

MARLENE APARECIDA FERREIRA PINTO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA E
PROTEICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO
AP-1 EM CULTURAS DE CÉLULAS DE
TUMORES ADRENOCORTICAIS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de mestre em Ciências Morfofuncionais.

Área de Concentração: Ciências Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi.

Versão Original

SÃO PAULO
2014

RESUMO

Ferreira M. Estudo da expressão gênica e proteica do fator de transcrição AP-1 em culturas de células de tumores adrenocorticais. [dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

No sul do Brasil, a incidência de tumores adrenocorticais é cerca de 10 a 12 vezes maior do que no resto do mundo, com prevalência para o tipo infantil, devido à ocorrência de uma mutação germinativa no p53. Para compreensão da biologia dos tumores adrenocorticais são utilizados marcadores moleculares que em geral são genes reguladores do ciclo celular. Dentre esses genes, há os genes de resposta primária que são ativados por hormônios e fatores de crescimento, como por exemplo os genes que compõem o fator de transcrição AP-1. Esse é um fator dimérico composto por várias famílias de proteínas que tem em comum domínios essenciais para dimerização e ligação ao DNA. As subfamílias *JUN* (*JUN*, *JUNB* e *JUND*) e *FOS* (*FOS*, *FOSB*, *FRA-1* e *FRA-2*) são a maioria das proteínas que compõem AP-1. A combinação entre as diferentes proteínas determina a especificidade e afinidade de ligação e os genes que serão regulados. Além disso, os efeitos desses genes é contexto-dependente, de maneira que podem ser reguladores positivos ou negativos da proliferação celular. Nesse projeto tivemos como hipótese que as proteínas da família *JUN*, se correlacionam com proteínas reguladoras do ciclo celular em tumores do córtex da suprarrenal, e que poderiam ser utilizados no diagnóstico e prognóstico desse tipo de tumor. Para testar essa hipótese analisamos o padrão de expressão gênica e proteica, respectivamente por ensaios de PCR e imunoblotting, da família *JUN* e do gene *FOS* em culturas de células de tumores adrenocorticais, obtidos de fragmentos de tumores de pacientes com diferentes características clínicas e anatopatológicas. A análise do padrão de expressão de genes da família *JUN* e do gene *FOS* em culturas de células de tumores adrenais por PCR Array, mostrou que esses genes estão pouco expressos nessas culturas, o que foi confirmado em ensaios de qPCR. Não foi possível determinar um padrão de expressão que diferenciasse os tipos de culturas celulares estudados, ou mesmo tumores adultos e pediátricos, através do estudo desse genes. Os tratamentos com ACTH aumentam a expressão da proteína *JUN* e *JUNB*, que podem ter certa importância em tumores responsivos à esse hormônio, e que merecem análises futuras.

Palavras Chave: Tumores Adrenocorticais. Fator de Transcrição. AP-1. Expressão Gênica. Genes *JUN* e *FOS*.

ABSTRACT

Ferreira M. Analysis of *JUN* and *FOS* Gene Expression in Adult and Pediatric Adrenocortical Tumor Cells. [master (Thesis in Morphofunctionals Sciences)] São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo.

The adrenocortical tumors incidence is 10 to 12 times bigger in the south of Brazil than in the rest of the world. It is more prevalent for childhood type and occurs due to a germinative mutation at p53. In order to have a better comprehension of adrenocortical tumor biology, molecular markers are utilized because they are in general cell cycle regulators. Among these genes, there are the early primary genes which are activated by hormones and growth factors, like the genes which compound the transcription factor AP-1. This is a dimeric factor, compound by protein family which has essential domains to dimerization and DNA binding. *JUN* (*JUN*, *JUNB*, *JUND*) and *FOS* (*FOS*, *FOSB*, *FRA1* e *FRA 2*) proteins are the mainly AP-1 components. The binding specificity and the target genes regulation are determined by the combination of different proteins. Furthermore, genes effects are context-dependent and could be positive or negative proliferation regulators. In the present study, our hypothesis is that *JUN* and *FOS* proteins are correlated with others cell cycle regulatory proteins and could be utilized as a prognose and diagnostic predictor for adrenocortical tumors. The genic and protein profile are analyzed, respectively by PCR assays and Immunoblotting from *JUN* and *FOS* genes in adrenocortical tumors cultures derived from patients with different clinical and anatomic characteristics to hypothesis confirmation. The *JUN* and *FOS* gene expression were analyzed by PCR Array and showed that these genes are down regulated in these adrenocortical tumors cells which were confirmed through qPCR analysis. The genes expression analysis wasn't able to establish a standard of expression between the studied cell cultures or even between adults and pediatric tumors. The ACTH treatments increased *JUN* and *JUNB* proteins that may have some significance in responsive tumors to this hormone, and deserve further analysis.

Keywords: Adrenocortical Tumors. Transcription Factor. AP-1. Genic Expression. *JUN* and *FOS* genes.

1 INTRODUÇÃO

Nos mamíferos, as suprarrenais são glândulas endócrinas com formato triangular, envoltas por uma cápsula fibrosa e posicionadas acima dos rins, na cavidade abdominal. Cada glândula é composta por duas regiões histologicamente distintas, o córtex e a medula adrenal. O córtex é dividido em três zonas concêntricas: glomerulosa, fasciculada e reticulada (McNicol, 1992). Através de uma ação coordenada dos citocromos P450 e de desidrogenases, o córtex da suprarrenal produz hormônios esteroides, utilizando o colesterol como substrato (Simpson et al., 1992). A zona glomerulosa é a principal responsável pela secreção dos mineralocorticoides, enquanto as zonas fasciculada e reticulada são as responsáveis respectivamente, pela síntese do cortisol e dos hormônios sexuais humanos (Figura1).

