrating the epithelial-mesenchymal plasticity. **Oncotarget**, 8, n. 7, p. 12472-12483, Feb 2017.

CARAMUTA, S.; LEE, L.; OZATA, D. M.; AKÇAKAYA, P. *et al.* Clinical and functional impact of TARBP2 over-expression in adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, 20, n. 4, p. 551-564, Aug 2013.

CHABRE, O.; LIBÉ, R.; ASSIE, G.; BARREAU, O. *et al.* Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. **Endocr Relat Cancer**, 20, n. 4, p. 579-594, Aug 2013.

CHE, G.; GAO, H.; TIAN, J.; HU, Q. *et al.* MicroRNA-483-3p Promotes Proliferation, Migration, and Invasion and Induces Chemoresistance of Wilms' Tumor Cells. **Pediatr Dev Pathol**, p. 1093526619873491, Sep 2019.

CHEN, L.; QIN, Z.; LEI, J.; YE, S. *et al.* Upregulation of miR-489-3p and miR-630 inhibits oxaliplatin uptake in renal cell carcinoma by targeting OCT2. **Acta Pharm Sin B**, 9, n. 5, p. 1008-1020, Sep 2019.

CHEN, W. X.; ZHANG, Z. G.; DING, Z. Y.; LIANG, H. F. *et al.* MicroRNA-630 suppresses tumor metastasis through the TGF- β - miR-630-Slug signaling pathway and correlates inversely with poor prognosis in hepatocellular carcinoma. **Oncotarget**, 7, n. 16, p. 22674-22686, Apr 2016.

CHERRADI, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 6, p. 195, 2015.

CHU, D.; ZHAO, Z.; LI, Y.; LI, J. *et al.* Increased microRNA-630 expression in gastric cancer is associated with poor overall survival. **PLoS One**, 9, n. 3, p. e90526, 2014.

CHU, D.; ZHENG, J.; LI, J.; LI, Y. *et al.* MicroRNA-630 is a prognostic marker for patients with colorectal cancer. **Tumour Biol**, 35, n. 10, p. 9787-9792, Oct 2014.

CHUDLER, R. M.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. **Urol Clin North Am**, 16, n. 3, p. 469-479, Aug 1989.

CIFTCI, A. O.; SENOCAK, M. E.; TANYEL, F. C.; BÜYÜKPAMUKÇU, N. Adrenocortical tumors in children. **J Pediatr Surg**, 36, n. 4, p. 549-554, Apr 2001.

CORCORAN, C.; RANI, S.; BRESLIN, S.; GOGARTY, M. *et al.* miR-630 targets IGF1R to regulate response to HER-targeting drugs and overall cancer cell progression in HER2 over-expressing breast cancer. **Mol Cancer**, 13, p. 71, Mar 2014.

COSTA, T. E. J.; GERBER, V. K. Q.; IBANÑEZ, H. C.; MELANDA, V. S. *et al.* Penetrance of the. **Cancers (Basel)**, 11, n. 11, Nov 2019.

COULTER, C. L. Functional biology of the primate fetal adrenal gland: advances in technology provide new insight. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, 31, n. 8, p. 475-484, Aug 2004.

CUI, H.; LIU, Y.; JIANG, J.; YANG, Z. *et al.* IGF2-derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. **Oncotarget**, 7, n. 30, p. 48456-48466, Jul 2016.

CUSTODIO, G.; TAQUES, G. R.; FIGUEIREDO, B. C.; GUGELMIN, E. S. *et al.* Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil. **PLoS One**, 6, n. 3, p. e18015, Mar 2011.

CUSTÓDIO, G.; PARISE, G. A.; KIESEL FILHO, N.; KOMECHEN, H. *et al.* Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **J Clin Oncol**, 31, n. 20, p. 2619-2626, Jul 2013.

DATTO, M. B.; YU, Y.; WANG, X. F. Functional analysis of the transforming growth factor beta responsive elements in the WAF1/Cip1/p21 promoter. **J Biol Chem**, 270, n. 48, p. 28623-28628, Dec 1995.

DAVIS, B. N.; HILYARD, A. C.; LAGNA, G.; HATA, A. SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. **Nature**, 454, n. 7200, p. 56-61, Jul 2008.

DAVIS, B. N.; HILYARD, A. C.; NGUYEN, P. H.; LAGNA, G. *et al.* Smad proteins bind a conserved RNA sequence to promote microRNA maturation by Drosha. **Mol Cell**, 39, n. 3, p. 373-384, Aug 2010.

DE FRAIPONT, F.; EL ATIFI, M.; CHERRADI, N.; LE MOIGNE, G. *et al.* Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. **J Clin Endocrinol Metab**, 90, n. 3, p. 1819-1829, Mar 2005.

DEHNER, L. P. Pediatric adrenocortical neoplasms: on the road to some clarity. **Am J Surg Pathol**, 27, n. 7, p. 1005-1007, Jul 2003.

DEREBECKA-HOLYSZ, N.; LEHMANN, T. P.; HOLYSZ, M.; TRZECIAK, W. H. TGF-beta inhibits CYP17 transcription in H295R cells acting via activin receptor-like kinase 5. **Endocr Res**, 34, n. 3, p. 68-79, 2009.

DERYNCK, R.; AKHURST, R. J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat Genet**, 29, n. 2, p. 117-129, Oct 2001.

DOGHMAN, M.; EL WAKIL, A.; CARDINAUD, B.; THOMAS, E. *et al.* Regulation of insulin-like growth factor-mammalian target of rapamycin signaling by microRNA in childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 70, n. 11, p. 4666-4675, Jun 2010.

DUREGON, E.; RAPA, I.; VOTTA, A.; GIORCELLI, J. *et al.* MicroRNA expression patterns in adrenocortical carcinoma variants and clinical pathologic correlations. **Hum Pathol**, 45, n. 8, p. 1555-1562, Aug 2014.

DWEEP, H.; GRETZ, N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. **Nat Methods**, 12, n. 8, p. 697, Aug 2015.

DWEEP, H.; STICHT, C.; GRETZ, N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. **Curr Genomics**, 14, n. 2, p. 127-136, Apr 2013.

DWEEP, H.; STICHT, C.; PANDEY, P.; GRETZ, N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. **J Biomed Inform**, 44, n. 5, p. 839-847, Oct 2011.

EBERT, M. S.; SHARP, P. A. MicroRNA sponges: progress and possibilities. **RNA**, 16, n. 11, p. 2043-2050, Nov 2010.

ELSE, T.; KIM, A. C.; SABOLCH, A.; RAYMOND, V. M. *et al.* Adrenocortical carcinoma. **Endocr Rev**, 35, n. 2, p. 282-326, Apr 2014.

EOH, K. J.; LEE, S. H.; KIM, H. J.; LEE, J. Y. *et al.* MicroRNA-630 inhibitor sensitizes chemoresistant ovarian cancer to chemotherapy by enhancing apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, 497, n. 2, p. 513-520, 03 2018.

FASSNACHT, M.; ALLOLIO, B. Clinical management of adrenocortical carcinoma. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 23, n. 2, p. 273-289, Apr 2009.

FASSNACHT, M.; DEKKERS, O. M.; ELSE, T.; BAUDIN, E. *et al.* European Society of Endocrinology Clinical Practice Guidelines on the management of adrenocortical carcinoma in adults, in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. **Eur J Endocrinol**, 179, n. 4, p. G1-G46, 10 2018.

FASSNACHT, M.; JOHANSEN, S.; QUINKLER, M.; BUCKSKY, P. *et al.* Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: proposal for a Revised TNM Classification. **Cancer**, 115, n. 2, p. 243-250, Jan 2009.

FASSNACHT, M.; LIBÉ, R.; KROISS, M.; ALLOLIO, B. Adrenocortical carcinoma: a clinician's update. **Nat Rev Endocrinol**, 7, n. 6, p. 323-335, Jun 2011.

FASSNACHT, M.; TERZOLO, M.; ALLOLIO, B.; BAUDIN, E. *et al.* Combination chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma. **N Engl J Med**, 366, n. 23, p. 2189-2197, Jun 2012.

FEDATTO, P. F. **Papel dos microRNAs nos tumores adrenocorticais pediátricos**. 2014. 149 f. - Departamento de Puericultura e Pediatria, Universidade de São Paulo.

FEIGE, J. J.; VILGRAIN, I.; BRAND, C.; BAILLY, S. *et al.* Fine tuning of adrenocortical functions by locally produced growth factors. **J Endocrinol**, 158, n. 1, p. 7-19, Jul 1998.

FEINMESSER, M.; BENBASSAT, C.; MEIRI, E.; BENJAMIN, H. *et al.* Specific MicroRNAs Differentiate Adrenocortical Adenomas from Carcinomas and Correlate With Weiss Histopathologic System. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, 23, n. 7, p. 522-531, Aug 2015.

FENG, H.; JIA, X. M.; GAO, N. N.; TANG, H. *et al.* Overexpressed VEPH1 inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of human cutaneous melanoma cells through inactivating the TGF- β signaling pathway. **Cell Cycle**, 18, n. 21, p. 2860-2875, Nov 2019.

FENG, J.; WANG, X.; ZHU, W.; CHEN, S. *et al.* MicroRNA-630 Suppresses Epithelial-to-Mesenchymal Transition by Regulating FoxM1 in Gastric Cancer Cells. **Biochemistry (Mosc)**, 82, n. 6, p. 707-714, Jun 2017.

FENG, X. H.; LIANG, Y. Y.; LIANG, M.; ZHAI, W. *et al.* Direct interaction of c-Myc with Smad2 and Smad3 to inhibit TGF-beta-mediated induction of the CDK inhibitor p15(Ink4B). **Mol Cell**, 9, n. 1, p. 133-143, Jan 2002.

FIGUEIREDO, B. C.; CAVALLI, L. R.; PIANOVSKI, M. A.; LALLI, E. *et al.* Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 90, n. 2, p. 615-619, Feb 2005.

FIGUEIREDO, B. C.; SANDRINI, R.; ZAMBETTI, G. P.; PEREIRA, R. M. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation. **J Med Genet**, 43, n. 1, p. 91-96, Jan 2006.

FIGUEIREDO, B. C.; STRATAKIS, C. A.; SANDRINI, R.; DELACERDA, L. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, 84, n. 3, p. 1116-1121, Mar 1999.

FIORENTINI, C.; GRISANTI, S.; COSENTINI, D.; ABATE, A. *et al.* Molecular Drivers of Potential Immunotherapy Failure in Adrenocortical Carcinoma. **J Oncol**, 2019, p. 6072863, 2019.

FRIEDMAN, R. C.; FARH, K. K.; BURGE, C. B.; BARTEL, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. **Genome Res**, 19, n. 1, p. 92-105, Jan 2009.

FU, H.; TIE, Y.; XU, C.; ZHANG, Z. *et al.* Identification of human fetal liver miRNAs by a novel method. **FEBS Lett**, 579, n. 17, p. 3849-3854, Jul 2005.

GARRITANO, S.; GEMIGNANI, F.; PALMERO, E. I.; OLIVIER, M. *et al.* Detailed haplotype analysis at the TP53 locus in p.R337H mutation carriers in the population of Southern Brazil: evidence for a founder effect. **Hum Mutat**, 31, n. 2, p. 143-150, Feb 2010.

GATTA-CHERIFI, B.; CHABRE, O.; MURAT, A.; NICCOLI, P. *et al.* Adrenal involvement in MEN1. Analysis of 715 cases from the Groupe d'etude des Tumeurs Endocrines database. **Eur J Endocrinol**, 166, n. 2, p. 269-279, Feb 2012.

GAUJOUX, S.; GRABAR, S.; FASSNACHT, M.; RAGAZZON, B. *et al.* β -catenin activation is associated with specific clinical and pathologic characteristics and a poor outcome in adrenocortical carcinoma. **Clin Cancer Res**, 17, n. 2, p. 328-336, Jan 2011.

