

Bárbara dos Santos Passaia

**Identificação de novos alvos do fator de transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de tumores humanos**

**Versão Parcial**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia de Sistemas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Biologia Morfofuncional

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini Pacicco Lotfi

São Paulo

2020

## RESUMO

Passaia BP. Identificação de novos alvos do fator de transcrição POD1/TCF21 em culturas de células de tumores humanos. [Tese (Doutorado em Ciências)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

O fator esteroideogênico 1 (SF1/NR5A1) e o receptor homólogo de fígado (LRH1/NR5A2) são fatores de transcrição importantes na regulação da esteroideogênese, nas adrenais e nas gônadas, respectivamente. SF1/NR5A1 e LRH1/NR5A2 podem ser regulados por vários fatores, dentre eles o fator de transcrição do tipo bHLH, TCF21. TCF21 é capaz de inibir a expressão endógena de SF1/NR5A1 e das enzimas esteroideogênicas através da ligação no sítio E-box do promotor de SF1/NR5A1 de culturas de células de carcinomas adrenocorticais humanos e culturas normais de adrenais de rato. No entanto, em células de hepatocarcinomas, TCF21 promove o aumento da expressão gênica de LRH1/NR5A2 através da ligação na região promotora de SHP, um regulador negativo de LRH1. TCF21 está menos expresso em tumores carcinomas adrenocorticais do que em adenomas. Além disso, a expressão combinada dos genes TCF21-BUB1B e TCF21-SF1 tem valor de prognóstico, respectivamente, em tumores adrenocorticais de pacientes adultos e pediátricos. Em conjunto, esses dados sugerem que TCF21 pode ter um amplo papel como regulador da transcrição em células tumorais. Nesse estudo tivemos como hipótese que a identificação de outros alvos controlados por TCF21 poderiam contribuir no entendimento do seu papel e importância nas células tumorais. Foi utilizado o método de ChIP-Seq para identificação de prováveis 70 sequências-alvo de TCF21 em células modificadas para superexpressar TCF21 em linhagem de células de carcinoma adrenocortical, células H295R pCMV/MycTCF21. As cinco sequências mais frequentes identificadas foram as dos genes PRDM7, CNTNAP2, CACNA1B, PTPRN2 e KCNE1B. Resultados para validação por qRT-PCR mostraram que TCF21 regula positivamente a expressão de PRDM7 e CNTNAP2 e negativamente a expressão de CACNA1B. Em carcinomas adultos e pediátricos a expressão de CACNA1B, que codifica para o canal de cálcio Ca v2.2, está mais elevada em comparação aos adenomas. No entanto, esse aumento não está relacionado com a sobrevida geral em tumores adultos. Além disso, o bloqueio seletivo de Ca v2.2 em células H295R e em células de carcinoma adrenocortical adulto, ACC-T227, não alterou a viabilidade celular. A falta de relação com sobrevida geral e a manutenção da viabilidade celular após bloqueio de Ca v2.2 sugere que pode haver um efeito ainda não detectado do controle de TCF21 sobre Ca v2.2 e canais de cálcio em tumores adrenocorticais. A análise da relação dos alvos de TCF21 observadas nas amostras de hepatocarcinoma de pacientes, utilizando os dados do The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) e validação em células HepG2, mostraram que TCF21 diminui a expressão gênica de ATP10A e aumenta a expressão de PTPRN2 in vitro. Nossos resultados sugerem que a expressão de CACNA1B / canal Ca v2.2 pode ter valor diferencial e ser importante na tumorigênese adrenocortical em pacientes adultos e pediátricos, mas novas abordagens e estudos são necessários.

Palavras-chave: TCF21. Córtex adrenal. Tumor adrenocortical. ChIP-Seq. CACNA1B.

## ABSTRACT

Passaia BP. Identification of new targets for the POD1 / TCF21 transcription factor in human tumor cell cultures. [Thesis (Doctorate in Sciences)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2020.

Steroidogenic factor 1 (SF1/NR5A1) and homologous liver receptor (LRH1/ NR5A2) are important transcription factors in the regulation of steroidogenesis, adrenals and gonads, respectively. SF1/NR5A1 and LRH1/NR5A2 can be regulated by some factors, among them is the bHLH type transcription factor, TCF21. TCF21 is able to inhibit the endogenous expression of SF1/NR5A1 and steroidogenic enzymes by binding to the E-box site of the SF1/NR5A1 promoter from human adrenocortical carcinoma cell cultures and normal rat adrenal cultures. However, in hepatocarcinoma cells TCF21 promotes increased LRH1 / NR5A2 gene expression by binding to the SHP promoter region, a negative regulator of LRH1. TCF21 is less expressed in adrenocortical carcinoma tumors than in adenomas. In addition, the combined gene expression of TCF21-BUB1B and TCF21-SF1 have prognostic value in adrenocortical tumors of adult and pediatric patients, respectively. Taken together, these data suggest that TCF21 may have a comprehensive role as a regulator of transcription in tumor cells. In this study, we hypothesized that the identification of other targets controlled by TCF21 could contribute to the understanding of their role and importance in tumor cells. The ChIP-Seq method was used to identify 70 target sequences of TCF21 in cells modified to overexpress TCF21 in adrenocortical carcinoma cell line, H295R pCMVMycTCF21 cells. The five most frequent sequences identified were PRDM7, CNTNAP2, CACNA1B, PTPRN2 and KCNE1B genes. Results for qRT-PCR validation showed that TCF21 regulates positively the PRDM7 and CNTNAP2 expression and negatively the CACNA1B expression. In adult and pediatric patients, CACNA1B expression, which codes for the calcium channel Ca v2.2, is higher in carcinomas than in adenomas. However, this increase is not related to overall survival in adult tumors. In addition, selective Ca v2.2 blocking in H295R cells and adult adrenocortical carcinoma cells, ACC-T227, did not alter cell viability. The lack of relationship with overall survival and maintenance of cell viability after Ca v2.2 block suggests that there may be an undetected effect of TCF21 control on Ca v2.2 in adrenocortical tumors. Analysis of the relationship of TCF21 targets observed in hepatocarcinoma samples from patients, using data from The Cancer Genome Atlas Program (TCGA) and validation in HepG2 cells, showed that TCF21 decreases ATP10A gene expression and increases PTPRN2 gene expression in vitro. Our results suggest that the expression of CACNA1B / Ca v2.2 channel may have a differential value and be important in adrenocortical tumorigenesis in adult and pediatric patients, but new approaches and studies are needed.

Keywords: TCF21. Adrenal cortex. Adrenocortical tumor. ChIP-Seq. CACNA1B.

## **1. Introdução**

## 1.1 Glândula Suprarrenal

A glândula suprarrenal humana está localizada no polo superior de cada rim, posterior ao peritônio (Figura 1A). O suprimento sanguíneo é feito pelas artérias suprarrenais superior, média e inferior que podem ter dupla ou até múltiplas ramificações. A drenagem de cada glândula ocorre através da veia suprarrenal. A glândula direita tem forma piramidal e a esquerda possui formato semilunar. Em adultos, as suprarrenais têm entre 3 a 5 cm e entre 3.5 e 5 g (Standring, 2010).