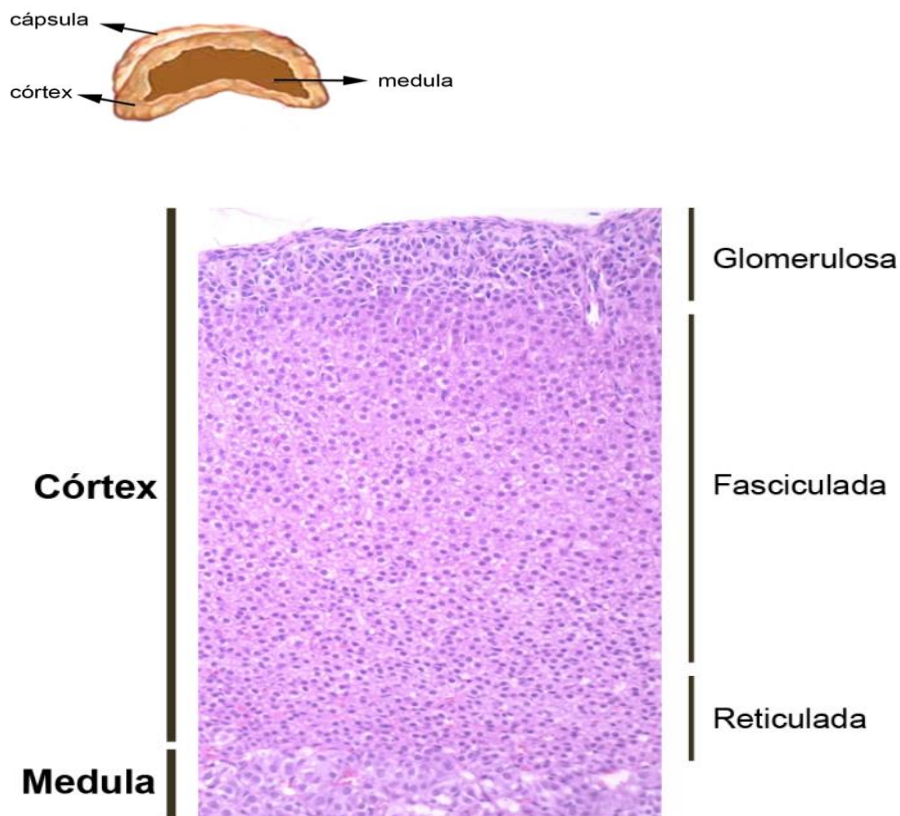


Figura 1. Desenho de uma seção Longitudinal e Corte Histológico da glândula adrenal de rato (Coloração com H&E. Aumento de 100x Adaptado de Torres e Lotfi, 2007).

Em condições fisiológicas normais, os principais estímulos para manutenção do trofismo, proliferação celular e síntese dos mineralocorticóides e glicocorticóides são, respectivamente o sistema renina-angiotensina, por estímulo da Angiotensina II e o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, através do ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). O ACTH é um peptídeo composto por

39 aminoácidos, originado a partir do processamento da pró-opiomelanocortina (POMC) (White, Cribson, 1998) e tem como função estimular a esteroidogênese e está envolvido na manutenção do córtex da adrenal (Ogishima et al., 1989). Nas glândulas adrenais o ACTH se liga no receptor de melanocortina, o receptor MC2R, que é um integrante da família de receptores da melanocortina, uma proteína transmembrânica de sete hélices acoplada à proteína G (Xing Y et al., 2010). Disfunções destes fatores e funções têm sido encontradas em patologias caracterizadas por hipersecreção hormonal e/ou descontrolo na proliferação celular.

De uma maneira geral, as patologias da glândula adrenal podem ser classificadas como hiperplasias, que podem ser macro e micronodular, e as neoplasias, os adenomas e carcinomas. A incidência e prevalência dos tumores adrenocorticais (ACT) tem aumentado devido aos achados acidentais de massas adrenais durante exames de análise de imagem. Essa prevalência varia de 0,6% a 2% em pacientes acima dos 50 anos (Stojadinovic et al., 2003). No entanto, somente uma pequena proporção desses tumores causa alterações endócrinas e menos que 5% são malignos (Angeli et al., 1997; Bornstein et al., 1999). A incidência anual de carcinomas adrenocorticais (ACC) é de 1 a 2 casos por milhão de habitantes e é tipicamente diagnosticado em adultos na faixa dos 40 e 50 anos, mais comum em mulheres, mas também pode ser encontrado em crianças. No sul do Brasil, a incidência de ACT aumenta para 12 casos por milhão por ano com prevalência para o tipo infantil, devido à ocorrência de uma mutação germinativa na proteína do gene supressor de tumor, o gene TP53 (Almeida, Latronico, 2007; Ribeiro et al., 2001). De uma maneira geral, carcinomas adrenocorticais são diagnosticados tardiamente apresentando metástases disseminadas, cujo prognóstico é limitado e com uma taxa de sobrevivência abaixo dos 35% em cinco anos (Abiven et al., 2006; Allolio et al., 2004; Libe et al., 2007; Luton et al., 1990). Apesar dos progressos obtidos, a compreensão da biologia dos tumores adrenocorticais é ainda incompleta.