GAZDAR, A. F.; OIE, H. K.; SHACKLETON, C. H.; CHEN, T. R. *et al.* Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Res**, 50, n. 17, p. 5488-5496, Sep 1990.

GEBERT, L. F. R.; MACRAE, I. J. Regulation of microRNA function in animals. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 20, n. 1, p. 21-37, 01 2019.

GIACOMAZZI, J.; KOEHLER-SANTOS, P.; PALMERO, E. I.; GRAUDENZ, M. S. *et al.* A TP53 founder mutation, p.R337H, is associated with phyllodes breast tumors in Brazil. **Virchows Arch**, 463, n. 1, p. 17-22, Jul 2013.

GIACOMAZZI, J.; SELISTRE, S. G.; ROSSI, C.; ALEMAR, B. *et al.* Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndrome among children diagnosed with pediatric cancer in Southern Brazil. **Cancer**, 119, n. 24, p. 4341-4349, Dec 2013.

GICQUEL, C.; BERTAGNA, X.; GASTON, V.; COSTE, J. *et al.* Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 61, n. 18, p. 6762-6767, Sep 2001.

GICQUEL, C.; RAFFIN-SANSON, M. L.; GASTON, V.; BERTAGNA, X. *et al.* Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 8, p. 2559-2565, Aug 1997.

- GIORDANO, T. J.; THOMAS, D. G.; KUICK, R.; LIZYNESS, M. *et al.* Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol**, 162, n. 2, p. 521-531, Feb 2003.
- GLOVER, A. R.; ZHAO, J. T.; GILL, A. J.; WEISS, J. *et al.* MicroRNA-7 as a tumor suppressor and novel therapeutic for adrenocortical carcinoma. **Oncotarget**, 6, n. 34, p. 36675-36688, Nov 2015.
- GONG, W.; SUN, B.; SUN, H.; ZHAO, X. *et al.* Nodal signaling activates the Smad2/3 pathway to regulate stem cell-like properties in breast cancer cells. **Am J Cancer Res**, 7, n. 3, p. 503-517, 2017.
- GONG, X. F.; YU, A. L.; TANG, J.; WANG, C. L. *et al.* MicroRNA-630 inhibits breast cancer progression by directly targeting BMI1. **Exp Cell Res**, 362, n. 2, p. 378-385, 01 2018.
- GREGORY, P. A.; BERT, A. G.; PATERSON, E. L.; BARRY, S. C. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. **Nat Cell Biol**, 10, n. 5, p. 593-601, May 2008.
- GU, S.; FENG, X. H. TGF- β signaling in cancer. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 50, n. 10, p. 941-949, Oct 2018.
- GUNDGURTHI, A.; KHARB, S.; DUTTA, M. K.; GARG, M. K. *et al.* Childhood adrenocortical carcinoma: Case report and review. **Indian J Endocrinol Metab**, 16, n. 3, p. 431-435, May 2012.
- GUPTA, N.; RIVERA, M.; NOVOTNY, P.; RODRIGUEZ, V. *et al.* Adrenocortical Carcinoma in Children: A Clinicopathological Analysis of 41 Patients at the Mayo Clinic from 1950 to 2017. **Horm Res Paediatr**, 90, n. 1, p. 8-18, 2018.
- HA, M.; KIM, V. N. Regulation of microRNA biogenesis. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 15, n. 8, p. 509-524, Aug 2014.
- HAHN, S. A.; SCHUTTE, M.; HOQUE, A. T.; MOSKALUK, C. A. *et al.* DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. **Science**, 271, n. 5247, p. 350-353, Jan 1996.
- HAN, J.; LEE, Y.; YEOM, K. H.; KIM, Y. K. *et al.* The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. **Genes Dev**, 18, n. 24, p. 3016-3027, Dec 2004.
- HANNON, G. J.; BEACH, D. p15INK4B is a potential effector of TGF-beta-induced cell cycle arrest. **Nature**, 371, n. 6494, p. 257-261, Sep 1994.
- HAO, J.; ZHANG, S.; ZHOU, Y.; HU, X. *et al.* MicroRNA 483-3p suppresses the expression of DPC4/Smad4 in pancreatic cancer. **FEBS Lett**, 585, n. 1, p. 207-213, Jan 2011.
- HASSAN, N.; ZHAO, J. T.; SIDHU, S. B. The role of microRNAs in the pathophysiology of adrenal tumors. **Mol Cell Endocrinol**, Dec 2016.

HATA, A.; CHEN, Y. G. TGF- β Signaling from Receptors to Smads. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 9, Sep 2016.

HEINE, U.; MUNOZ, E. F.; FLANDERS, K. C.; ELLINGSWORTH, L. R. *et al.* Role of transforming growth factor-beta in the development of the mouse embryo. **J Cell Biol**, 105, n. 6 Pt 2, p. 2861-2876, Dec 1987.

HELDIN, C. H.; MOUSTAKAS, A. Role of Smads in TGF β signaling. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 21-36, Jan 2012.

HISADA, M.; GARBER, J. E.; FUNG, C. Y.; FRAUMENI, J. F. *et al.* Multiple primary cancers in families with Li-Fraumeni syndrome. **J Natl Cancer Inst**, 90, n. 8, p. 606-611, Apr 1998.

HOTTA, M.; BAIRD, A. Differential effects of transforming growth factor type beta on the growth and function of adrenocortical cells in vitro. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 83, n. 20, p. 7795-7799, Oct 1986.

ICARD, P.; GOUDET, P.; CHARPENAY, C.; ANDREASSIAN, B. *et al.* Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. **World J Surg**, 25, n. 7, p. 891-897, Jul 2001.

IKUSHIMA, H.; MIYAZONO, K. TGFbeta signalling: a complex web in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, 10, n. 6, p. 415-424, Jun 2010.

IMLIMTHAN, S.; CORREIA, A.; FIGUEIREDO, P.; LINTINEN, K. *et al.* Systematic in vitro biocompatibility studies of multimodal cellulose nanocrystal and lignin nanoparticles. **J Biomed Mater Res A**, 108, n. 3, p. 770-783, Mar 2020.

INMAN, G. J.; NICOLÁS, F. J.; CALLAHAN, J. F.; HARLING, J. D. *et al.* SB-431542 is a potent and specific inhibitor of transforming growth factor-beta superfamily type I activin receptor-like kinase (ALK) receptors ALK4, ALK5, and ALK7. **Mol Pharmacol**, 62, n. 1, p. 65-74, Jul 2002.

JIN, L.; YI, J.; GAO, Y.; HAN, S. *et al.* MiR-630 inhibits invasion and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. **Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)**, 48, n. 9, p. 810-819, Sep 2016.

JOHNSON, D. H.; GRECO, F. A. Treatment of metastatic adrenal cortical carcinoma with cisplatin and etoposide (VP-16). **Cancer**, 58, n. 10, p. 2198-2202, Nov 1986.

KEMPNÁ, P.; FLÜCK, C. E. Adrenal gland development and defects. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 22, n. 1, p. 77-93, Feb 2008.

KERKHOF, T. M.; VERHOEVEN, R. H.; VAN DER ZWAN, J. M.; DIELEMAN, J. *et al.* Adrenocortical carcinoma: a population-based study on incidence and survival in the Netherlands since 1993. **Eur J Cancer**, 49, n. 11, p. 2579-2586, Jul 2013.

KLEIN, J. D.; TURNER, C. G.; GRAY, F. L.; YU, D. C. *et al.* Adrenal cortical tumors in children: factors associated with poor outcome. **J Pediatr Surg**, 46, n. 6, p. 1201-1207, Jun 2011.

KOPERSKI, Ł.; KOTLAREK, M.; ŚWIERNIAK, M.; KOLANOWSKA, M. *et al.* Next-generation sequencing reveals microRNA markers of adrenocortical tumors malignancy. **Oncotarget**, 8, n. 30, p. 49191-49200, Jul 2017.

KOSCHKER, A. C.; FASSNACHT, M.; HAHNER, S.; WEISMANN, D. *et al.* Adrenocortical carcinoma -- improving patient care by establishing new structures. **Exp Clin Endocrinol Diabetes**, 114, n. 2, p. 45-51, Feb 2006.

KOZOMARA, A.; BIRGAOANU, M.; GRIFFITHS-JONES, S. miRBase: from microRNA sequences to function. **Nucleic Acids Res**, 47, n. D1, p. D155-D162, Jan 2019.

KWOK, G. T. Y.; ZHAO, J. T.; GLOVER, A. R.; GILL, A. J. *et al.* microRNA-431 as a Chemosensitizer and Potentiator of Drug Activity in Adrenocortical Carcinoma. **Oncologist**, 24, n. 6, p. e241-e250, 06 2019.

LABELLE, M.; BEGUM, S.; HYNES, R. O. Direct signaling between platelets and cancer cells induces an epithelial-mesenchymal-like transition and promotes metastasis. **Cancer Cell**, 20, n. 5, p. 576-590, Nov 2011.

LAN, H.; LU, H.; WANG, X.; JIN, H. MicroRNAs as potential biomarkers in cancer: opportunities and challenges. **Biomed Res Int**, 2015, p. 125094, 2015.

LEAL, L. F.; MERMEJO, L. M.; RAMALHO, L. Z.; MARTINELLI, C. E. *et al.* Wnt/beta-catenin pathway deregulation in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 96, n. 10, p. 3106-3114, Oct 2011.

LEBOULLEUX, S.; DEANDREIS, D.; AL GHUZLAN, A.; AUPÉRIN, A. *et al.* Adrenocortical carcinoma: is the surgical approach a risk factor of peritoneal carcinomatosis? **Eur J Endocrinol**, 162, n. 6, p. 1147-1153, Jun 2010.

LEITE, F. A.; LIRA, R. C.; FEDATTO, P. F.; ANTONINI, S. R. *et al.* Low expression of HLA-DRA, HLA-DPA1, and HLA-DPB1 is associated with poor prognosis in pediatric adrenocortical tumors (ACT). **Pediatr Blood Cancer**, 61, n. 11, p. 1940-1948, Nov 2014.

LI, D.; TIAN, B.; JIN, X. miR-630 Inhibits Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) by Regulating the Wnt/ β -Catenin Pathway in Gastric Cancer Cells. **Oncol Res**, 27, n. 1, p. 9-17, Dec 2018.

LI, G. W.; YAN, X. Lower miR-630 expression predicts poor prognosis of osteosarcoma and promotes cell proliferation, migration and invasion by targeting PSMC2. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, n. 5, p. 1915-1925, Mar 2019.