A suprarrenal é constituída por uma cápsula que envolve o córtex e medula, que possuem origens embriológicas distintas (Figura 1B). A medula é o tecido mais interno, responsável pela secreção de catecolaminas. O córtex adrenal compõe a maior parte do órgão e está externo à medula e justaposto à cápsula adrenal. O córtex possui coloração amarelada devido a presença de lipídeos e é composto por zonas concêntricas com características morfológicas distintas. Essas zonas são a zona glomerulosa, mais externa, a zona fasciculada e a zona reticular, mais interna (Figura 1C).

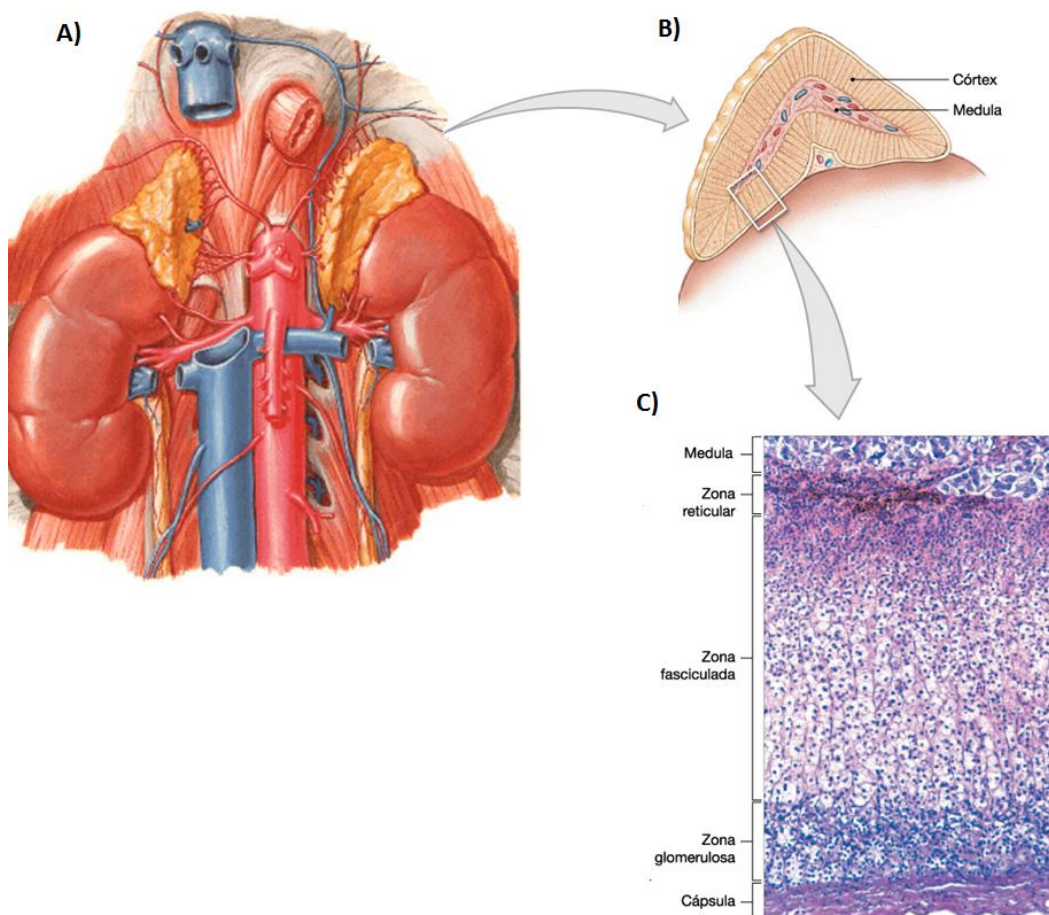
A zona glomerulosa corresponde a cerca de 15% do volume do córtex e produz mineralocorticoides, como a aldosterona, responsável pela regulação da composição dos eletrólitos dos líquidos corporais. A secreção de aldosterona é estimulada pela alteração dos níveis de sódio ou potássio na corrente sanguínea e também pela liberação da Angiotensina II (Guyton, 2011).

A zona fasciculada compõe cerca de 78% do volume do córtex da suprarrenal. Suas células são maiores, com mais lipídeos e formam cordões separados por vasos achatados e de paredes fenestradas. Essa zona produz glicocorticóides, como o cortisol, responsáveis pelo metabolismo da glicose e síntese de glicogênio, principalmente no fígado. A produção de glicocorticoides pela zona fasciculada é regulada pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (eixo HPA), em resposta a estímulos fisiológicos e externos. Após esses estímulos, há a produção e liberação pelo hipotálamo do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e de vasopressina no sistema porta hipofisário. O CRH estimula a adenohipófise a liberar na circulação sanguínea o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH). O ACTH se liga ao receptor de melanocortina 2 (MC2R), localizado nas células adrenocorticais, que desencadeia a sinalização para a produção do cortisol. A regulação do eixo HPA ocorre por retroalimentação negativa, ou seja, o aumento da concentração de glicocorticóides no

plasma sinaliza para a inibição da produção de CRH e ACTH, respectivamente no hipotálamo e hipófise (Guyton, 2011).

A zona reticular, adjacente a medula adrenal, possui células menores e rico suprimento vascular, tornando-a facilmente distinguível em uma análise histológica. A zona reticular é responsável pela síntese de hormônios andrógenos, como a testosterona. No entanto, o conhecimento sobre a regulação e liberação dos hormônios andrógenos pela zona reticular é ainda limitado. Algumas evidências mostram a ação do ACTH, da gonadotrofina coriônica humana (hCG) e do hormônio luteinizante (LH) na produção de andrógenos por essa zona (Rao, 2010).

**Figura 1-** A glândula suprarrenal humana. A) glândulas suprarrenais localizadas no polo superior de cada rim. B) Desenho de secção longitudinal da glândula suprarrenal com a localização do córtex e da medula adrenal. C) Secção da glândula suprarrenal, que localiza a medula, mais interna, e as zonas que formam o córtex adrenal (zona reticular, zona fasciculada e zona glomerulosa) e a cápsula, mais externa.



Fonte: Adaptada de Netter, 2018 e Martini, 2009.