Clinicamente os adenomas (ACA) e os carcinomas (ACC) adrenocorticais se apresentam de maneira semelhante. A distinção entre eles é feita através de um escore de critérios anátomo-patológicos conhecidos como escore de Weiss. Esses critérios são alta taxa mitótica, alto grau nuclear,

mitoses atípicas, célula claras que compreendem 25% ou menos do tumor, arquitetura difusa, necrose, invasão de estrutura venosa, invasão de estrutura sinusoidal e invasão da cápsula do tumor (Weiss, 2009). Em situações limítrofes e principalmente nos tumores pediátricos, tais critérios apresentam limitações (Mendonça et al., 1995; Wieneke et al., 2003; Weiss et al., 1989). Em tumores pediátricos, foram encontrados alguns marcadores de malignidade que sugerem que apesar de se apresentarem clinicamente benignos, há a presença de achados histológicos que são associados à malignidade, tais como, necrose; invasão capsular e vascular; pleomorfismo nuclear e mitoses atípicas. Além disso, há dois critérios que são preditores de sobrevivência e portanto, importantes na diferenciação entre carcinomas e adenomas e são a ocorrência de recidivas e metástases (Weiss, 2009). Bugg e colaboradores (1994) constataram que 9 de 16 carcinomas adrenocorticais altamente agressivos, e 5 de 27 carcinomas adrenocorticais com um baixo nível de agressividade apresentaram recidivas e metástases. Em relação aos adenomas, em um coorte de 11 adenomas adrenocorticais, nenhum apresentou recidiva e/ou metástases.(Weiss et al., 2009; Wieneke et al., 2003). O peso, o tamanho e a coloração dos tumores também são critérios importantes. Os adenomas geralmente pesam menos que 50 g, possuem de 5 a 6 cm³ e são mais amarelos, enquanto que os carcinomas podem pesar até 500 g, medem até 200 cm³ e apresentam coloração amarelo-alaranjado ou bege rosado (Tissier et al., 2010). Nas últimas décadas uma série de estudos envolvendo aspectos histológicos e moleculares têm sido realizados para encontrar marcadores de malignidade mais precisos. Atualmente os marcadores histológicos e moleculares utilizados em estudos são, a proteína Ki-67, que apresenta expressão consistentemente maior nos carcinomas quando comparado aos adenomas (Goldblum et al., 1993; Tissier et al., 2010), a mutação do gene p53, que ocorre devido a perda de heterozigosidade em TP53 e cuja proteína está 25% mais expressa em carcinomas (Ohgaki et al., 1993; Reincke et al., 1994; Libe et al., 2007; Lin et al., 1994;), o fator de crescimento insulina-like do tipo 2 (IGF2) que é um importante fator de crescimento fetal e está 90% mais expresso em carcinomas (Tissier et al., 2010), o ACTH, que está diretamente envolvido no aumento da expressão de IGF2 e IGF1, ambos estão diretamente relacionados a tumorigênese

(Ilvesmaki et al., 1993; Gao et al., 2002; Liu et al., 1995; Weber et al., 1997), a ciclina E, que é um importante regulador do ciclo celular, e cujos níveis estão aumentados em carcinomas em relação aos adenomas (Bourcigaux et al., 2000; Tissier et al., 2005), a via clássica Wnt/ β -catenina que é ativada em carcinomas e adenomas, além disso o acúmulo de β -catenina é maior nos adenomas que em carcinomas (Gaujoux et al., 2008; Tissier et al., 2005).

Em uma análise geral dos estudos sobre a utilização desses marcadores, Giordano (2010) concluiu que os carcinomas adrenocorticais podem, através de marcadores moleculares, serem classificados em subgrupos que podem ser relevantes em termos de prognóstico. Além disso a análise da expressão gênica baseada no estudo de um pequeno número de genes informativos pode auxiliar na rotina clínico-patológica, e que finalmente genes relacionados com ciclo celular e conseqüentemente com a proliferação celular são importantes na tumorigênese adrenocortical e precisam ser estudados.

A indução da proliferação celular está relacionada à ação de hormônios e fatores de crescimento, que ao se ligarem a receptores específicos desencadeiam uma cascata de sinalização, que ocorre na maioria das vezes por fosforilação, e alteram a expressão de genes específicos (Pardee, 1989; Scheer, 1994). A superfamília das MAPKs é composta por três famílias de proteínas quinases, as ERKs que são proteínas reguladas por sinais externos; as JNKs que são quinases NH₂ terminal de *JUN* e a p38/MAPK (Cowan, Story, 2003). Ao final de uma cascata de sinalização proteínas modificadas por diferentes níveis de fosforilação são direcionadas ao núcleo e tem a capacidade de se ligar às regiões alvo do DNA, e modificar o padrão de expressão gênica das células (Cobb, Goldsmith, 1995; Eferl, Wagmer, 2003; Pearson et al., 2001; Seger, Krebs, 1995). Em sua maioria esses genes codificam proteínas com a função de regular a transcrição gênica de outros genes, sendo, portanto, importantes fatores de transcrição que podem ter como função estimular a progressão do ciclo celular (Healy et al., 2012; Scheer, 1994) como exemplificado na Figura 2.

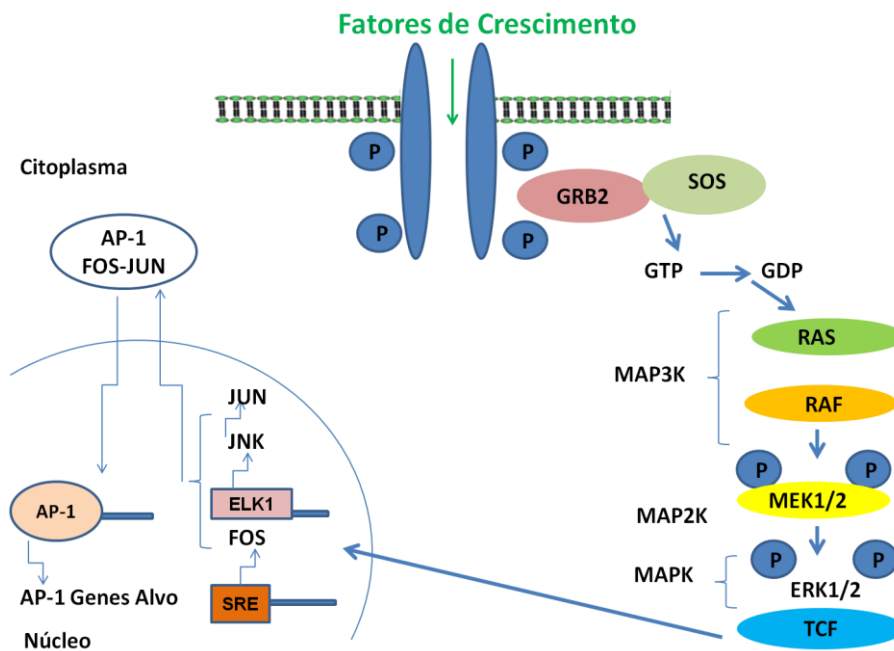


Figura 2. Esquema da cascata de sinalização MAPK que ativa o fator de transcrição AP-1 (Adaptado de Pearson et al., 2001).