- LI, W.; ZONG, S.; SHI, Q.; LI, H. *et al.* Hypoxia-induced vasculogenic mimicry formation in human colorectal cancer cells: Involvement of HIF-1 α , Claudin-4, and E-cadherin and Vimentin. **Sci Rep**, 6, p. 37534, 11 2016.
- LIANG, C. C.; PARK, A. Y.; GUAN, J. L. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nat Protoc**, 2, n. 2, p. 329-333, 2007.
- LIBÈ, R.; GROUSSIN, L.; TISSIER, F.; ELIE, C. *et al.* Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. **Clin Cancer Res**, 13, n. 3, p. 844-850, Feb 2007.
- LIMA, L. E. O.; LERARIO, A. M.; ALENCAR, G. A.; BRITO, L. P. *et al.* Clinical and molecular aspects of a pediatric metachronous adrenocortical tumor. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 55, n. 1, p. 72-77, Feb 2011.
- LIN, S.; GREGORY, R. I. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. **Nat Rev Cancer**, 15, n. 6, p. 321-333, Jun 2015.
- LIU, J.; CARMELL, M. A.; RIVAS, F. V.; MARSDEN, C. G. *et al.* Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, 305, n. 5689, p. 1437-1441, Sep 2004.
- LIU, M.; ROTH, A.; YU, M.; MORRIS, R. *et al.* The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. **Genes Dev**, 27, n. 23, p. 2543-2548, Dec 2013.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, 25, n. 4, p. 402-408, Dec 2001.
- LOREA, C. F.; MORENO, D. A.; BORGES, K. S.; MARTINELLI, C. E. *et al.* Expression profile of apoptosis-related genes in childhood adrenocortical tumors: low level of expression of BCL2 and TNF genes suggests a poor prognosis. **Eur J Endocrinol**, 167, n. 2, p. 199-208, Aug 2012.
- LU, Y.; WANG, L.; LI, H.; LI, Y. *et al.* SMAD2 Inactivation Inhibits CLDN6 Methylation to Suppress Migration and Invasion of Breast Cancer Cells. **Int J Mol Sci**, 18, n. 9, Aug 2017.
- LUO, X.; IKEDA, Y.; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, 77, n. 4, p. 481-490, May 1994.
- MA, J.; HONG, L.; XU, G.; HAO, J. *et al.* miR-483-3p plays an oncogenic role in esophageal squamous cell carcinoma by targeting tumor suppressor EI24. **Cell Biol Int**, 40, n. 4, p. 448-455, Apr 2016.
- MACFARLANE, L. A.; MURPHY, P. R. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. **Curr Genomics**, 11, n. 7, p. 537-561, Nov 2010.

MANSMANN, G.; LAU, J.; BALK, E.; ROTHBERG, M. *et al.* The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. **Endocr Rev**, 25, n. 2, p. 309-340, Apr 2004.

MARKOWITZ, S.; WANG, J.; MYEROFF, L.; PARSONS, R. *et al.* Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. **Science**, 268, n. 5215, p. 1336-1338, Jun 1995.

MASSAGUÉ, J. The TGF-beta family of growth and differentiation factors. **Cell**, 49, n. 4, p. 437-438, May 1987.

MASSAGUÉ, J. The transforming growth factor-beta family. **Annu Rev Cell Biol**, 6, p. 597-641, 1990.

MASSAGUÉ, J. TGFbeta in Cancer. **Cell**, 134, n. 2, p. 215-230, Jul 2008.

MASSAGUÉ, J. TGFβ signalling in context. **Nat Rev Mol Cell Biol**, 13, n. 10, p. 616-630, Oct 2012.

MASSAGUÉ, J.; KELLY, B.; MOTTOLA, C. Stimulation by insulin-like growth factors is required for cellular transformation by type beta transforming growth factor. **J Biol Chem**, 260, n. 8, p. 4551-4554, Apr 1985.

MASTELLARO, M. J.; RIBEIRO, R. C.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; SEIDINGER, A. L. *et al.* Adrenocortical tumors associated with the TP53 p.R337H germline mutation can be identified during child-care consultations. **J Pediatr (Rio J)**, 94, n. 4, p. 432-439, 2018 Jul - Aug 2018.

MATSUYAMA, S.; IWADATE, M.; KONDO, M.; SAITOH, M. *et al.* SB-431542 and Gleevec inhibit transforming growth factor-beta-induced proliferation of human osteosarcoma cells. **Cancer Res**, 63, n. 22, p. 7791-7798, Nov 2003.

MCATEER, J. P.; HUACO, J. A.; GOW, K. W. Predictors of survival in pediatric adrenocortical carcinoma: a Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) program study. **J Pediatr Surg**, 48, n. 5, p. 1025-1031, May 2013.

MENBARI, M. N.; RAHIMI, K.; AHMADI, A.; MOHAMMADI-YEGANEH, S. *et al.* miR-483-3p suppresses the proliferation and progression of human triple negative breast cancer cells by targeting the HDAC8 oncogene. **J Cell Physiol**, 235, n. 3, p. 2631-2642, Mar 2020.

MESIANO, S.; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr Rev**, 18, n. 3, p. 378-403, Jun 1997.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E. C. *et al.* Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **J Clin Oncol**, 22, n. 5, p. 838-845, Mar 2004.

- MILLER, B. S.; AMMORI, J. B.; GAUGER, P. G.; BROOME, J. T. *et al.* Laparoscopic resection is inappropriate in patients with known or suspected adrenocortical carcinoma. **World J Surg**, 34, n. 6, p. 1380-1385, Jun 2010.
- MITCHELL, P. S.; PARKIN, R. K.; KROH, E. M.; FRITZ, B. R. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 105, n. 30, p. 10513-10518, Jul 2008.
- MIYAZONO, K. TGF-beta signaling by Smad proteins. **Cytokine Growth Factor Rev**, 11, n. 1-2, p. 15-22, 2000 Mar-Jun 2000.
- MIYAZONO, K.; TEN DIJKE, P.; HELDIN, C. H. TGF-beta signaling by Smad proteins. **Adv Immunol**, 75, p. 115-157, 2000.
- MOLLAELI, H.; SAFARALIZADEH, R.; ROSTAMI, Z. MicroRNA replacement therapy in cancer. **J Cell Physiol**, 234, n. 8, p. 12369-12384, Aug 2019.
- MORIKAWA, M.; DERYNCK, R.; MIYAZONO, K. TGF- β and the TGF- β Family: Context-Dependent Roles in Cell and Tissue Physiology. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 8, n. 5, May 2016.
- MORRISON, C. D.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The relevance of the TGF- β Paradox to EMT-MET programs. **Cancer Lett**, 341, n. 1, p. 30-40, Nov 2013.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. The regulation of TGFbeta signal transduction. **Development**, 136, n. 22, p. 3699-3714, Nov 2009.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, C. H. Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. **J Clin Med**, 5, n. 7, Jun 2016.
- MOUSTAKAS, A.; HELDIN, P. TGF β and matrix-regulated epithelial to mesenchymal transition. **Biochim Biophys Acta**, 1840, n. 8, p. 2621-2634, Aug 2014.
- MU, Y.; GUDEY, S. K.; LANDSTRÖM, M. Non-Smad signaling pathways. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 11-20, Jan 2012.
- NAKAMURA, Y.; YAMAZAKI, Y.; FELIZOLA, S. J.; ISE, K. *et al.* Adrenocortical carcinoma: review of the pathologic features, production of adrenal steroids, and molecular pathogenesis. **Endocrinol Metab Clin North Am**, 44, n. 2, p. 399-410, Jun 2015.
- OHGAKI, H.; KLEIHUES, P.; HEITZ, P. U. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. **Int J Cancer**, 54, n. 3, p. 408-410, May 1993.
- OLIVETO, S.; MANCINO, M.; MANFRINI, N.; BIFFO, S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. **World J Biol Chem**, 8, n. 1, p. 45-56, Feb 2017.

PAN, X. M.; HE, X. Y.; YANG, Y. L.; JIA, W. J. *et al.* MiR-630 inhibits papillary thyroid carcinoma cell growth, metastasis, and epithelial-mesenchymal transition by suppressing JAK2/STAT3 signaling pathway. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 23, n. 6, p. 2453-2460, Mar 2019.

PANG, L.; LI, Q.; WEI, C.; ZOU, H. *et al.* TGF- β 1/Smad signaling pathway regulates epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal squamous cell carcinoma: in vitro and clinical analyses of cell lines and nomadic Kazakh patients from northwest Xinjiang, China. **PLoS One**, 9, n. 12, p. e112300, 2014.

PAPOTTI, M.; DUREGON, E.; VOLANTE, M.; MCNICOL, A. M. Pathology of the adrenal cortex: a reappraisal of the past 25 years focusing on adrenal cortical tumors. **Endocr Pathol**, 25, n. 1, p. 35-48, Mar 2014.

PAPOTTI, M.; LIBÈ, R.; DUREGON, E.; VOLANTE, M. *et al.* The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. **Horm Cancer**, 2, n. 6, p. 333-340, Dec 2011.

PARAGLIOLA, R. M.; TORINO, F.; PAPI, G.; LOCANTORE, P. *et al.* Role of Mitotane in Adrenocortical Carcinoma - Review and State of the art. **Eur Endocrinol**, 14, n. 2, p. 62-66, Sep 2018.

PARK, N. R.; CHA, J. H.; JANG, J. W.; BAE, S. H. *et al.* Synergistic effects of CD44 and TGF- β 1 through AKT/GSK-3 β / β -catenin signaling during epithelial-mesenchymal transition in liver cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, 477, n. 4, p. 568-574, 09 2016.

PARK, S. M.; GAUR, A. B.; LENGYEL, E.; PETER, M. E. The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. **Genes Dev**, 22, n. 7, p. 894-907, Apr 2008.

PARKER, C. R.; STANKOVIC, A. K.; HARLIN, C.; CARDEN, L. Adrenocorticotropin interferes with transforming growth factor-beta-induced growth inhibition of neocortical cells from the human fetal adrenal gland. **J Clin Endocrinol Metab**, 75, n. 6, p. 1519-1521, Dec 1992.

PARVANI, J. G.; GUJRATI, M. D.; MACK, M. A.; SCHIEMANN, W. P. *et al.* Silencing β 3 Integrin by Targeted ECO/siRNA Nanoparticles Inhibits EMT and Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer. **Cancer Res**, 75, n. 11, p. 2316-2325, Jun 2015.

PASKULIN, D. D.; GIACOMAZZI, J.; ACHATZ, M. I.; COSTA, S. *et al.* Ancestry of the Brazilian TP53 c.1010G>A (p.Arg337His, R337H) Founder Mutation: Clues from Haplotyping of Short Tandem Repeats on Chromosome 17p. **PLoS One**, 10, n. 11, p. e0143262, 2015.

PATTERSON, E. E.; HOLLOWAY, A. K.; WENG, J.; FOJO, T. *et al.* MicroRNA profiling of adrenocortical tumors reveals miR-483 as a marker of malignancy. **Cancer**, 117, n. 8, p. 1630-1639, Apr 2011.

PEIXOTO LIRA, R. C.; FEDATTO, P. F.; MARCO ANTONIO, D. S.; LEAL, L. F. *et al.* IGF2 and IGF1R in pediatric adrenocortical tumors: roles in metastasis and steroidogenesis. **Endocr Relat Cancer**, 23, n. 6, p. 481-493, 06 2016.

PEREIRA, S. S.; MONTEIRO, M. P.; ANTONINI, S. R.; PIGNATELLI, D. Apoptosis regulation in adrenocortical carcinoma. **Endocr Connect**, 8, n. 5, p. R91-R104, May 2019.

PEREIRA, T. C.; CORRÊA, C. A. P. **Introdução ao universo dos non-coding RNAs**. Ribeirão Preto: 2017. 64 p.

PETR, E. J.; ELSE, T. Genetic predisposition to endocrine tumors: Diagnosis, surveillance and challenges in care. **Semin Oncol**, 43, n. 5, p. 582-590, Oct 2016.

PIANOVSKI, M. A.; CAVALLI, L. R.; FIGUEIREDO, B. C.; SANTOS, S. C. *et al.* SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, 42, n. 8, p. 1040-1043, May 2006.

PINTO, E. M.; BILLERBECK, A. E.; VILLARES, M. C.; DOMENICE, S. *et al.* Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 48, n. 5, p. 647-650, Oct 2004.

PINTO, E. M.; CHEN, X.; EASTON, J.; FINKELSTEIN, D. *et al.* Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. **Nat Commun**, 6, p. 6302, Mar 2015.

POLYAK, K.; KATO, J. Y.; SOLOMON, M. J.; SHERR, C. J. *et al.* p27Kip1, a cyclin-Cdk inhibitor, links transforming growth factor-beta and contact inhibition to cell cycle arrest. **Genes Dev**, 8, n. 1, p. 9-22, Jan 1994.

RAINEY, W. E.; BIRD, I. M.; MASON, J. I. The NCI-H295 cell line: a pluripotent model for human adrenocortical studies. **Mol Cell Endocrinol**, 100, n. 1-2, p. 45-50, Apr 1994.