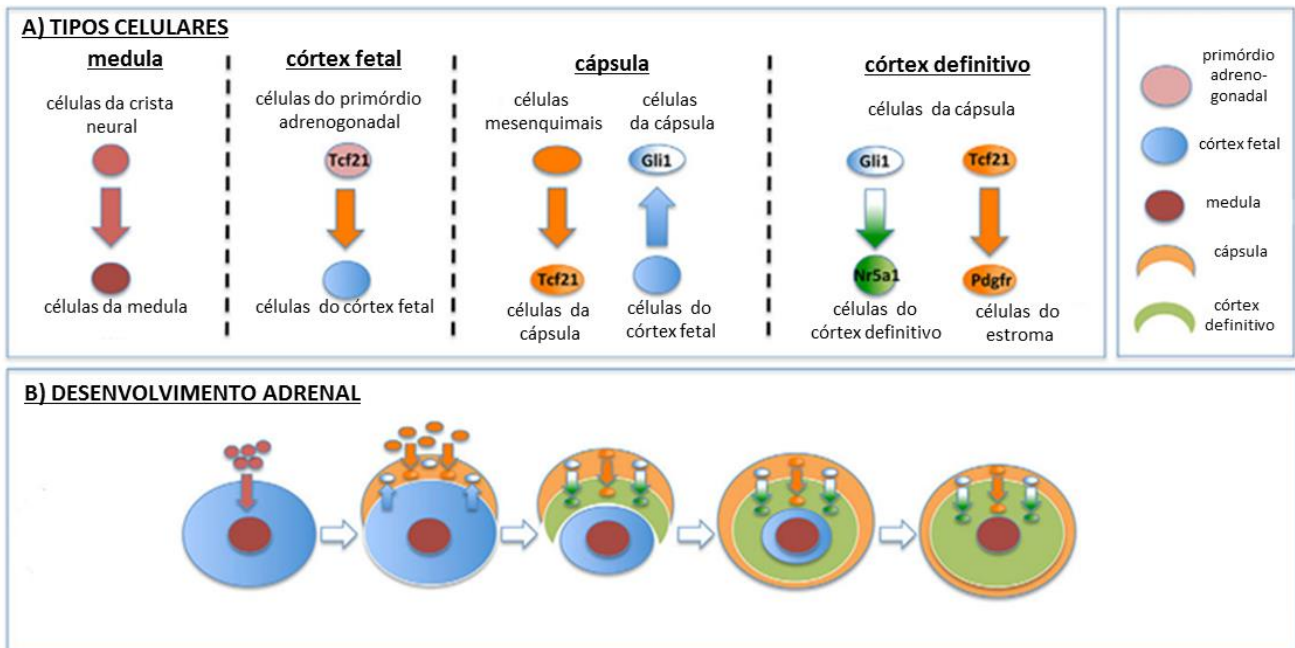
## 1.2 Desenvolvimento embrionário do córtex suprarrenal

O desenvolvimento embrionário e pós-natal do córtex da glândula suprarrenal é complexo e pouco compreendido até recentemente. Do ponto de vista histológico, aproximadamente até o 1º ano de vida persiste uma zona fetal no córtex e somente depois dessa idade o córtex adrenal é semelhante à do adulto (Seron-Ferre & Jaffe, 1981). Funcionalmente, a diferenciação terminal da zona reticular ocorre por volta do 12º ano de vida. Em camundongos machos, a zona fetal regride após a puberdade e nas fêmeas após a primeira gestação (Holmes & Dickson 1971).

Em 2013, Wood e colaboradores descreveram que durante o desenvolvimento do córtex adrenal de camundongos, um subgrupo de células da cápsula do córtex é originado de células adrenocorticais fetais que expressam *GLI Family Zinc Finger 1* (Gli1). Gli1 é um marcador de células progenitoras adrenocorticais responsáveis pela manutenção e renovação do córtex adrenal do adulto. Há também outro subgrupo de células na cápsula adrenal que são descendentes de células que expressam o Fator de Transcrição 21 (Tcf21) no primórdio adrenogonadal. As células que expressam Tcf21 migram em direção centrípeta e dão origem a células do estroma. As células do estroma são células não-esteroidogênicas e não expressam o Fator esteroideogênico 1 (Sf1/Nr5a1), pois tem origem em células Tcf21 positivas, fator que regula negativamente Sf1 (Kim et al., 2013). Portanto, como no esquema da Figura 2, a glândula adrenal adulta é formada por células de diferentes origens. Entretanto, Bandiera e colaboradores (2013) identificaram células progenitoras que persistem na cápsula adrenal caracterizadas pela expressão de Tcf21, *Wilms' tumor 1* (Wt1), Gli1 e *GATA Binding Protein 4* (GATA4), que são capazes de dar origem a células esteroideogênicas, e que, portanto, expressam Sf-1, o que contrasta com os achados de Wood et al. (2013). Nesse trabalho, foi demonstrado que Tcf21 e Gli1 são alvos diretos de Wt1 e que durante o processo de diferenciação das células esteroideogênicas adrenais, Wt1, aumenta a expressão de Tcf21.

**Figura 2** – Tipos celulares do desenvolvimento da glândula adrenal. A) células da crista neural formam a medula adrenal (vermelho). As células de origem mesenquimal que expressam Tcf21 no primórdio adrenogonadal compõem um subgrupo de células que participarão da formação da cápsula adrenal (laranja). A cápsula também expressa Gli1 e que tem origem das células fetais (azul). As células que expressam Gli1 darão origem as células esteroideogênicas que expressam Sf1/Nr5a1 (verde). As células da cápsula que expressam Tcf21 darão origem a células do estroma que expressam Platelet-derived growth factor receptor (Pdgfr) e formarão o córtex definitivo. B) As diferentes etapas do desenvolvimento da

glândula adrenal. Gli1:GLI Family Zinc Finger 1; Tcf21: Fator de Transcrição 21; Nr5a1: Fator esteroideogênico 1 (Sf1).



Fonte: Adaptada de Wood et al., 2013.

### 1.3 TCF21 e sua função no desenvolvimento embrionário

TCF21 (*transcriptor factor 21/POD-1/capsulin/epicardin*) é um fator de transcrição do tipo helix-loop-helix, classe B (bHLH) expresso especificamente em células derivadas do mesoderma que rodeiam o epitélio em desenvolvimento dos sistemas gastrointestinal, geniturinário e respiratório (Quaggin et al., 1998; 1999; Lu et al., 1998; 2000, Robb et al., 1998).

As proteínas bHLH formam homodímeros e heterodímeros através do domínio helix-loop-helix e reconhecem a sequência E-box CANNTG nos promotores de genes por eles regulados (Massari & Murre, 2000). O gene *TCF21* em humanos está localizado no cromossomo 6q23.2, que codifica uma proteína com 179 aminoácidos e 19kDa (GeneCards® Human Gene Database). A sequência de nucleotídeos de *TCF21* humano possui 1251 bp e a região codificante é composta por 537 bp. Enquanto a sequência total de aminoácidos de TCF21 humano e murino é 95% idêntica, a sequência do domínio bHLH é 100% idêntica entre as duas espécies. A expressão de TCF21 em órgãos humanos mostrou que ele está expresso no pâncreas e altamente expresso na placenta, coração, pulmão e rins. No entanto, a expressão é ainda maior nos rins em desenvolvimento, o que sugere sua importância na



organogênese renal. A expressão de TCF21 analisada em órgãos de camundongos apresentaram um padrão similar ao de humanos (Quaggin et al., 1998).