O ciclo celular ocorre em fases (gaps) conhecidas como fases G1 (Gap1), G2 (Gap2), S (Síntese e duplicação do DNA) e M (Mitose, citocinese e divisão celular) do ciclo celular. Na fase G1 do ciclo celular, que pode ser a mais longa, as células duplicam suas organelas e através da produção de proteínas e fatores de transcrição se preparam para a duplicação do DNA ou fase S do ciclo celular. Ao final da fase G1 existe um ponto de restrição ou de checagem (R1), que pode interromper o ciclo celular caso as proteínas e fatores de crescimento necessários para a entrada em S não se completaram (Blagosklonny, Pardee, 2002; Dubavka, Scott, 2000). Dentre os genes que são expressos nessa fase do ciclo celular estão os genes de resposta primária, que não requerem nova síntese proteica para sua expressão, garantem o padrão de expressão diferencial dos genes de resposta secundária, como por exemplo as ciclinas dependentes de quinases (CDKs) (Herschman, 1991). As ciclinas D (D1, D2 e D3) são as ciclinas expressas na fase G1 do ciclo celular e se ligam às com CDK4 e 6 cujo complexo irá estimular a expressão da ciclina E que por sua vez se complexa com a CDK2 (Sherr, 1993). A formação dos complexos de ciclinas D e CDKs também bloqueiam o efeito inibitório das proteínas CKIs (cyclin dependent kinase inhibitors) o que permite a fosforilação da proteína Rb (retinoblastoma) que libera o fator de transcrição E2F que ativa genes que

permitem a transição para a fase de síntese de DNA, a fase S (Sherr et al., 1999; Herschman, 1991). Se as condições extracelulares não forem favoráveis para a entrada em G1, a célula entra em um estado quiescente que é a fase G0, uma etapa que se interpõe às fases do ciclo, como um anexo da interfase (fase S) (Pardee, 1974). Após a síntese do DNA, a célula inicia o preparo para a mitose que é a fase G2, em que a célula apresenta conteúdo duplicado de material genético. Nessa fase há outro ponto de restrição (R2) e ocorre a expressão de p53 que é o gene responsável por detectar erros de replicação e material genético não duplicado (Nigg et al., 2012). A fase seguinte é a fase M onde ocorre a condensação e segregação dos cromossomos e desorganização do envelope nuclear. Após a segregação dos cromossomos, a membrana nuclear é reorganizada e então ocorre a citocinese que é a divisão do material genético (Pardee, 1974).

Portanto, os genes de resposta primária são um grupo de genes que são induzidos por sinais celulares extrínsecos e intrínsecos sem necessidade de síntese proteica para sua expressão. Esses genes que primeiro respondem à essa onda de sinalização tem um papel chave na resposta biológica que inclui plasticidade e sobrevivência neuronal, resposta ao estresse cardíaco, resposta imune inata e adaptativa, metabolismo da glicose e transformação oncogênica (Fowler et al., 2011).

Dentre os genes de resposta primária estão descritos os genes que codificam proteínas que irão formar o fator de transcrição AP-1 (activator protein 1) (Figura 3).

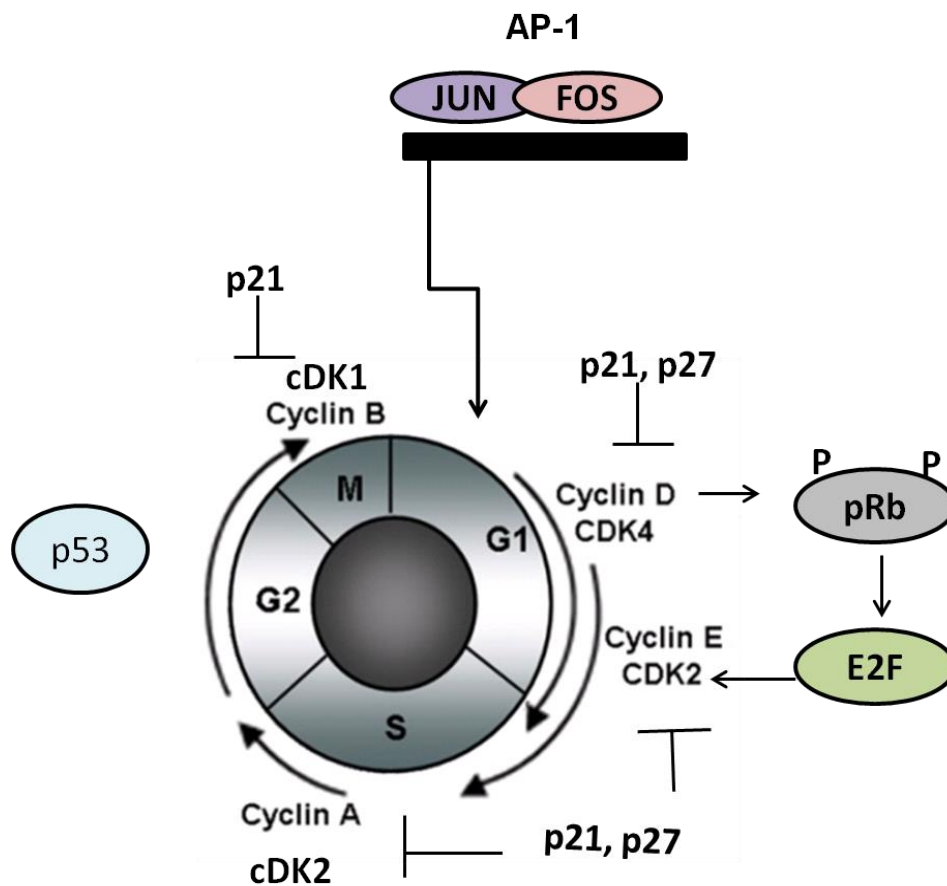


Figura 3. Esquema das fases do ciclo celular que mostra a relação do fator AP-1 e a fase G1 do ciclo celular (Adaptado de Li et al., 2013).