RAINEY, W. E.; SANER, K.; SCHIMMER, B. P. Adrenocortical cell lines. **Mol Cell Endocrinol**, 228, n. 1-2, p. 23-38, Dec 2004.

RAPPOLEE, D. A.; BRENNER, C. A.; SCHULTZ, R.; MARK, D. *et al.* Developmental expression of PDGF, TGF-alpha, and TGF-beta genes in preimplantation mouse embryos. **Science**, 241, n. 4874, p. 1823-1825, Sep 1988.

RAYMOND, V. M.; ELSE, T.; EVERETT, J. N.; LONG, J. M. *et al.* Prevalence of germline TP53 mutations in a prospective series of unselected patients with adrenocortical carcinoma. **J Clin Endocrinol Metab**, 98, n. 1, p. E119-125, Jan 2013.

RAYMOND, V. M.; EVERETT, J. N.; FURTADO, L. V.; GUSTAFSON, S. L. *et al.* Adrenocortical carcinoma is a lynch syndrome-associated cancer. **J Clin Oncol**, 31, n. 24, p. 3012-3018, Aug 2013.

REINCKE, M.; KARL, M.; TRAVIS, W. H.; MASTORAKOS, G. *et al.* p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab**, 78, n. 3, p. 790-794, Mar 1994.

RIBEIRO, R. C.; FIGUEIREDO, B. Childhood adrenocortical tumours. **Eur J Cancer**, 40, n. 8, p. 1117-1126, May 2004.

RIBEIRO, R. C.; MICHALKIEWICZ, E. L.; FIGUEIREDO, B. C.; DELACERDA, L. *et al.* Adrenocortical tumors in children. **Braz J Med Biol Res**, 33, n. 10, p. 1225-1234, Oct 2000.

RIBEIRO, R. C.; PINTO, E. M.; ZAMBETTI, G. P.; RODRIGUEZ-GALINDO, C. The International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry initiative: contributions to clinical, biological, and treatment advances in pediatric adrenocortical tumors. **Mol Cell Endocrinol**, 351, n. 1, p. 37-43, Mar 2012.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI, F.; FIGUEIREDO, B.; ZAMBETTI, G. P. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 98, n. 16, p. 9330-9335, Jul 2001.

RIBEIRO, R. C.; SANDRINI NETO, R. S.; SCHELL, M. J.; LACERDA, L. *et al.* Adrenocortical carcinoma in children: a study of 40 cases. **J Clin Oncol**, 8, n. 1, p. 67-74, Jan 1990.

RIOPEL, L.; BRANCHAUD, C. L.; GOODYER, C. G.; ADKAR, V. *et al.* Growth-inhibitory effect of TGF- β on human fetal adrenal cells in primary monolayer culture. **J Cell Physiol**, 140, n. 2, p. 233-238, Aug 1989.

ROBERTS, A. B.; ANZANO, M. A.; WAKEFIELD, L. M.; ROCHE, N. S. *et al.* Type beta transforming growth factor: a bifunctional regulator of cellular growth. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 82, n. 1, p. 119-123, Jan 1985.

ROBERTS, A. B.; FLANDERS, K. C.; KONDAIAH, P.; THOMPSON, N. L. *et al.* Transforming growth factor beta: biochemistry and roles in embryogenesis, tissue repair and remodeling, and carcinogenesis. **Recent Prog Horm Res**, 44, p. 157-197, 1988.

RODRIGUEZ, H.; HUM, D. W.; STAELS, B.; MILLER, W. L. Transcription of the human genes for cytochrome P450_{scc} and P450_{c17} is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 2, p. 365-371, Feb 1997.

RODRIGUEZ-GALINDO, C.; FIGUEIREDO, B. C.; ZAMBETTI, G. P.; RIBEIRO, R. C. Biology, clinical characteristics, and management of adrenocortical tumors in children. **Pediatr Blood Cancer**, 45, n. 3, p. 265-273, Sep 2005.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nat Rev Drug Discov**, 16, n. 3, p. 203-222, Mar 2017.

SADOVSKY, Y.; CRAWFORD, P. A.; WOODSON, K. G.; POLISH, J. A. *et al.* Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 92, n. 24, p. 10939-10943, Nov 1995.

SAMANDARI, E.; KEMPNA, P.; NUOFFER, J. M.; HOFER, G. *et al.* Human adrenal corticocarcinoma NCI-H295R cells produce more androgens than NCI-H295A cells and differ in 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and 17,20 lyase activities. **J Endocrinol**, 195, n. 3, p. 459-472, Dec 2007.

SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; DELACERDA, L. Childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 82, n. 7, p. 2027-2031, Jul 1997.

SBIERA, S.; SCHMULL, S.; ASSIE, G.; VOELKER, H. U. *et al.* High diagnostic and prognostic value of steroidogenic factor-1 expression in adrenal tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 95, n. 10, p. E161-171, Oct 2010.

SCHIMMER, B. P.; WHITE, P. C. Minireview: steroidogenic factor 1: its roles in differentiation, development, and disease. **Mol Endocrinol**, 24, n. 7, p. 1322-1337, Jul 2010.

SCHMITZ, K. J.; HELWIG, J.; BERTRAM, S.; SHEU, S. Y. *et al.* Differential expression of microRNA-675, microRNA-139-3p and microRNA-335 in benign and malignant adrenocortical tumours. **J Clin Pathol**, 64, n. 6, p. 529-535, Jun 2011.

SEIDINGER, A. L.; MASTELLARO, M. J.; PASCHOAL FORTES, F.; GODOY ASSUMPÇÃO, J. *et al.* Association of the highly prevalent TP53 R337H mutation with pediatric choroid plexus carcinoma and osteosarcoma in southeast Brazil. **Cancer**, 117, n. 10, p. 2228-2235, May 2011.

SEVIGNANI, C.; CALIN, G. A.; SIRACUSA, L. D.; CROCE, C. M. Mammalian microRNAs: a small world for fine-tuning gene expression. **Mamm Genome**, 17, n. 3, p. 189-202, Mar 2006.

SHIOTA, M.; ZARDAN, A.; TAKEUCHI, A.; KUMANO, M. *et al.* Clusterin mediates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and metastasis via Twist1 in prostate cancer cells. **Cancer Res**, 72, n. 20, p. 5261-5272, Oct 2012.

SILJAMÄKI, E.; RAPPU, P.; RIIHILÄ, P.; NISSINEN, L. *et al.* H-Ras activation and fibroblast-induced TGF- β signaling promote laminin-332 accumulation and invasion in cutaneous squamous cell carcinoma. **Matrix Biol**, Oct 2019.

SONG, J. H.; CHAUDHRY, F. S.; MAYO-SMITH, W. W. The incidental adrenal mass on CT: prevalence of adrenal disease in 1,049 consecutive adrenal masses in patients with no known malignancy. **AJR Am J Roentgenol**, 190, n. 5, p. 1163-1168, May 2008.

SONG, Y. F.; HONG, J. F.; LIU, D. L.; LIN, Q. A. *et al.* miR-630 targets LMO3 to regulate cell growth and metastasis in lung cancer. **Am J Transl Res**, 7, n. 7, p. 1271-1279, 2015.

SOON, P. S.; TACON, L. J.; GILL, A. J.; BAMBACH, C. P. *et al.* miR-195 and miR-483-5p Identified as Predictors of Poor Prognosis in Adrenocortical Cancer. **Clin Cancer Res**, 15, n. 24, p. 7684-7692, Dec 2009.

SPENCER, S. J.; MESIANO, S.; LEE, J. Y.; JAFFE, R. B. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrinol Metab**, 84, n. 3, p. 1110-1115, Mar 1999.

SPENCER, S. J.; RABINOVICI, J.; MESIANO, S.; GOLDSMITH, P. C. *et al.* Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. **J Clin Invest**, 90, n. 1, p. 142-149, Jul 1992.

SPERONE, P.; FERRERO, A.; DAFFARA, F.; PRIOLA, A. *et al.* Gemcitabine plus metronomic 5-fluorouracil or capecitabine as a second-/third-line chemotherapy in advanced adrenocortical carcinoma: a multicenter phase II study. **Endocr Relat Cancer**, 17, n. 2, p. 445-453, Jun 2010.

STANKOVIC, A. K.; DION, L. D.; PARKER, C. R. Effects of transforming growth factor-beta on human fetal adrenal steroid production. **Mol Cell Endocrinol**, 99, n. 2, p. 145-151, Mar 1994.

STEWART, P. M.; WALKER, B. R.; HOLDER, G.; O'HALLORAN, D. *et al.* 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in Cushing's syndrome: explaining the mineralocorticoid excess state of the ectopic adrenocorticotropin syndrome. **J Clin Endocrinol Metab**, 80, n. 12, p. 3617-3620, Dec 1995.

SUCHESTON, M. E.; CANNON, M. S. Development of zonular patterns in the human adrenal gland. **J Morphol**, 126, n. 4, p. 477-491, Dec 1968.

SVORONOS, A. A.; ENGELMAN, D. M.; SLACK, F. J. OncomiR or Tumor Suppressor? The Duplicity of MicroRNAs in Cancer. **Cancer Res**, 76, n. 13, p. 3666-3670, 07 2016.

TADJINE, M.; LAMPRON, A.; OUADI, L.; BOURDEAU, I. Frequent mutations of beta-catenin gene in sporadic secreting adrenocortical adenomas. **Clin Endocrinol (Oxf)**, 68, n. 2, p. 264-270, Feb 2008.

TANG, B.; VU, M.; BOOKER, T.; SANTNER, S. J. *et al.* TGF-beta switches from tumor suppressor to prometastatic factor in a model of breast cancer progression. **J Clin Invest**, 112, n. 7, p. 1116-1124, Oct 2003.

TAYLOR, M. A.; LEE, Y. H.; SCHIEMANN, W. P. Role of TGF- β and the tumor microenvironment during mammary tumorigenesis. **Gene Expr**, 15, n. 3, p. 117-132, 2011.

TAYLOR, M. A.; PARVANI, J. G.; SCHIEMANN, W. P. The pathophysiology of epithelial-mesenchymal transition induced by transforming growth factor-beta in normal and malignant mammary epithelial cells. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, 15, n. 2, p. 169-190, Jun 2010.

TERZOLO, M.; BAUDIN, A. E.; ARDITO, A.; KROISS, M. *et al.* Mitotane levels predict the outcome of patients with adrenocortical carcinoma treated adjuvantly following radical resection. **Eur J Endocrinol**, 169, n. 3, p. 263-270, Sep 2013.

TERZOLO, M.; DAFFARA, F.; ARDITO, A.; ZAGGIA, B. *et al.* Management of adrenal cancer: a 2013 update. **J Endocrinol Invest**, 37, n. 3, p. 207-217, Mar 2014.

THAKUR, N.; GUDEY, S. K.; MARCUSSON, A.; FU, J. Y. *et al.* TGF β -induced invasion of prostate cancer cells is promoted by c-Jun-dependent transcriptional activation of Snail1. **Cell Cycle**, 13, n. 15, p. 2400-2414, 2014.

THILLAINADESAN, G.; CHITILIAN, J. M.; ISOVIC, M.; ABLACK, J. N. *et al.* TGF- β -dependent active demethylation and expression of the p15ink4b tumor suppressor are impaired by the ZNF217/CoREST complex. **Mol Cell**, 46, n. 5, p. 636-649, Jun 2012.

THOMPSON, N. L.; FLANDERS, K. C.; SMITH, J. M.; ELLINGSWORTH, L. R. *et al.* Expression of transforming growth factor-beta 1 in specific cells and tissues of adult and neonatal mice. **J Cell Biol**, 108, n. 2, p. 661-669, Feb 1989.

TIAN, M.; NEIL, J. R.; SCHIEMANN, W. P. Transforming growth factor- β and the hallmarks of cancer. **Cell Signal**, 23, n. 6, p. 951-962, Jun 2011.