Em embriões de camundongos foi observado, por hibridização *in situ*, que Tcf21 está expresso durante o desenvolvimento dos rins, pâncreas, coração, pulmão, intestino e glândula suprarrenal. O estudo de Tcf21/Pod-1 no desenvolvimento renal de camundongos mostrou que Tcf21 está expresso nos metanefros de camundongos desde 13.5 dias após o coito (dpc), aumenta gradativamente até 16.5 dpc. Após 16.5 dpc a expressão de Tcf21 diminui na maioria dos órgãos, com exceção dos rins e dos pulmões (Quaggin et al., 1998). Em um estudo desenvolvido por Lu e colaboradores (1998) foi analisado o padrão de expressão de Tcf21 em embriões de camundongos a partir de 8.5 dpc. Nesse estudo, Tcf21 apresentou um padrão de expressão em células mesenquimais que circundam o epitélio de diversos órgãos, e foi denominado capsulina. Outro estudo realizado por Rob e colaboradores (1998) observou que Tcf21 estava expresso na bexiga, ovário, útero e testículos de camundongos adultos.

Para confirmar a importância de Tcf21 no desenvolvimento embrionário, Quaggin e colaboradores (1999) geraram camundongos Tcf21 *knockout* através de um construto LacZ inserido na região do códon iniciador do domínio bHLH do gene Tcf21. Os camundongos nasceram vivos, sem defeitos aparentes ou alteração do peso corporal, no entanto tiveram pouco tempo de vida. A análise dos rins e pulmões mostrou que esses órgãos não atingiram o desenvolvimento completo, pois não houve a formação dos alvéolos pulmonares, o que justifica a morte após o nascimento. Portanto, Tcf21 é essencial para a diferenciação dos pulmões, dos podócitos e glomérulos, e fundamental para a morfogênese dos pulmões e rins. A análise do coração desses animais não mostrou alterações nesse órgão durante o desenvolvimento (Lu et al., 2000), no entanto observaram que os animais não possuíam baço, o que sugere que Tcf21 pode ser fundamental para organogênese desse órgão.

Durante o desenvolvimento das gônadas de camundongos (13.5 dpc), Tcf21 está mais expresso nos testículos do que nos ovários, mas em menos de um mês após o nascimento o padrão de expressão de Tcf21 se inverte: é reduzida nos testículos e aumentada nos ovários, e se mantém até 3 meses de idade (Tamura et al., 2001). Portanto, na gonadogênese Tcf21 tem padrão de expressão dependente do sexo e do estágio de desenvolvimento do órgão.

Experimentos em células de Leydig, linhagem I-10, aonde Tcf21 foi superexpresso, foi detectada a diminuição da expressão do gene que expressa o fator esteroideogênico 1, Sf-1/Nr5a1 (Tamura et al., 2001). SF1 está expresso em células esteroideogênicas e regula a expressão das enzimas esteroideogênicas responsáveis pela produção de esteróides (Morohashi et al., 1993). Também está expresso nas três zonas do córtex adrenal, nas células de Leydig e de Sertoli, nas células da granulosa e da teca no ovário (Honda et al., 1993; Ikeda et al., 1993; Morohashi et al., 1994). Em camundongos e em humanos, Sf1 é expresso desde o primórdio adrenogonadal, nas gônadas e adrenais em desenvolvimento e permanece expresso no córtex adrenal adulto (Hanley et al., 2001; Val et al., 2003). Além de seu papel na regulação das enzimas esteroideogênicas, SF1 pode ter um papel na proliferação de células adrenocorticais (Morohashi et al., 1994). Em 1995, Sadovsky e colaboradores observaram a ausência de gônadas e adrenais em camundongos silenciados para Sf1/Nr5a1. Apesar desses animais se desenvolverem normalmente durante a gestação, com níveis de corticosterona e ACTH normais em comparação com os animais controle, os camundongos deficientes para Sf1/Nr5a1 morreram logo após o nascimento e apresentaram níveis baixos de corticosterona e altos níveis de ACTH. A ausência de adrenais e gônadas evidencia a importância de Sf1/Nr5a1 para o desenvolvimento desses órgãos (Sadovsky et al., 1995).

Por sua vez, camundongos *knockout* para Tcf21 apresentaram as genitálias femininas e masculinas indistinguíveis no neonato. Apresentam os ovários com dimensões adequadas, mas com diferentes localizações anatômicas e com o ovário esquerdo unido à glândula adrenal. Nos machos, os testículos são menores, com formato irregular e também unidos à glândula adrenal, no entanto a diferenciação das células de Sertoli ocorre normalmente (Cui et al., 2004). Esse desenvolvimento anômalo das gônadas ocorre devido à expressão ectópica de Sf1, o que causa desregulação do processo de diferenciação de células esteroideogênicas (Cui et al., 2004). Em conjunto essas observações mostram que a expressão de Tcf21 é fundamental para o desenvolvimento normal das gônadas e da glândula adrenal de mamíferos. Além do seu papel no desenvolvimento de vários órgãos, atualmente, vários estudos mostram que Tcf21 pode ter um papel importante no processo tumorigênico de vários tecidos incluindo do córtex da glândula suprarrenal (revisado por Jiang & Yang, 2018).

#### **1.4 Tumores adrenocorticais**

Tumores benignos do córtex da suprarrenal, os adenomas adrenocorticais (ACA), são neoplasias comuns em adultos cuja incidência aumenta com a idade, atingindo aproximadamente 3% dos indivíduos acima de 50 anos. Por outro lado, o carcinoma adrenocortical (ACC) é uma neoplasia rara que acomete mais as mulheres do que os homens (Aufforth & Nilubol, 2014). Os adenomas adrenocorticais adultos podem ser funcionantes ou não, e são tumores homogêneos e bem delimitados. Carcinomas adrenocorticais adultos são heterogêneos, geralmente não-funcionais, agressivos, com alto índice de recidivas locais e podem ocasionar metástases preferencialmente nos pulmões, mas também no sistema nervoso central, fígado e mamas (Torti & Correa, 2020).

Tumores adrenocorticais (ACTs) pediátricos apresentam um melhor prognóstico em relação aos tumores de adultos, principalmente se diagnosticados precocemente. O diagnóstico precoce ocorre na maioria das vezes porque crianças que desenvolvem carcinomas adrenocorticais apresentam aumento da produção de hormônios andrógenos, e evidências clínicas que facilitam o diagnóstico (Michalkiewicz et al., 2004).

Devido a uma mutação germinativa (R337H) no gene supressor de tumor TP53 na maioria dos tumores adrenocorticais pediátricos de pacientes brasileiros, a incidência desses tumores é cerca de 10 vezes superior no Brasil do que no restante do mundo (Latronico et al., 2001; Ribeiro et al., 2001). O gene TP53 é reconhecidamente importante para o desenvolvimento de cânceres quando está mutado (Leroy et al., 2014). A mutação germinativa R337H, definida pela substituição do aminoácido arginina pelo aminoácido histidina, e que está relacionada ao aumento de incidência de ACC infantil na população brasileira, não aumenta a incidência de outros tipos de tumores nesses pacientes. Provavelmente a mutação R337H torna a proteína p53 parcialmente funcional e pH dependente, e é relevante apenas para a incidência de tumores na faixa pediátrica (DiGiammarino et al., 2002; Libe et al., 2007; Pinto et al., 2015).