As proteínas que formam AP-1 têm em comum domínios zíper de leucina básica (bZIP) essenciais para dimerização e ligação ao DNA. AP-1 pode ser composto pelas proteínas JUN (JUN, JUNB e JUND) e FOS (FOS, FOSB, FRA-1 e FRA-2), além das proteínas que podem dimerizar com JUN e FOS, tais como JDP 1 e 2 (Jun dimerization partners), proteínas ATF (activating transcription factor) ATF2, LRF1/ATF3, B-ATF. Há também outro grupo de proteínas AP-1 que é constituído pelas proteínas da família MAF (musculo aponeurotic fibrosarcoma), que inclui C-MAF, MAFB, MAFA, MAFG/F/K E NRL (Eychene et al., 2008). A combinação entre as diferentes proteínas determina a especificidade e afinidade de ligação, e consequentemente os genes que serão regulados (Hess et al., 2004).

A maior afinidade de ligação e heterodimerização ocorrem entre JUN e FOS; pois JUN pode formar tanto homodímeros como heterodímeros, e é capaz de formar dímeros estáveis que se ligam às regiões consenso de AP-1.

Em contrapartida FOS não é capaz de formar ligações estáveis enquanto homodímero, e por isso forma heterodímeros com JUN para se ligar ao DNA (Figura 4). As proteínas MAF (V-MAF, C-MAF E NRL) podem heterodimerizar com JUN e FOS (Swaroop et al.,1992; Nishizawa et al.,1989), enquanto MAFB, MAFF, MAFG E MAF K só podem heterodimerizar com FOS. As proteínas ATF podem formar homo e heterodímeros com JUN e se ligam preferencialmente aos elementos responsivos de AMP cíclico (CRE) (Shaulian, Karin, 2001). Outra proteína relacionada a região CRE, a proteína de ligação CREB (cAMP responsive element-binding) interage com JUN, JUNB e FOS, enquanto que CREB 2 forma apenas heterodímeros com JUN (Angel, Karin, 1990).

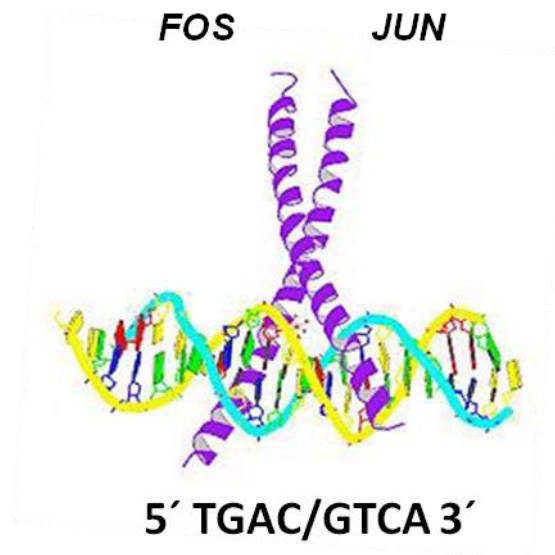


Figura 4. Estrutura em alfa hélice de AP-1 (Adaptado de Chinenov, Kerppola, 2001).

Resultados da ação do hormônio adrenocorticotropico (ACTH) e do éster de forbol (PMA) em células de tumor adrenocortical de camundongo, linhagem Y1, resulta na expressão de várias proteínas da família FOS e JUN e na progressão do ciclo celular por vias diferentes da via clássica da ação do ACTH, a via cAMP/PKA (Kimura et al., 1993; Lotfi et al., 1997; Lotfi & Armelin, 1998; Lotfi & Armelin, 2001). Trabalhos do nosso grupo que utilizaram diferentes modelos experimentais em ratos, infusão in situ (Baccaro et al., 2007) e hipofisectomia (Torres, Lotfi, 2007), mostraram o papel do fator de transcrição AP-1 na resposta proliferativa do ACTH e do fator de crescimento de fibroblastos do tipo 2 (FGF2) no córtex adrenal in vivo. Nesses trabalhos a composição de AP-1 foi analisada e a relação entre a expressão de *JUN* e *FOS*

com a indução da proliferação foi estabelecida. Além disso, *FOS* e *JUN*, podem estimular a esteroidogênese nas células adrenais se ligando no promotor do gene que codifica a proteína StAR (Steroidogenic acute regulatory protein), proteína transportadora de colesterol na (Rincon et al., 2009).

A proteína JUN parece estar envolvida na progressão do tumor por aumentar a proliferação e proteger as células da apoptose (Shaulian et al., 2010). *JUNB* pode ser um oncogene como um supressor de tumor, enquanto a relevância de *JUND* como regulador de crescimento é ainda pouco clara (Shaulian et al., 2010).

AP-1 será definido como oncogene ou supressor de tumor em função do tipo celular, do estado de diferenciação celular, estágio do tumor e seu background genético. Esse efeito ocorre devido à capacidade de fator de transcrição regular genes envolvidos na proliferação, diferenciação, apoptose, angiogênese e metástase, o que lhe confere potencialmente características de alvo para terapia antitumoral (Shaulian et al., 2010). Diante do apresentado tivemos como hipótese que as proteínas da família JUN (*JUN*, *JUNB* e *JUND*) podem ser proteínas reguladoras do ciclo celular em tumores da suprarrenal, e que poderiam ser utilizados no diagnóstico e prognóstico desse tipo de tumor, ou mesmo, potencialmente, alvos em terapia.