TISSIER, F.; CAVARD, C.; GROUSSIN, L.; PERLEMOINE, K. *et al.* Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer Res**, 65, n. 17, p. 7622-7627, Sep 2005.

TUCCI, S.; MARTINS, A. C.; SUAID, H. J.; COLOGNA, A. J. *et al.* The impact of tumor stage on prognosis in children with adrenocortical carcinoma. **J Urol**, 174, n. 6, p. 2338-2342, discussion 2342, Dec 2005.

TUCKER, R. F.; SHIPLEY, G. D.; MOSES, H. L.; HOLLEY, R. W. Growth inhibitor from BSC-1 cells closely related to platelet type beta transforming growth factor. **Science**, 226, n. 4675, p. 705-707, Nov 1984.

TÖMBÖL, Z.; SZABÓ, P. M.; MOLNÁR, V.; WIENER, Z. *et al.* Integrative molecular bioinformatics study of human adrenocortical tumors: microRNA, tissue-specific target prediction, and pathway analysis. **Endocr Relat Cancer**, 16, n. 3, p. 895-906, Sep 2009.

VANDER ARK, A.; CAO, J.; LI, X. TGF- β receptors: In and beyond TGF- β signaling. **Cell Signal**, 52, p. 112-120, 12 2018.

VARGHESE, J.; HABRA, M. A. Update on adrenocortical carcinoma management and future directions. **Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes**, 24, n. 3, p. 208-214, Jun 2017.

VATRANO, S.; VOLANTE, M.; DUREGON, E.; GIORCELLI, J. *et al.* Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas. **Mod Pathol**, 31, n. 8, p. 1257-1269, 08 2018.

VERONESE, A.; LUPINI, L.; CONSIGLIO, J.; VISIONE, R. *et al.* Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. **Cancer Res**, 70, n. 8, p. 3140-3149, Apr 2010.

VERVOORT, S. J.; LOURENÇO, A. R.; VAN BOXTEL, R.; COFFER, P. J. SOX4 mediates TGF- β -induced expression of mesenchymal markers during mammary cell epithelial to mesenchymal transition. **PLoS One**, 8, n. 1, p. e53238, 2013.

VOLANTE, M.; BUTTIGLIERO, C.; GRECO, E.; BERRUTI, A. *et al.* Pathological and molecular features of adrenocortical carcinoma: an update. **J Clin Pathol**, 61, n. 7, p. 787-793, Jul 2008.

WAJCHENBERG, B. L.; ALBERGARIA PEREIRA, M. A.; MEDONCA, B. B.; LATRONICO, A. C. *et al.* Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer**, 88, n. 4, p. 711-736, Feb 2000.

WANG, C.; SUN, Y.; WU, H.; YU, S. *et al.* Elevated miR-483-3p expression is an early event and indicates poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma. **Tumour Biol**, 36, n. 12, p. 9447-9456, Dec 2015.

WANG, C.; SUN, Y.; WU, H.; ZHAO, D. *et al.* Distinguishing adrenal cortical carcinomas and adenomas: a study of clinicopathological features and biomarkers. **Histopathology**, 64, n. 4, p. 567-576, Mar 2014.

WANG, D.; LONG, J.; DAI, F.; LIANG, M. *et al.* BCL6 represses Smad signaling in transforming growth factor-beta resistance. **Cancer Res**, 68, n. 3, p. 783-789, Feb 2008.

WANG, J.; CHEN, J.; SEN, S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. **J Cell Physiol**, 231, n. 1, p. 25-30, Jan 2016.

WANG, J.; WANG, Y.; SUN, D.; REN, F. *et al.* CUTL1 induces epithelial-mesenchymal transition in non-small cell lung cancer. **Oncol Rep**, 37, n. 5, p. 3068-3074, May 2017.

WANG, P. Suppression of DACH1 promotes migration and invasion of colorectal cancer via activating TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition. **Biochem Biophys Res Commun**, 460, n. 2, p. 314-319, May 2015.

WANG, T.; RAINEY, W. E. Human adrenocortical carcinoma cell lines. **Mol Cell Endocrinol**, 351, n. 1, p. 58-65, Mar 2012.

WANG, Z. Y.; ZHANG, W.; YANG, J. J.; SONG, D. K. *et al.* Expression of miRNA-630 in bladder urothelial carcinoma and its clinical significance. **J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci**, 36, n. 5, p. 705-709, Oct 2016.

WASSERMAN, J. D.; NOVOKMET, A.; EICHLER-JONSSON, C.; RIBEIRO, R. C. *et al.* Prevalence and functional consequence of TP53 mutations in pediatric adrenocortical carcinoma: a children's oncology group study. **J Clin Oncol**, 33, n. 6, p. 602-609, Feb 2015.

WASZUT, U.; SZYSZKA, P.; DWORAKOWSKA, D. Understanding mitotane mode of action. **J Physiol Pharmacol**, 68, n. 1, p. 13-26, Feb 2017.

WEISS, A.; ATTISANO, L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. **Wiley Interdiscip Rev Dev Biol**, 2, n. 1, p. 47-63, 2013 Jan-Feb 2013.

WEISS, L. M. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol**, 8, n. 3, p. 163-169, Mar 1984.

WEISS, L. M.; MEDEIROS, L. J.; VICKERY, A. L. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **Am J Surg Pathol**, 13, n. 3, p. 202-206, Mar 1989.

WEN, D.; DANQUAH, M.; CHAUDHARY, A. K.; MAHATO, R. I. Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: Promises and obstacles. **J Control Release**, 219, p. 237-247, Dec 2015.

WENDT, M. K.; TIAN, M.; SCHIEMANN, W. P. Deconstructing the mechanisms and consequences of TGF- β -induced EMT during cancer progression. **Cell Tissue Res**, 347, n. 1, p. 85-101, Jan 2012.

WIEDEMANN, H. R.; BURGIO, G. R.; ALDENHOFF, P.; KUNZE, J. *et al.* The proteus syndrome. Partial gigantism of the hands and/or feet, nevi, hemihypertrophy, subcutaneous tumors, macrocephaly or other skull anomalies and possible accelerated growth and visceral affections. **Eur J Pediatr**, 140, n. 1, p. 5-12, Mar 1983.

WIENEKE, J. A.; THOMPSON, L. D.; HEFFESS, C. S. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. **Am J Surg Pathol**, 27, n. 7, p. 867-881, Jul 2003.

WU, Y.; WANG, W.; HU, W.; XU, W. *et al.* MicroRNA-205 suppresses the growth of adrenocortical carcinoma SW-13 cells via targeting Bcl-2. **Oncol Rep**, 34, n. 6, p. 3104-3110, Dec 2015.

XI, H.; SHUAI, Q. G.; SHAO, L. L. Involvement of the TGF β 1/Smad2/MMP3 signaling pathway in SB431542-induced inhibition of cell invasion in multiple myeloma RPMI 8226 cells. **Oncol Lett**, 14, n. 1, p. 541-546, Jul 2017.

ZAMBETTI, G. P. The p53 mutation "gradient effect" and its clinical implications. **J Cell Physiol**, 213, n. 2, p. 370-373, Nov 2007.

ZANCANELLA, P.; PIANOVSKI, M. A.; OLIVEIRA, B. H.; FERMAN, S. *et al.* Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol**, 28, n. 8, p. 513-524, Aug 2006.

ZHANG, J. W.; LI, Y.; ZENG, X. C.; ZHANG, T. *et al.* miR-630 overexpression in hepatocellular carcinoma tissues is positively correlated with alpha-fetoprotein. **Med Sci Monit**, 21, p. 667-673, Mar 2015.

ZHANG, L.; FENG, G.; ZHANG, X.; DING, Y. *et al.* microRNA-630 promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in the HCT116 human colorectal cancer cell line. **Mol Med Rep**, 16, n. 4, p. 4843-4848, Oct 2017.

ZHANG, S.; ZHANG, J. Y.; LU, L. J.; WANG, C. H. *et al.* MiR-630 promotes epithelial ovarian cancer proliferation and invasion via targeting KLF6. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**, 21, n. 20, p. 4542-4547, Oct 2017.

ZHAO, J. J.; CHEN, P. J.; DUAN, R. Q.; LI, K. J. *et al.* Up-regulation of miR-630 in clear cell renal cell carcinoma is associated with lower overall survival. **Int J Clin Exp Pathol**, 7, n. 6, p. 3318-3323, 2014.

ZHENG, S.; CHERNIACK, A. D.; DEWAL, N.; MOFFITT, R. A. *et al.* Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. **Cancer Cell**, 30, n. 2, p. 363, 08 2016.

ZHOU, C. X.; WANG, C. L.; YU, A. L.; WANG, Q. Y. *et al.* MiR-630 suppresses breast cancer progression by targeting metadherin. **Oncotarget**, 7, n. 2, p. 1288-1299, Jan 2016.

ZHOU, H. Q.; LIU, M. S.; DENG, T. B.; XIE, P. B. *et al.* The TGF- β /Smad Pathway Inhibitor SB431542 Enhances The Antitumor Effect Of Radiofrequency Ablation On Bladder Cancer Cells. **Onco Targets Ther**, 12, p. 7809-7821, 2019.

ZOU, Y. T.; GAO, J. Y.; WANG, H. L.; WANG, Y. *et al.* Downregulation of microRNA-630 inhibits cell proliferation and invasion and enhances chemosensitivity in human ovarian carcinoma. **Genet Mol Res**, 14, n. 3, p. 8766-8777, Jul 2015.

ÖZATA, D. M.; CARAMUTA, S.; VELÁZQUEZ-FERNÁNDEZ, D.; AKÇAKAYA, P. *et al.* The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. **Endocr Relat Cancer**, 18, n. 6, p. 643-655, Oct 2011.