Em pacientes adultos, o diagnóstico é feito através da análise de nove critérios histológicos e patológicos chamados *score* de Weiss (Weiss, 1984). Em 2002, Aubert e colaboradores revisaram os critérios, entretanto o sistema com os nove parâmetros ainda é mais usado para o diagnóstico de ACTs. Assim, o tumor é considerado um carcinoma quando possui três ou mais dos seguintes critérios: elevada taxa mitótica,

presença de mitoses atípicas, necrose, grau nuclear III ou IV, arquitetura difusa, células claras constituindo 25% ou menos do tumor, invasão de estruturas venosas, invasão sinusoidal e invasão da cápsula tumoral. De acordo com a rede europeia de estudo dos tumores adrenais [*European Network for the Study of Adrenal Tumors*, (ENSAT)], os tumores adrenocorticais podem ser classificados em quatro estágios, conforme descrito na Tabela 1 (Gaujoux et al., 2017).

**Tabela 1** – Estágios da evolução de carcinomas adrenocorticais\*

Estadiamento	Tamanho	Restrito a cápsula	Invasão de linfonodos	Metástase
Estágio I	< 5 cm	sim	não	não
Estágio II	> 5 cm	sim	não	não
Estágio III	sem definição	sim ou não	sim ou não	não
Estágio IV	sem definição	restrito ou não	invasão ou não	sim

\*de acordo com *European Network for the Study of Adrenal Tumors* (ENSAT)

A Sociedade Europeia de Endocrinologia (ESE) e o ENSAT recomendam que, para confirmação de casos de carcinomas adrenocorticais, são necessárias: 1) a determinação do score de Weiss, com especificação da taxa mitótica; 2) a porcentagem de células Ki-67-positivas, que é um marcador de proliferação em tumores; 3) o estadiamento do tumor, conforme mostrado na Tabela 1; e 4) a condição, total ou parcial, da ressecção do tumor. Para a distinção de tumores adrenocorticais primários e tumores não adrenocorticais é recomendado que seja analisada a expressão de SF1 por imunoistoquímica (Fassnacht et al., 2018).

A abordagem inicial para tratamento dos carcinomas adrenocorticais é a completa ressecção cirúrgica do tumor, entretanto muitos pacientes apresentam recidivas e metástases. O tratamento é realizado com o agente adrenolítico e citotóxico mitotano, um derivado do inseticida diclorodifeniltricloroetano (DDT), que apresenta efeitos colaterais neurológicos e gastrointestinais. Assim, sua administração é recomendada apenas para pacientes com risco de recorrência (Aufforth & Nilubol, 2014; Fassnacht et al., 2018).

Nos últimos anos, alguns estudos genômicos de larga escala foram realizados para compreender as alterações que ocorrem em ACCs e ACAs (Fonseca et al., 2012; Assié et al., 2014). Foram analisados os níveis de metilação e identificadas 212 ilhas CpG hipermetiladas em carcinomas. A expressão gênica desses fatores foi avaliada em 6 adrenais normais, 10 adenomas e 6 carcinomas e foi observado que os genes *Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A (CDKN2A)*, *GATA Binding Protein 4 (GATA4)*, *Cilia And Flagella Associated Protein (DLEC1)*, *Histone Deacetylase 10 (HDAC10)*, *PYD And CARD Domain Containing (PYCARD)*, *Secretoglobin Family 3A Member 1 (SCGB3A1/HIN1)* tinham expressão reduzida em comparação aos tecidos normais (Fonseca et al., 2012). Também foram analisados 122 ACCs que foram separados em dois grupos com diferentes prognósticos, de maneira que o subgrupo com pior prognóstico tinha mais regiões metiladas no DNA e mutações nos genes *Zinc And Ring Finger 3 (ZNR3)*, *Catenin Beta 1 (CTNNB1)* e *TP53* (Assié et al., 2014).

Estudo do nosso grupo identificou, através de análise por qPCR, que *TCF21* tem expressão diferencial em tumores adrenocorticais adultos e sua expressão é fator de prognóstico, capaz de separar pacientes com carcinomas em dois subgrupos: um com pior e outro com melhor sobrevida geral (Passaia et al., 2018). Além disso, sugerimos que *TCF21* pode ser considerado um supressor tumoral em tumores adrenocorticais, em acordo com o que ocorre com outros tumores (Jiang & Yang, 2018).

### **1.5 TCF21 em tumores adrenocorticais**

*TCF21* está pouco expresso em carcinomas de pulmão, cabeça e pescoço, em melanomas, em câncer renal e em hepatocarcinomas (Tessema & Belinsky, 2008; Arab et al., 2011; Gooskens et al., 2018; Lu et al., 2018). Em câncer de cabeça e pescoço, em câncer de pulmão de células não pequenas e em melanomas metastáticos, *TCF21* está epigeneticamente silenciado (Smith et al., 2006; Arab et al., 2011). Em tumores adrenocorticais, a análise da expressão de *TCF21* em amostras de carcinoma, adenoma e tecido adrenocortical normal humano detectou que *TCF21* foi duas vezes menos expresso em carcinomas do que em adenomas e quatro vezes menos expresso quando comparado às amostras de tecido adrenal normal (Giordano et al., 2009; França et al., 2013). Em França e colaboradores (2013) mostramos que *TCF21* se liga ao sítio E-box do promotor de *SF1* promovendo a inibição de *SF1* e do gene *StAR* em células de carcinomas adrenocorticais humanos, o mesmo ocorre em células normais de adrenal de rato (França et al., 2015). Em células adrenocorticais,

H295R, SF1 está relacionado com o aumento da capacidade proliferativa e com desenvolvimento de hiperplasia e neoplasia em camundongos com elevada expressão de SF1 (Doghman et al., 2007). Além disso, utilizando a base de dados *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Pathways* (KEGG) foram identificadas três vias correlacionadas negativamente com a expressão de *TCF21*: ciclo celular, biossíntese de glicosaminoglicanos/heparan sulfato e controle de qualidade do mRNA. Dentre os genes do ciclo celular estão os genes *cyclin B2* (*CCNB2*), *cyclin dependent kinase 1* (*CDK1*), *tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein theta/14-3-3 protein theta* (*YWHAQ*), *checkpoint kinase 2* (*CHEK2*), *origin recognition complex subunit 2* (*ORC2*), *transcription fator E2F2* (*E2F2*), *S-phase kinase associated protein 2* (*SKP2*), *cyclin A2* (*CCNA2*) e *budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1* (*BUB1B*).

A análise de *TCF21* em células de linhagem de hepatocarcinoma, células HepG2, mostrou que *TCF21* não se liga ao receptor nuclear Receptor Homólogo de Fígado (*LRH1/NR5A2*), que também é membro da família de receptores nucleares da subfamília Ftz-F1, e compartilha alta homologia com SF1 (Becker-André et al., 1993). No fígado, *LRH1* está envolvido com o transporte reverso do colesterol, com a síntese dos ácidos biliares na circulação enterohepática e na lipogênese (Fayard et al., 2004; Xu et al., 2010). *LRH1* é regulador do metabolismo do colesterol nos ovários, do seu desenvolvimento e função (Mouzat et al., 2013). Nas células HepG2 que hiperexpressam *TCF21*, *TCF21* se liga a duas regiões distintas do promotor de *SHP* (*small heterodimer partner*), que é um regulador negativo de *LRH1*. Essa ligação inibe a expressão de *SHP* resultando na expressão de *LRH1*. Portanto, em células HepG2 *TCF21* tem funções que contrastam com as observadas nas células de tumores adrenocorticais (França et al., 2015).