6 CONCLUSÕES

A análise do padrão de expressão de genes da família *JUN* e do gene *FOS* em culturas de células de tumores adrenais por PCR Array, mostrou que esses genes estão pouco expressos nessas culturas.

A validação da expressão gênica dos genes por PCR quantitativo confirmou os baixos níveis de expressão dos genes estudados.

Não foi possível determinar um padrão de expressão que diferenciasse os tipos de culturas celulares estudados, ou mesmo tumores adultos e pediátricos, através do estudo dos genes da família Jun e do gene Fos.

Os tratamentos com ACTH aumentam a expressão da proteína JUN e JUNB, que podem ter certa importância em tumores responsivos à esse hormônio, e que merecem ser mais bem estudados nesses tumores.

REFERÊNCIAS

Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Clinical and biological features in the; prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006; 91(7): 2650-5.

Agarwal BB Inflammation, a silent killer in cancer is not so silent! *Curr Opin Pharmacol.* 2009; 9(4):347-50.

Agarwal SK, Novotny EA, Crabtree JS, Weitzman JB, Yaniv M, Burns AL, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Spiegel AM, Marx SJ Transcription factor JunD, deprived of menin, switches from growth suppressor to growth promoter *Proc Natl Acad Sci. U S A,* 2003; 100(19):10770-5.

Almeida MQ, Latronico AC. The molecular pathogenesis of childhood adrenocortical tumors. *Horm Metab Res.* 2007; 39(6):461-6.

Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004; 60(3): 273-87.

Angel P, Karin M. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. Elsevier Science Publishers B.V. Oct; 1991; 1072, 129-57.

Angeli S, Favretti C, Buoro S, Fandella A, Anselmo G, Conconi MT, Parnigotto PP. Effects of DHT and EGF on human hyperplastic prostate cells cultured in vitro: growth, morphology and phenotype characterisation. *Ann Anat.* Jun; 1997, 179(3):255-64.

Baccaro RB, Mendonça PO, Torres TE, Lotfi CF Immunohistochemical Jun/Fos protein localization and DNA synthesis in rat adrenal cortex after treatment with ACTH or FGF2. *Cell Tissue Res.* 2007; 328(1):7-18.

Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, Yaniv M Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression *EMBO J.* 2000; 19(9):2056-68.

Behrens A, Haigh J, Mechta-Grigoriou F, Nagy A, Yaniv M, Wagner, E F. Impaired intervertebral disc formation in the absence of Jun. *Development.* 2003; 130:103-9 The Company of Biologists Ltd doi; 10.1242/dev.00186.

Bornstein SR, Stratakis CA, Chrousos GP Adrenocortical tumors: recent advances in basic concepts and clinical management. *Ann Intern Med.* 1999; 130(9):759-71.

Bossy-Wetzel E, Bravo R, Hanahan D. Transcription factors junB and c-jun are selectively up-regulated and functionally implicated in fibrosarcoma development. *Genes Dev.* 1992; 6(12A):2340-51.

De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Bourcigaux N, Gaston V. High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000; 85(1):322-30.

Beuschlein F, Fassnacht M, Klink A, Allolio B, Reincke M ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation *Eur J Endocrinol.* 2001; 144(3):199-206.

Blagosklonny, M; Pardee, A The Restriction Point of the Cell Cycle. [*Cell Cycle* . 2002; 1:2, 103-10.

De Reyniès A, Assié G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, René-Corail F, Dousset B, Bertagna X, Clauser E, Bertherat J Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival *J Clin Oncol.* 2009; 27(7):1108-15.

Cobb MH, Goldsmith EJ. How MAP kinases are regulated. *J Biol Chem.* 1995 Jun 23;270(25):14843-6.

Cowan KJ¹, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003 Apr;206(Pt 7):1107-15.

Dubravka, D; Scott, D. W. Regulation of the G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Res.* 2000; 10:1-16.

Dubé C, Bergeron F, Vaillant M J, Robert NM, Brousseau C, Tremblay JJ. The nuclear receptors SF1 and LRH1 are expressed in endometrial cancer cells and regulate steroidogenic gene transcription by cooperating with AP-1 factors. *Cancer Letters.* 2009; 275:127–38.

Eferl R, Ricci R, Kenner L, Zenz R, David JP, Rath M, Wagner EF Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. *Cell.*2003; 112(2):181-92.

Eferl R, Wagner EF AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis *Nat Rev Cancer.* 2003; 3(11):859-68.

Eychène A, Rocques N, Pouponnot C A new MAFia in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2008; 8(9):683-93.

Fowler. T, Sen R, Roy AL. Regulation of Primary Response Genes. Published in final edited form as: *Mol Cell.* 2011 November 4; 44(3): 348–60. doi:10.1016/j.molcel.2011.09.014.

Folkman J Angiogenesis and c-Jun *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96(9):644.

Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkilä P, Jänne J, Voutilainen R Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002; 87(3):1170-6.

Gaujoux S, Tissier F, Groussin L, Libé R, Ragazzon B, Launay P, Audebourg A, Dousset B, Bertagna X, Bertherat J. Wnt/beta-catenin and 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate/protein kinase A signaling pathways alterations and somatic beta-catenin gene mutations in the progression of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008; 93(10):4135-40.

Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, Chrousos GP, Brennan MF, Stein CA, La Rocca RV. "Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis." *Cancer Res.* 1990; 50(17): 5488-96.

Gicquel C, Le Bouc Y, Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res.* 1997; 47(4-6):269-72.

Giordano TJ, Rork K, Tobias E. Molecular Classification and Prognostication of Adrenocortical Tumors by Transcriptome Profiling. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:668-76.