Figures

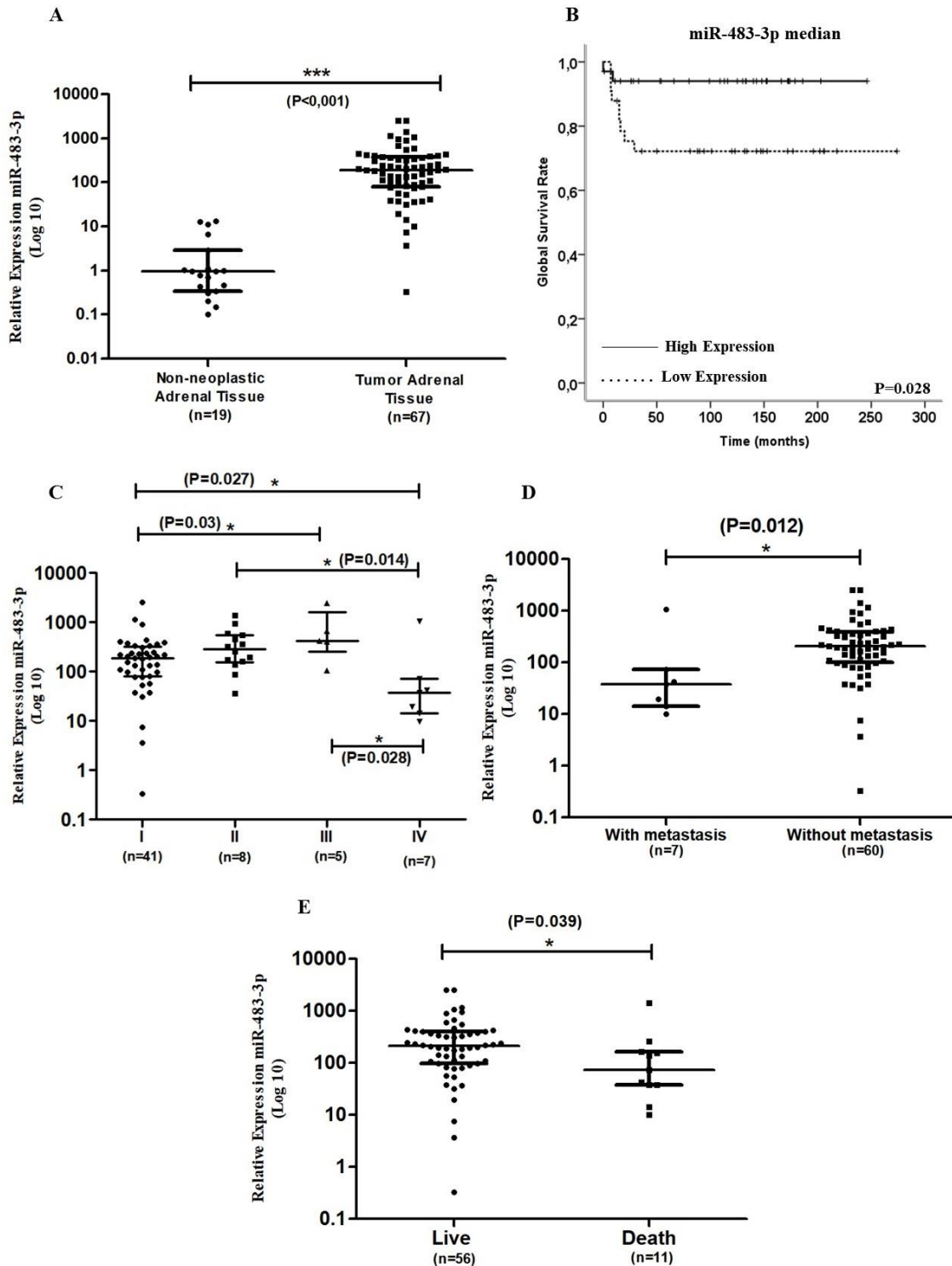


Figure 1. Relative expression of miR-483-3p. (A) We observed greater expression of miR-483-3p in ACT tumor samples ($n = 67$) when compared with non-neoplastic samples ($n = 19$) ($P < 0,001$). The lower expression of this miRNA, however, is associated with a worse prognosis, that is (B) with a worse overall survival ($P = 0,028$); (C) more advanced stages of the disease ($P < 0,05$); (D) the presence of metastasis ($P = 0,012$); (E) and patients who died ($P = 0,039$). Each sample was amplified in duplicate, being considered for analysis samples whose deviation did not exceed one cycle ($d < 1,0$) and the values of $P \leq 0,05$ (represented by *), obtained through the Mann-Whitney test, were considered significant. The samples whose expression value was equal to zero are not represented in the graph but were considered for statistical analysis.

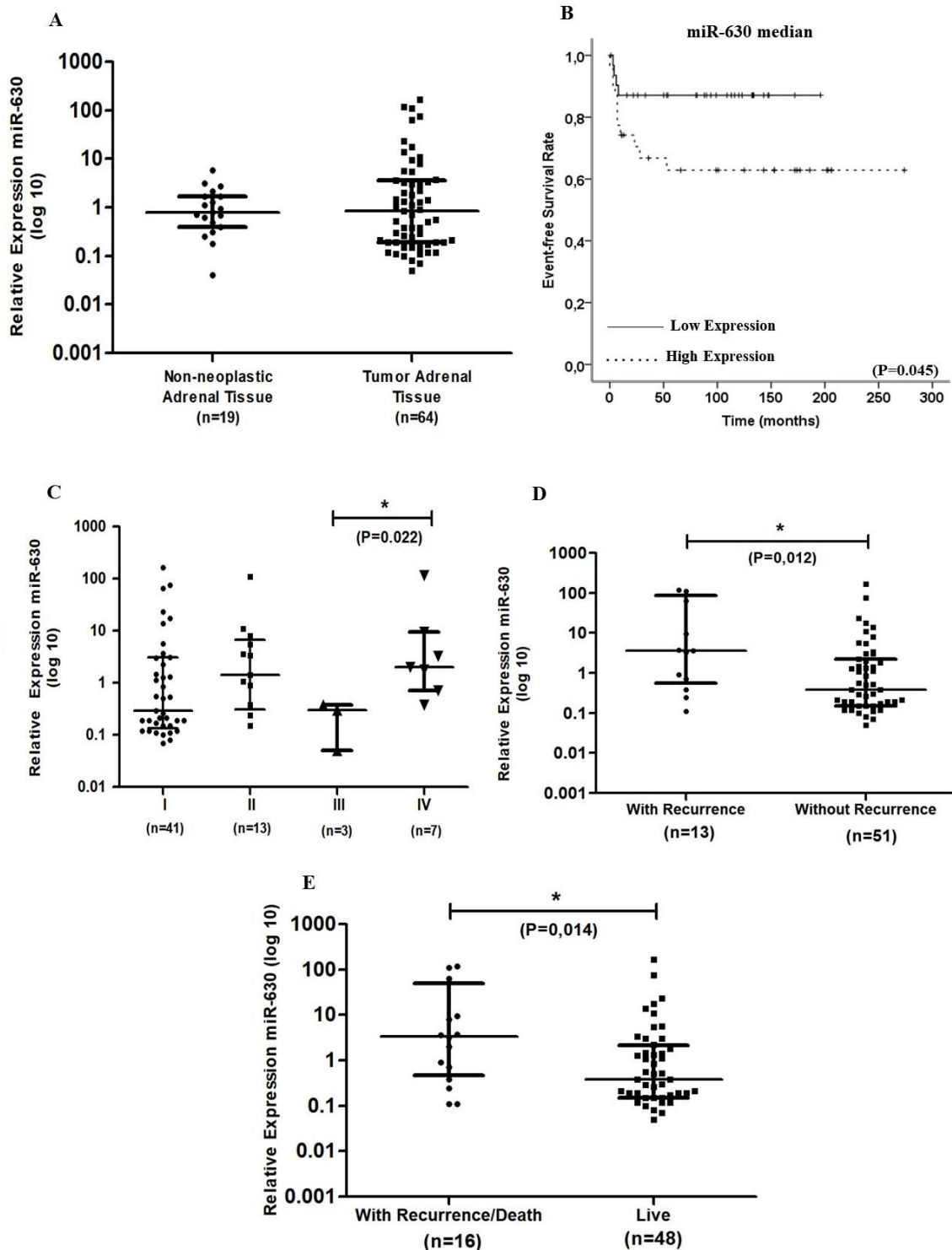


Figure 2. Relative expression of miR-630. (A) Here, it was found that the miR-630 expression does not show statistical difference when comparing ACT tumor samples ($n = 64$) and non-neoplastic adrenal samples ($n = 19$) ($P=0.937$). However, by separating patients between those who express the most and those who express the least miR-630, we saw that hyperexpression of this miRNA is associated with (B) worse event-free survival ($P = 0.045$); (C) more advanced stages of the disease ($P=0.022$); (D) the presence of recurrence ($P=0.012$); (E) and presence of recurrence and death ($P=0.014$). Each sample was amplified in duplicate, being considered for analysis samples whose deviation did not exceed one cycle ($d < 1.0$) and the values of $P \leq 0.05$ (represented by *), obtained through the Mann-Whitney test, were considered significant. The samples whose expression value was equal to zero are not represented in the graph but were considered for statistical analysis.

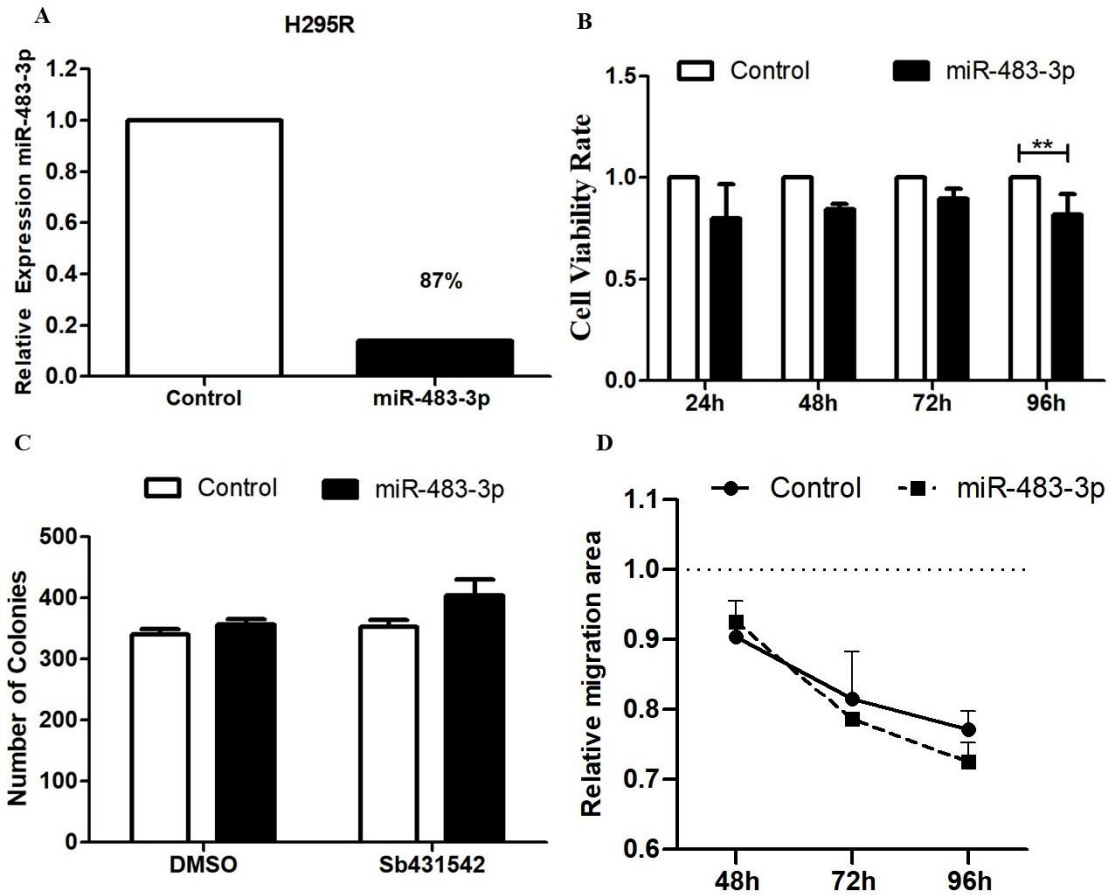


Figure 3. Modification of miR-483-3p expression in the H295R cell line. After lentiviral transduction to silence the miR-483-3p in H295R, (A) we observed an 87% silencing efficiency. Then, (B) evaluating cell viability, a decrease in cell viability was observed after the silencing of miR-483-3p in 96h ($P < 0,01$). (C) Colony formation capacity and (D) migration rate, however, showed no difference after the miR-483-3p was silenced. These data were obtained by applying the One-way ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. Three independent experiments were carried out and $P < 0.05$ was considered significant.