*TCF21* foi analisado por RT-PCR em 78 amostras de pacientes adultos (44 adenomas e 34 carcinomas) e em 35 amostras de tumores pediátricos de pacientes com menos de 5 anos de idade (27 adenomas e 8 carcinomas) e em 15 amostras de pacientes de 5 a 18 anos (5 adenomas e 10 carcinomas). Essa análise confirmou que em nosso coorte a expressão de *TCF21* é menor em carcinomas adultos do que em adenomas (Passaia et al., 2018). Em pacientes pediátricos, maiores e menores de 5 anos, não houve expressão diferencial de *TCF21* nos tumores malignos e benignos de pacientes. Além disso, o gene *BUB1B* (*BUB1 Mitotic Checkpoint Serine/Threonine Kinase B*), gene de checkpoint mitótico, confirmou sua maior expressão em

carcinomas do que em adenomas adultos. A expressão combinada do gene *TCF21* e do gene *BUB1B* mostrou 84% de acurácia, e foi considerada como marcador de sobrevida em pacientes adultos (de Reynies et al., 2009; Fragoso et al., 2012). Ao utilizar o valor de corte maior que 0.19 para a expressão combinada de *TCF21* e *BUB1B* foi possível separar os pacientes com carcinomas em dois subgrupos: um com melhor sobrevida, no qual nenhum paciente morreu durante o período de acompanhamento, e outro grupo com expressão menor que 0.19 que teve pior prognóstico de sobrevida, cerca de 2 vezes menor que o grupo anterior. Em pacientes pediátricos com idade menor que 5 anos a expressão gênica combinada de *TCF21* e *SF1* foi considerada preditor de malignidade com acurácia de 79% (Passaia et al., 2018). Em conjunto, os dados obtidos até o momento sobre a expressão de *TCF21* sugerem que *TCF21* pode ter um papel importante no processo tumorigênico das suprarrenais. No entanto, para um melhor entendimento do seu papel nesses tumores tivemos como hipótese que *TCF21* pode se ligar a outros alvos gênicos relacionados com o desenvolvimento dos tumores adrenocorticais, e para isso tivemos os seguintes objetivos abaixo descritos.

## **6. Conclusões**



### **a) A identificação dos alvos do fator de transcrição TCF21 em células H295R e HepG2**

Foram identificadas 70 sequencias alvos de TCF21 em células H295R pCMVMycTCF21 através da plataforma NexSeq com 95% ou mais de chances de serem reprodutíveis. Dentre as cinco mais frequentes, genes *PRDM7*, *CNTNAP2*, *CACNA1B*, *PTPRN2* e *KCNE1B*, TCF21 regula positivamente *PRDM7* e *CNTNAP2* e negativamente *CACNA1B*/canal de cálcio Ca v2.2.

Através da análise de dados da TCGA, dentre os alvos identificados em células H295R, os genes *ATP10A* e *PTPRN2*, tiveram correlação significativa com TCF21 em amostras de hepatocarcinoma de pacientes.

### **b) A validação dos genes alvos selecionados através da modulação da expressão gênica e proteica, após o aumento de expressão de TCF21.**

Nas células H295R pCMVMycTCF21 a expressão gênica e proteica de *CACNA1B* está reduzida em relação ao controle, o que confirma a relação negativa entre *CACNA1B* e TCF21.

A análise de amostras de tumores adrenocorticais de pacientes adultos, a expressão gênica de *CACNA1B* foi maior em carcinomas do que em adenomas, mas não apresentou relação com a sobrevida geral. A análise de amostras de tumores pediátricos, a expressão gênica de *CACNA1B* não apresentou diferença significativa entre carcinomas e adenomas, embora a expressão do canal de cálcio Ca v2.2 tenha sido maior em células de carcinoma pediátrico, o que sugere que esse gene possa ser importante em tumores adrenocorticais pediátricos.

Nas células HepG2 CRISPR/dCas9/TCF21, o aumento de *TCF21* levou a diminuição da expressão genica de *ATP10A* e aumento da expressão de *PTPRN2*.

### **c) A função dos alvos selecionados após expressão ou inibição desses genes nas células H295R**

Em células H295R e na cultura de células de carcinoma ACC-T227, o bloqueio seletivo do canal de cálcio Ca v2.2 com a droga ômega-conotoxina MVIIA não alterou a viabilidade celular. Portanto, outros experimentos e abordagens são necessários para avaliar a função do canal Ca v2.2 na suprarrenal e tumores adrenocorticais.

## **7. Referências**

ALBERTS, B.; WILSON, J. H.; HUNT, T. **Biologia Molecular da célula**. 6ª ed. Porto Alegre : Artmed, 2017. xxxiii, 1601, 1690 p. p. 9780815341116

ANDREWS, S. FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data. Disponível em: <https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/> Acesso em: 30 ago. 2020

ARAB, K.; SMITH, L. T.; GAST, A.; WEICHENHAN, D. *et al.* Epigenetic deregulation of TCF21 inhibits metastasis suppressor KISS1 in metastatic melanoma. **Carcinogenesis**, 32, n. 10, p. 1467-1473, Oct 2011.

AMEMIYA, H. M.; KUNDAJE, A.; BOYLE, A. P. The ENCODE Blacklist: Identification of Problematic Regions of the Genome. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 9354, Jun 27 2019.

ARITOMI, S.; WAGATSUMA, H.; NUMATA, T.; URIU, Y. *et al.* Expression of N-type calcium channels in human adrenocortical cells and their contribution to corticosteroid synthesis. **Hypertens Res**, 34, n. 2, p. 193-201, Feb 2011.

ASSIE, G.; LETOUZE, E.; FASSNACHT, M.; JOUINOT, A. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. **Nat Genet**, 46, n. 6, p. 607-612, Jun 2014.

AUFFORTH, R. D.; NILUBOL, N. Emerging therapy for adrenocortical carcinoma. **Int J Endocr Oncol**, 1, n. 2, p. 173-182, 2014.

BANDIERA, R.; VIDAL, V. P.; MOTAMEDI, F. J.; CLARKSON, M. *et al.* WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. **Dev Cell**, 27, n. 1, p. 5-18, Oct 14 2013.

BASSO, T. R.; VILLACIS, R. A.; CANTO, L. M.; ALVES, V. M. *et al.* Genomic profile of a Li-Fraumeni-like syndrome patient with a 45,X/46,XX karyotype, presenting neither mutations in TP53 nor clinical stigmata of Turner syndrome. **Cancer Genet**, 208, n. 6, p. 341-344, Jun 2015.

BECKER-ANDRE, M.; ANDRE, E.; DELAMARTER, J. F. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. **Biochem Biophys Res Commun**, 194, n. 3, p. 1371-1379, Aug 16 1993.