Giordano TJ, Classification of adrenal cortical tumors: promise of the 'molecular' approach. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010; 24(6):887-92.

Goldblum JR, Shannon R, Kaldjian EP, Thiny M, Davenport R, Thompson N, Lloyd RV. Immunohistochemical assessment of proliferative activity in adrenocortical neoplasms. *Mod Pathol.* 1993 Nov;6(6):663-8.

Hatada I, Mukai T. Genomic imprinting of p57^{KIP2}, a cyclin- dependent kinase inhibitor, in mouse. *Nature Publishing Group.* 1995; 11.

Hess J, Angel P, Schorpp-Kistner M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 2004; 117(Pt 25):5965-73.

Healy S, Protiti Khan, James R. Davie. Immediate early response genes and cell transformation. *Elsevier.* 2013;137 64-77.

Herschman, H.R. Primary Response Genes Induced by Growth Factors and Tumor Promoters. *Ann Rev Biochemi.* 1991; v.60, p.281-319.

Ilvesmäki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R. Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993; 77(3):852-8.

Ivanov VN, Bhoumik A, Krasilnikov M, Raz R, Owen-Schaub LB, Levy D, Horvath CM, Ronai Z Cooperation between STAT3 and c-jun suppresses Fas transcription *Mol Cell.* 2001; 7(3):517-28.

Junqueira L.C; Carneiro J. ,*Histologia Básica.*10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2004. 488 p.

Kimura E, Sonobe MH, Armelin MC, Armelin HA Induction of FOS and JUN proteins by adrenocorticotropin and phorbol ester but not by 3',5'-cyclic adenosine monophosphate derivatives *Mol Endocrinol.* 1993; 7(11):1463-71.

LeHoux JG, Lefebvre A. Novel protein kinase C-epsilon inhibits human CYP11B2 gene expression through ERK1/2 signalling pathway and JunB. *J Mol Endocrinol.* 2006; 36(1):51-64.

Leibovitz A, McCombs WM 3rd, Johnston D, McCoy CE, Stinson JC. "New human cancer cell culture lines. I. SW-13, small-cell carcinoma of the adrenal cortex." *J Natl Cancer Inst.* 1973; 51(2): 691-7.

Libè R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer.* 2007; 14(1):13-28.

Lin SR, Lee YJ, Tsai JH Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1994; 78(2):483-91.

Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Ilvesmäki V, Voutilainen R H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells *J Clin Endocrinol Metab.* 1995; 80(2):492-6.

Lotfi CF, Armelin HA cfos and cjun antisense oligonucleotides block mitogenesis triggered by fibroblast growth factor-2 and ACTH in mouse Y1 adrenocortical cells *J Endocrinol.* 2001; 168(3):381-9.

Lotfi CF, Armelin HA c-Fos protein is a mediator in mitogenic response to ACTH *Endocr Res.* 1998; 24(3-4):421-4.

Lotfi CF, Todorovic Z, Armelin HA, Schimmer BP Unmasking a growth-promoting effect of the adrenocorticotrophic hormone in Y1 mouse adrenocortical tumor cells *J Biol Chem.* 1997; 272(47):29886-91.

Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guillaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med.* 1990; 26;322(17):1195-201.

Mariani O, Brennetot C, Coindre JM, Gruel N, Ganem C, Delattre O, Stern MH, Aurias A JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas *Cancer Cell.* 2007; 11(4):361-74.

Mathas S, Hinz M, Anagnostopoulos I, Krappmann D, Lietz A, Jundt F, Bommert K, Mehta-Grigoriou F, Stein H, Dörken B, Scheidereit C. Aberrantly expressed c-Jun and JunB are a hallmark of Hodgkin lymphoma cells, stimulate proliferation and synergize with NF-kappa B. *EMBO J.* 2002; 21(15):4104-13.

Matthews CP, Colburn NH, Young MR AP-1 a target for cancer prevention *Curr Cancer ;Drug Targets.* 2007; 7(4):317-24.

Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, Madureira G, Domenice S, Albergaria MA, Camargo MH, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol.* 1995;154(6):2004-9.

McNicol, A. M. The Human Adrenal Gland: Aspects of Structure, Function, and Pathology. The Adrenal Gland. V. H. T. James. New York, Raven Press. 1992;1-42.

Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. European Journal of Cancer. 2005; 41;2449–461.

Mukai K, Mitani F, Shimada H, Ishimura Y Involvement of an AP-1 complex in zone-specific expression of the CYP11B1 gene in the rat adrenal cortex Mol Cell Biol. 1995; 15(11):6003-12.

Mukai K, Mitani F, Agake R, Ishimura Y Adrenocorticotrophic hormone stimulates CYP11B1 gene transcription through a mechanism involving AP-1 factors Eur J Biochem. 1998; 256(1):190-200.

Nateri AS, Spencer-Dene B, Behrens A. Interaction of phosphorylated c-Jun with TCF4 regulates intestinal cancer development. Nature. 2005; 437(7056):281-5.

Nishizawa M, kataoka K, Gotot N, Fujiwara K T, kawai S . V-maf, a viral oncogene that encodes a "leucine zipper" motif Proc. Nati. Acad. Sci. 1989; Vol. 86, pp. 7711-15.

Ohgaki H, Furukawa F, Takahashi M, Kleihues P. K-ras mutations are frequent in pulmonary squamous cell carcinomas but not in adenocarcinomas of WBN/Kob rats induced by N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine. Carcinogenesis. 1993; 14(7):1471-3.

Pardee, A.B.A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc.Natl. Acad Sci. 1973; v.71,n.4,p.1286-90.

Passegué E, Jochum W, Behrens A, Ricci R, Wagner EF. JunB can substitute for Jun in mouse development and cell proliferation Nat Genet. 2002; 30(2):158-66.