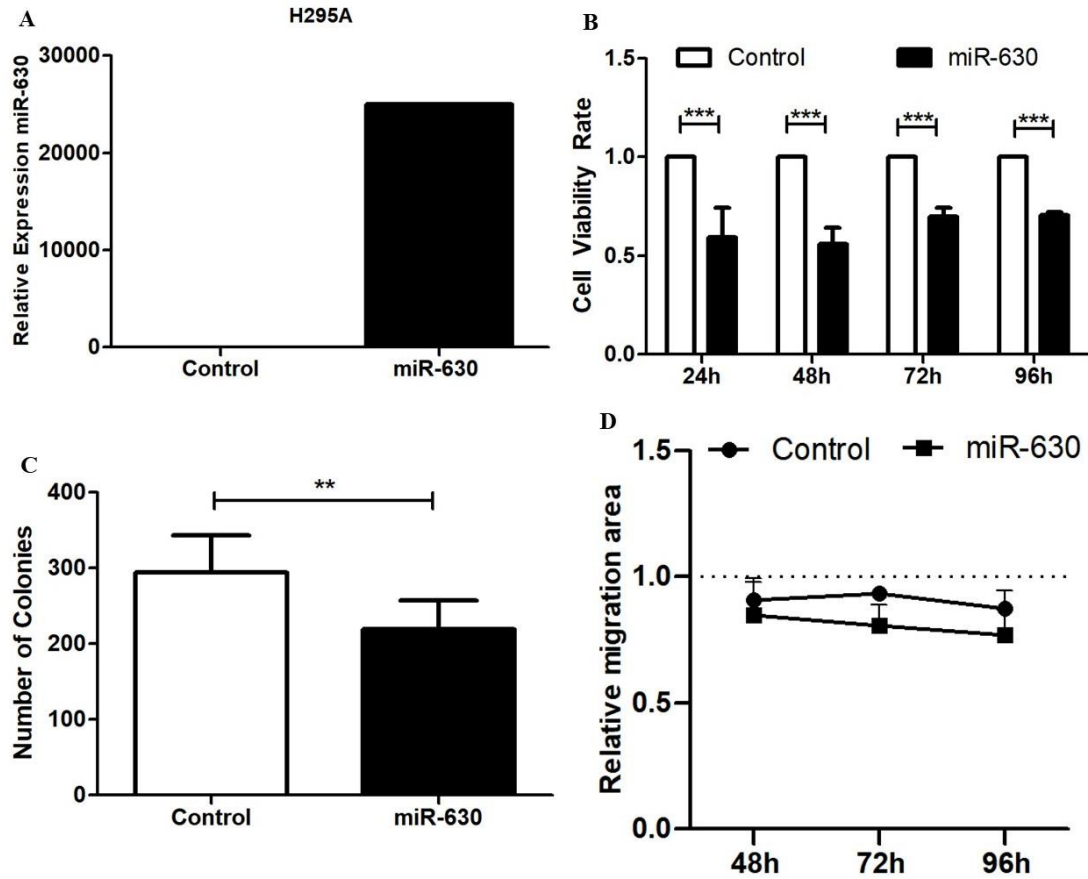


Figure 4. Hyperexpression of miR-630 in the H295A cell line. After lentiviral transduction to increase the miR-630 in H295A, (A) we observed that increased expression of miR-630 of these cells. Then, (B) evaluating cell viability, a decrease in cell viability was observed after the increasing miR-630 at all times evaluated ($P < 0.01$). (C) The same decrease was seen in the ability to form colonies ($P = 0.0028$) (D) migration rate, however, showed no difference after the miR-630 has increased expression ($P > 0.05$). These data were obtained by applying the One-way ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. Three independent experiments were carried out and $P < 0.05$ was considered significant.

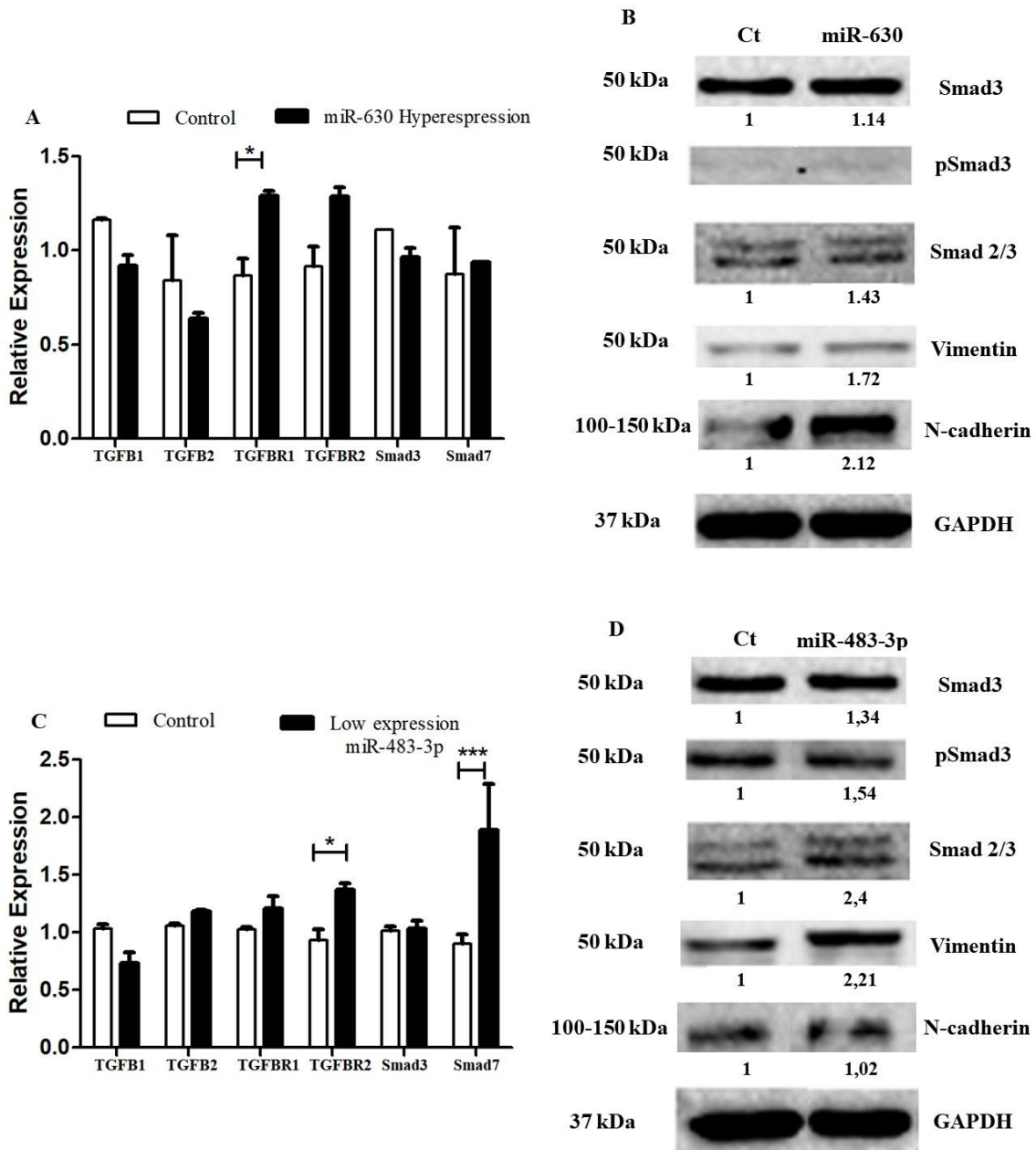


Figure 5. miR-483-3p and miR-630 target genes from the TGF-β pathway. After overexpressing miR-630 in H295A, (A) we observed that this differentiated expression led to increased expression of the *TGFB1* gene ($P < 0.05$), (B) as well as increased expression of Smad3, Smad 2/3, Vimentin and N-cadherin proteins. (C) The silencing of miR-483-3p also led to increased expression of some genes, such as *TGFB2* and *Smad7*; (D) and Smad3, pSmad3, Smad 2/3, Vimentin and N-cadherin proteins.

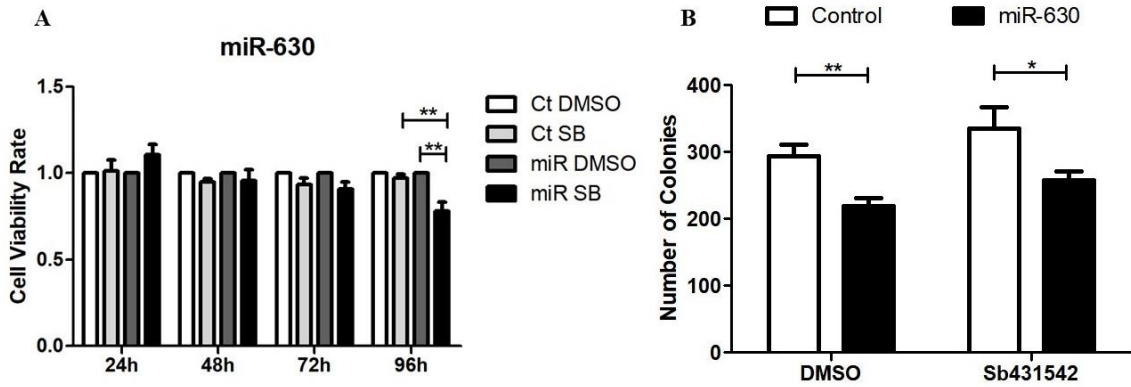


Figure 6. Inhibition of the TGF- β pathway and the differentiated expression of miR-630. By increasing the expression of miR-630 and treating the cells with the inhibitor SB431542, (A) it was possible to observe that the combination resulted in a decrease in cell viability after 96 hours of treatment ($P < 0.001$), as well as, (B) less ability to formation of colonies of cells in relation to cells also treated with the inhibitor, but with normal levels of miR-630 ($P = 0.034$). These data were obtained by applying the One-way ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. Three independent experiments were carried out and $P < 0.05$ was considered significant.

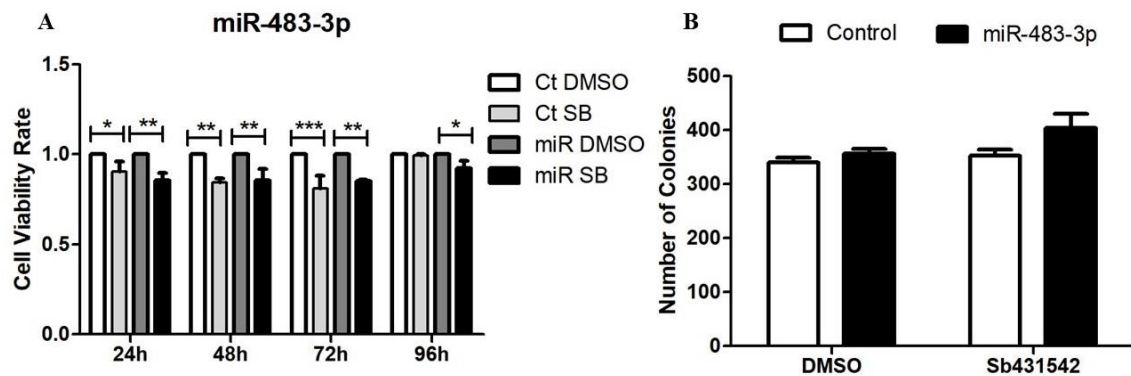


Figure 7. Inhibition of the TGF- β pathway and the differentiated expression of miR-483-3p. (A) Only after 96 hours, the combination of the treatment with the silencing of miR-483-3p allowed a decreased viability, which was not found in the control cell ($P < 0.05$). (B) However, the silencing of miR-483-3p in conjunction with treatment with the inhibitor, SB431542, did not show significant differences in colony formation capacity ($P > 0.05$). These data were obtained by applying the One-way ANOVA test followed by the Bonferroni post-test. Three independent experiments were carried out and $P < 0.05$ was considered significant.