BLAZER, L. L.; LIMA-FERNANDES, E.; GIBSON, E.; ERAM, M. S. *et al.* PR Domain-containing Protein 7 (PRDM7) Is a Histone 3 Lysine 4 Trimethyltransferase. **J Biol Chem**, 291, n. 26, p. 13509-13519, Jun 24 2016.

BLEAKMAN, D.; BOWMAN, D.; BATH, C. P.; BRUST, P. F. *et al.* Characteristics of a human N-type calcium channel expressed in HEK293 cells. **Neuropharmacology**, 34, n. 7, p. 753-765, Jul 1995.

CHEN, S.; ZHOU, Y.; CHEN, Y.; GU, J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. **Bioinformatics**, 34, n. 17, p. i884-i890, Sep 1 2018.

CUI, S.; ROSS, A.; STALLINGS, N.; PARKER, K. L. *et al.* Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. **Development**, 131, n. 16, p. 4095-4105, Aug 2004.

CORY, A. H.; OWEN, T. C.; BARLTROP, J. A.; CORY, J. G. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth assays in culture. **Cancer Commun**, 3, n. 7, p. 207-212, Jul 1991.

DAI, Y.; DUAN, H.; DUAN, C.; ZHU, H. *et al.* TCF21 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer through inactivation of PI3K/AKT signaling. **Onco Targets Ther**, 10, p. 1603-1611, 2017.

DAVIS, J. N.; MCGHEE, L.; MEYERS, S. The ETO (MTG8) gene family. **Gene**, 303, p. 1-10, Jan 16 2003.

DE REYNIES, A.; ASSIE, G.; RICKMAN, D. S.; TISSIER, F. *et al.* Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. **J Clin Oncol**, 27, n. 7, p. 1108-1115, Mar 1 2009.

DIGIAMMARINO, E. L.; LEE, A. S.; CADWELL, C.; ZHANG, W. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, 9, n. 1, p. 12-16, Jan 2002.

DOGHMAN, M.; KARPOVA, T.; RODRIGUES, G. A.; ARHATTE, M. *et al.* Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. **Mol Endocrinol**, 21, n. 12, p. 2968-2987, Dec 2007.

EL WAKIL, A.; LALLI, E. The Wnt/beta-catenin pathway in adrenocortical development and cancer. **Mol Cell Endocrinol**, 332, n. 1-2, p. 32-37, Jan 30 2011.

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, Oct 1 2018.

FAYARD, E.; AUWERX, J.; SCHOONJANS, K. LRH-1: an orphan nuclear receptor involved in development, metabolism and steroidogenesis. **Trends Cell Biol**, 14, n. 5, p. 250-260, May 2004.

FRAGOSO, M. C.; ALMEIDA, M. Q.; MAZZUCO, T. L.; MARIANI, B. M. *et al.* Combined expression of BUB1B, DLGAP5, and PINK1 as predictors of poor outcome in adrenocortical tumors: validation in a Brazilian cohort of adult and pediatric patients. **Eur J Endocrinol**, 166, n. 1, p. 61-67, Jan 2012.

FRANCA, M. M.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; SANTOS, M. G.; LERARIO, A. M. *et al.* POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. **Mol Cell Endocrinol**, 371, n. 1-2, p. 140-147, May 22 2013.

FRANCA, M. M.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LERARIO, A. M.; FRAGOSO, M. C. *et al.* POD-1/TCF21 Reduces SHP Expression, Affecting LRH-1 Regulation and Cell Cycle Balance in Adrenocortical and Hepatocarcinoma Tumor Cells. **Biomed Res Int**, 2015, p. 841784, 2015.

FONSECA, A. L.; KUGELBERG, J.; STARKER, L. F.; SCHOLL, U. *et al.* Comprehensive DNA methylation analysis of benign and malignant adrenocortical tumors. **Genes Chromosomes Cancer**, 51, n. 10, p. 949-960, Oct 2012.

GADE, P.; KALVAKOLANU, D. V. Chromatin immunoprecipitation assay as a tool for analyzing transcription factor activity. **Methods Mol Biol**, 809, p. 85-104, 2012.

GAO, J. H.; HE, L. H.; YU, X. H.; ZHAO, Z. W. *et al.* CXCL12 promotes atherosclerosis by downregulating ABCA1 expression via the CXCR4/GSK3beta/beta-catenin(T120)/TCF21 pathway. **J Lipid Res**, 60, n. 12, p. 2020-2033, Dec 2019.

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 1 1990.

GAUJOUX, S.; MIHAI, R.; JOINT WORKING GROUP OF, E.; ENSAT. European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma. **Br J Surg**, 104, n. 4, p. 358-376, Mar 2017.

GENTILINI, D.; SCALA, S.; GAUDENZI, G.; GARAGNANI, P. *et al.* Epigenome-wide association study in hepatocellular carcinoma: Identification of stochastic epigenetic mutations through an innovative statistical approach. **Oncotarget**, 8, n. 26, p. 41890-41902, Jun 27 2017.

GIORDANO, T. J.; KUIICK, R.; ELSE, T.; GAUGER, P. G. *et al.* Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. **Clin Cancer Res**, 15, n. 2, p. 668-676, Jan 15 2009.

GOOSKENS, S. L.; KLASSON, T. D.; GREMMELS, H.; LOGISTER, I. *et al.* TCF21 hypermethylation regulates renal tumor cell clonogenic proliferation and migration. **Mol Oncol**, 12, n. 2, p. 166-179, Feb 2018.

GUYTON, AC & HALL, JE. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2011. 1151p

HARRISON, T.; GRAHAM, F.; WILLIAMS, J. Host-range mutants of adenovirus type 5 defective for growth in HeLa cells. **Virology**, 77, n. 1, p. 319-329, Mar 1977.

HANLEY, N. A.; RAINEY, W. E.; WILSON, D. I.; BALL, S. G. *et al.* Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. **Mol Endocrinol**, 15, n. 1, p. 57-68, Jan 2001.

HEINZ, S.; BENNER, C.; SPANN, N.; BERTOLINO, E. *et al.* Simple combinations of lineage-determining transcription factors prime cis-regulatory elements required for macrophage and B cell identities. **Mol Cell**, 38, n. 4, p. 576-589, May 28 2010.

HOLMES, P. V.; DICKSON, A. D. X-zone degeneration in the adrenal glands of adult and immature female mice. **J Anat**, 108, n. Pt 1, p. 159-168, Jan 1971.

HONG, D.; FRITZ, A. J.; GORDON, J. A.; TYE, C. E. *et al.* RUNX1-dependent mechanisms in biological control and dysregulation in cancer. **J Cell Physiol**, 234, n. 6, p. 8597-8609, Jun 2019.

IKEDA, Y.; SHEN, W. H.; INGRAHAM, H. A.; PARKER, K. L. Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Mol Endocrinol**, 8, n. 5, p. 654-662, May 1994.

HONDA, S.; MOROHASHI, K.; NOMURA, M.; TAKEYA, H. *et al.* Ad4BP regulating steroidogenic P-450 gene is a member of steroid hormone receptor superfamily. **J Biol Chem**, 268, n. 10, p. 7494-7502, Apr 5 1993.