Passegué E, Jochum W, Schorpp-Kistner M, Möhle-Steinlein U, Wagner EF Chronic myeloid leukemia with increased granulocyte progenitors in mice lacking junB expression in the myeloid lineage Cell.2001; 104(1):21-32.

Passegué E, Wagner EF JunB suppresses cell proliferation by transcriptional activation of p16(INK4a) expression EMBO J. 2000; 19(12):2969-79.

Rassidakis GZ, Thomaidis A, Atwell C, Ford R, Jones D, Claret FX, Medeiros LJ JunB expression is a common feature of CD30+ lymphomas and lymphomatoid papulosis Mod Pathol. 2005; 18(10):1365-70.

Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, Chrousos GP. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. J Clin Endocrinol Metab.1994; 78(3):790-4.

Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, DeLacerda L, Rabin M, Cadwell C, Sampaio G, Cat I, Stratakis CA,

Sandrini R. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994; 98(16):9330-5.

Rincon Garriz JM, Suarez C, Capponi AM c-Fos mediates angiotensin II-induced aldosterone production and protein synthesis in bovine adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology*. 2009; 150(3):1294-302.

Rubbi CP, Milner J. p53 is a chromatin accessibility factor for nucleotide excision repair of DNA damage *EMBO J*. 2003; 22(4):975-86.

Sancho R, Nateri AS, de Vinuesa AG, Aguilera C, Nye E, Spencer-Dene B, Behrens A. JNK signalling modulates intestinal homeostasis and tumourigenesis in mice. *EMBO J*. 2009; 8; 28(13):1843-54.

Seeger R, Krebs EG. The MAPK signaling cascade. *FASEB J*. 1995 Jun; 9(9):726-35.

Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, Magarey CJ, Russell CF, Schulte KM, Röher HD, Delbridge L, Robinson BG. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002; 87(7):3467-74.

Simpson ER, Waterman MR. Regulation of the synthesis of steroidogenic enzymes in adrenal cortical cells by ACTH. *Annu Rev Physiol*. 1988; 50:427-40.

Shaulian E AP-1--The Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors in disguise? *Cell Signal*. 2010; 22(6):894-9.

Shaulian E, Karin M AP-1 as a regulator of cell life and death *Nat Cell Biol*. 2002; 4(5):E131-6.

Shaulian E, Karin M AP-1 in cell proliferation and survival *Oncogene*. 2001; 20(19):2390-400.

Shea-Eaton W, Sandhoff TW, Lopez D, Hales DB, McLean MP Transcriptional repression of the rat steroidogenic acute regulatory (StAR) protein gene by the AP-1 family member c-Fos. *Mol Cell Endocrinol*. 2002; 188(1-2):161-70.

Sherr, C.J. G1 phase progression: cycling on cue. *Cell*. 1994; v.79, n.4, p.551-5.

Sherr, C.J and Roberts, M.J. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-Phase. *Genes Dev*. 1999 13: 1501-12.

Simon, D.P. Hammer, G.D . Adrenocortical stem and progenitor cells: Implications for adrenocortical carcinoma. *Mol Cell Endocrinol*. 2012; 351; 2–11.

Simpson, E.M. Lauber, et al. "Regulation of expression of the genes encoding steroidogenic enzymes in the ovary." *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1992; 41(3-8): 409-13.

Sreeramaneni R, Chaudhry A, McMahon M, Sherr CJ, Inoue K. Ras-Raf-Arf signaling critically depends on the Dmp1 transcription factor. *Mol Cell Biol.* 2005; 25(1):220-32.

Steidl U, Rosenbauer F, Verhaak RG, Gu X, Ebralidze A, Otu HH, Klippel S, Steidl C, Bruns I, Costa DB, Wagner K, Aivado M, Kobbe G, Valk PJ, Passegué E, Libermann TA, Delwel R, Tenen DG. Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells *Nat Genet.* 2006; 38(11):1269-77.

Stojadinovic A, Brennan MF, Hoos A, Omeroglu A, Leung DH, Dudas ME, Nissan A, Cordon-Cardo C, Ghossein RA. Adrenocortical adenoma and carcinoma: histopathological and molecular comparative analysis. *Mod Pathol.* 2003; 16(8):742-51.

Swaroop A, Xu J, Pawar H, Jackson A, Skolnick C, Agarwal N. A conserved retina-specific gene encodes a basic motif/leucine zipper domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1992; 89: 266-70.

Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G,; Hagneré AM, René-Corail F, Jullian E, Gicquel C, Bertagna X, Vacher-Lavenu MC, Perret C, Bertherat J. Mutations of beta-catenin in adrenocortical tumors: activation of the Wnt signaling pathway is a frequent event in both benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2005; 65(17):7622-7.

Tissier F, Classification of adrenal cortical tumors: what limits for the pathological approach? *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(6):877-85. Review.

Torres TE, Lotfi CF Distribution of cells expressing Jun and Fos proteins and synthesizing DNA in the adrenal cortex of hypophysectomized rats: regulation by ACTH and FGF2. *Cell Tissue Res.* 2007; 329(3):443-55.

Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands *Eur J Endocrinol.* 1997; 136(3):296-303.

Weiss M, Ford VL. Differences in steroidogenesis by the subcellular fractions of adrenocortical special zone and cortex proper of the female possum (*Trichosurus vulpecula*). *J Steroid Biochem.* 1984; 21(6):701-7.

Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL Jr Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma *Am J Surg Pathol.* 1989; 13(3):202-6.

Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol.* 2003; 27(7):867-81.

White A¹, Gibson S. ACTH precursors: biological significance and clinical relevance. *Clin Endocrinol.* 1998 Mar;48(3):251-5.

Zhou H, Gao J, Lu ZY, Lu L, Dai W, Xu M Role of c-Fos/JunD in protecting stress-induced cell death *Cell Prolif.* 2007; 40(3):431-44.