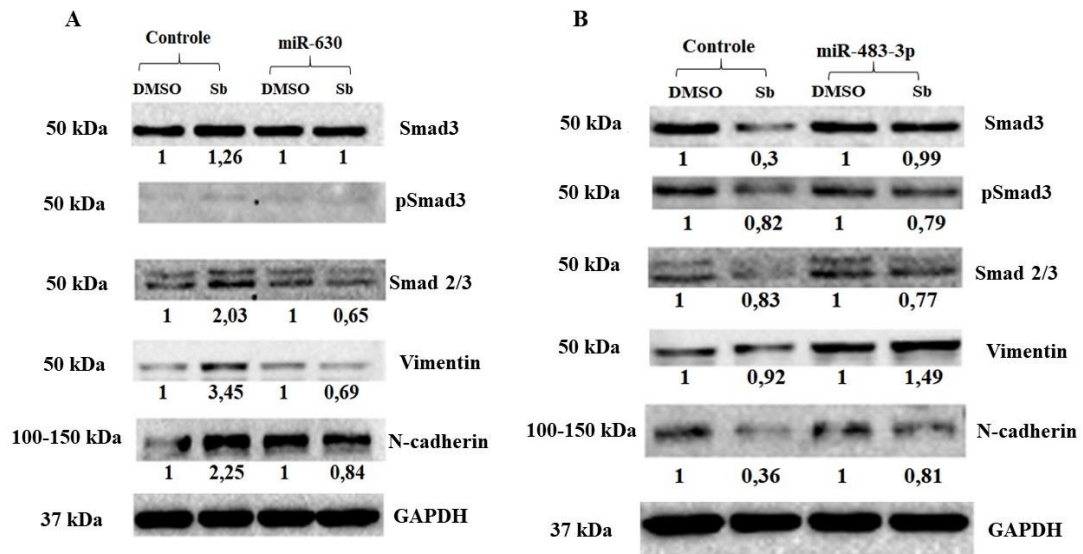


Figure 8. Expression of proteins from the TGF- β pathway after differentiated miRNA expression. (A) The treatment with the SB431542 inhibitor caused an increase in the expression of Smad3, Smad 2/3, Vimentin, and N-cadherin, in the control cell line. However, when combining this treatment with increased expression of miR-630, it was possible to observe an inversion of this effect. (B) When performing the same analysis, in the cell line with the silenced miR-483-3p, we observed that pSmad3, Smad 2/3 and N-cadherin show a small decrease when we treat the cell line with the inhibitor, which does not occur with Smad3 and Vimentin.

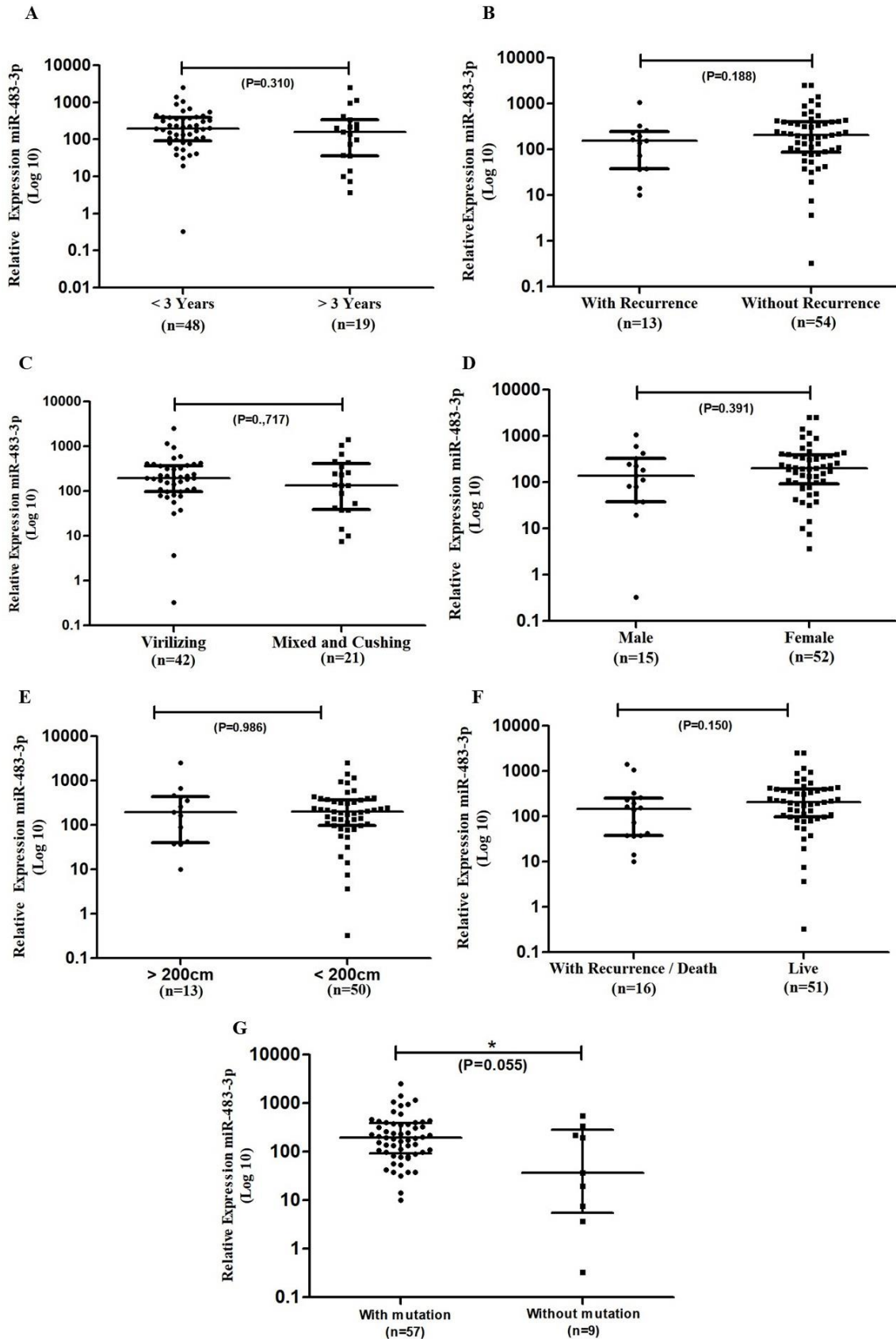
Supplementary Figures

Supplementary 1. Table with probes of miRNAs and genes used

| Gene / miRNA | Code | Catalog | Company |
|----------------|---------------|----------|--------------|
| Hsa-miR-630 | 001563 | #4427975 | ThermoFisher |
| Hsa-miR-483-3p | 002339 | #4427975 | ThermoFisher |
| RNU6B | 001093 | #4427975 | ThermoFisher |
| RNU48 | 001006 | #4427975 | ThermoFisher |
| TGFB1 | Hs00998133_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFB2 | Hs00234244_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFBR1 | Hs00610320_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| TGFBR2 | Hs00234253_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Smad3 | Hs00969210_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Smad7 | Hs00998193_m1 | #4331182 | ThermoFisher |
| Gus | Hs00939627_m1 | #4331182 | ThermoFisher |

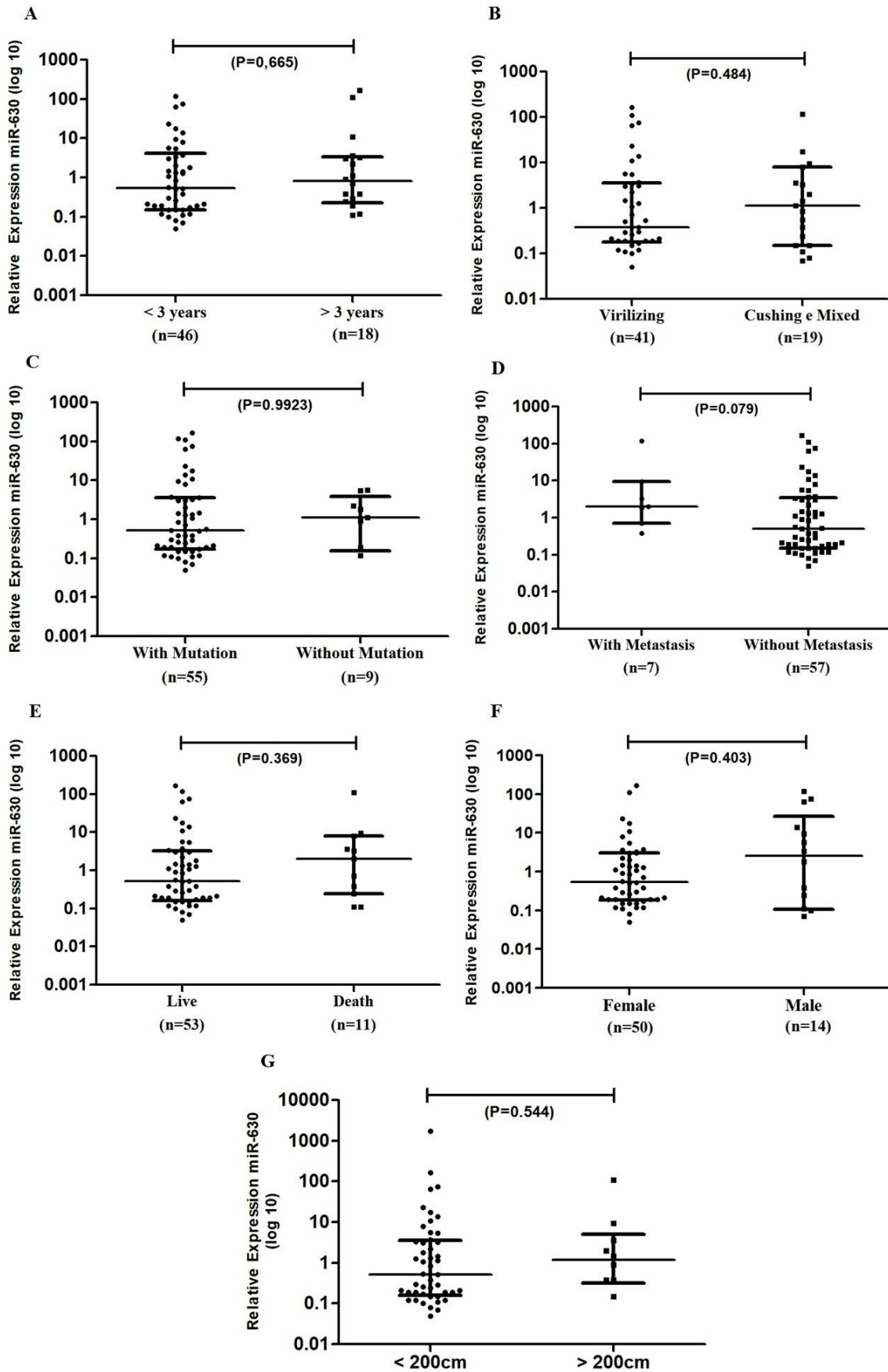
Supplementary 2. Table with the antibodies used

| Antibody | Code | Company |
|----------------------------|-------------|----------------|
| Smad3 | Ab122028 | Abcam |
| Phosphorylate Smad3 | Ab63403 | Abcam |
| Smad 2/3 | D7G7 | Cell Signaling |
| Vimentin | Ab16700 | Abcam |
| N-cadherin | Ab18203 | Abcam |
| Slug | C1967 | Cell Signaling |
| GAPDH | Sc47724 | Santa Cruz |



Supplementary 3. Relative expression of miR-483-3p. The other clinical parameters evaluated did not present significant data, indicating that miR-483-3p does not seem to be associated with (A) age at diagnosis, (B) recurrence, (C) hormonal production, (D) gender, (E) tumor size (F) recurrence and death and (G) presence of

TP53 mutation. Each sample was amplified in duplicate, being considered for analysis samples whose deviation did not exceed one cycle ($d < 1.0$) and the values of $P \leq 0.05$ (represented by *), obtained through the Mann-Whitney test, were considered significant. The samples whose expression value was equal to zero are not represented in the graph but were considered for statistical analysis.



Supplementary 4. Relative expression of miR-630. The other clinical parameters evaluated did not present significant data as (A) age at diagnosis, (B) hormonal production, (C) presence of *TP53* mutation, (D)

metastasis, (E) death, (F) gender, (G) tumor size. Each sample was amplified in duplicate, being considered for analysis samples whose deviation did not exceed one cycle ($d < 1.0$) and the values of $P \leq 0.05$ (represented by *), obtained through the Mann-Whitney test, were considered significant. The samples whose expression value was equal to zero are not represented in the graph but were considered for statistical analysis.