HU, T. H.; YAO, Y.; YU, S.; HAN, L. L. *et al.* SDF-1/CXCR4 promotes epithelial-mesenchymal transition and progression of colorectal cancer by activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. **Cancer Lett**, 354, n. 2, p. 417-426, Nov 28 2014.

JIANG, X.; YANG, Z. Multiple biological functions of transcription factor 21 in the development of various cancers. **Onco Targets Ther**, 11, p. 3533-3539, 2018.

KLEAVELAND, B.; ZHENG, X.; LIU, J. J.; BLUM, Y. *et al.* Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. **Nat Med**, 15, n. 2, p. 169-176, Feb 2009.

KIM, A. C.; BARLASKAR, F. M.; HEATON, J. H.; ELSE, T. *et al.* In search of adrenocortical stem and progenitor cells. **Endocr Rev**, 30, n. 3, p. 241-263, May 2009.

KITAWAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; KUBOTA-NAKAYAMA, F.; YAMAZAKI, Y. *et al.* Tumor microenvironment in functional adrenocortical adenomas: immune cell infiltration in cortisol-producing adrenocortical adenoma. **Hum Pathol**, 77, p. 88-97, Jul 2018.

KNOWLES, B. B.; HOWE, C. C.; ADEN, D. P. Human hepatocellular carcinoma cell lines secrete the major plasma proteins and hepatitis B surface antigen. **Science**, 209, n. 4455, p. 497-499, Jul 25 1980.

KONERMANN, S.; BRIGHAM, M. D.; TREVINO, A. E.; JOUNG, J. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. **Nature**, 517, n. 7536, p. 583-588, Jan 29 2015.

LANDT, S. G.; MARINOV, G. K.; KUNDAJE, A.; KHERADPOUR, P. *et al.* ChIP-seq guidelines and practices of the ENCODE and modENCODE consortia. **Genome Res**, 22, n. 9, p. 1813-1831, Sep 2012.

LATRONICO, A. C.; PINTO, E. M.; DOMENICE, S.; FRAGOSO, M. C. *et al.* An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and

adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, 86, n. 10, p. 4970-4973, Oct 2001.

LEROY, B.; ANDERSON, M.; SOUSSI, T. TP53 mutations in human cancer: database reassessment and prospects for the next decade. **Hum Mutat**, 35, n. 6, p. 672-688, Jun 2014.

LI, H.; DURBIN, R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. **Bioinformatics**, 25, n. 14, p. 1754-1760, Jul 15 2009.

LI Q.; BROWN J.B.; HUANG H.; BICKEL, P.J. Measuring reproducibility of high-throughput experiments. **Ann Appl Stat**, 5, 1752–79, Jan 2011

LI, P. W.; WANG, H. Y.; XU, L. L. [Effect of TCF21 on proliferation, migration and vascular production of breast cancer cells]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**, 48, n. 4, p. 307-311, Apr 8 2019.

LIEPELT, A.; TACKE, F. Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1) as a target in liver diseases. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol**, 311, n. 2, p. G203-209, Aug 1 2016.

LI, W.; POZZO-MILLER, L. Dysfunction of the corticostriatal pathway in autism spectrum disorders. **J Neurosci Res**, Nov 22 2019.

LIBE, R.; FRATTICCI, A.; BERTHERAT, J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. **Endocr Relat Cancer**, 14, n. 1, p. 13-28, Mar 2007.

LU, J.; RICHARDSON, J. A.; OLSON, E. N. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. **Mech Dev**, 73, n. 1, p. 23-32, Apr 1998.

LU, J.; CHANG, P.; RICHARDSON, J. A.; GAN, L. *et al.* The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 97, n. 17, p. 9525-9530, Aug 15 2000.

LU, W.; YANG, C.; DU, P.; ZHANG, J. L. *et al.* Expression tendency and prognostic value of TCF21 in hepatocellular carcinoma. **Artif Cells Nanomed Biotechnol**, 47, n. 1, p. 1466-1470, Dec 2019.

MABLY, J. D.; MOHIDEEN, M. A.; BURNS, C. G.; CHEN, J. N. *et al.* heart of glass regulates the concentric growth of the heart in zebrafish. **Curr Biol**, 13, n. 24, p. 2138-2147, Dec 16 2003.

MARTINEZ, N.; DRESCHER, B.; RIEHLE, H.; CULLMANN, C. *et al.* The oncogenic fusion protein RUNX1-CBFA2T1 supports proliferation and inhibits senescence in t(8;21)-positive leukaemic cells. **BMC Cancer**, 4, p. 44, Aug 6 2004.

MASSARI, M. E.; MURRE, C. Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. **Mol Cell Biol**, 20, n. 2, p. 429-440, Jan 2000.

MCLEAN, C. Y.; BRISTOR, D.; HILLER, M.; CLARKE, S. L. *et al.* GREAT improves functional interpretation of cis-regulatory regions. **Nat Biotechnol**, 28, n. 5, p. 495-501, May 2010.

MEN, X.; MA, J.; WU, T.; PU, J. *et al.* Transcriptome profiling identified differentially expressed genes and pathways associated with tamoxifen resistance in human breast cancer. **Oncotarget**, 9, n. 3, p. 4074-4089, Jan 9 2018.

MENG, W.; XUE, S.; CHEN, Y. The role of CXCL12 in tumor microenvironment. **Gene**, 641, p. 105-110, Jan 30 2018.

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 1 2004.

MILLER, R. J. Voltage-sensitive Ca<sup>2+</sup> channels. **J Biol Chem**, 267, n. 3, p. 1403-1406, Jan 25 1992.

MOKKAPATI, S.; PORTEN, S. P.; NARAYAN, V. M.; LIM, A. H. *et al.* TCF21 Promotes Luminal-Like Differentiation and Suppresses Metastasis in Bladder Cancer. **Mol Cancer Res**, 18, n. 6, p. 811-821, Jun 2020.

MOROHASHI, K.; ZANGER, U. M.; HONDA, S.; HARA, M. *et al.* Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. **Mol Endocrinol**, 7, n. 9, p. 1196-1204, Sep 1993.

MOUZAT, K.; BARON, S.; MARCEAU, G.; CAIRA, F. *et al.* Emerging roles for LXRs and LRH-1 in female reproduction. **Mol Cell Endocrinol**, 368, n. 1-2, p. 47-58, Apr 10 2013.

MOROHASHI, K.; IIDA, H.; NOMURA, M.; HATANO, O. *et al.* Functional difference between Ad4BP and ELP, and their distributions in steroidogenic tissues. **Mol Endocrinol**, 8, n. 5, p. 643-653, May 1994.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H.; GE, N. *et al.* Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature**, 410, n. 6824, p. 50-56, Mar 1 2001.

NAGASAWA, T.; HIROTA, S.; TACHIBANA, K.; TAKAKURA, N. *et al.* Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. **Nature**, 382, n. 6592, p. 635-638, Aug 15 1996.

NICOLETTI, N. F.; ERIG, T. C.; ZANIN, R. F.; ROXO, M. R. *et al.* Pre-clinical evaluation of voltage-gated calcium channel blockers derived from the spider *P. nigriventer* in glioma progression. **Toxicol**, 129, p. 58-67, Apr 2017.

OKONECHNIKOV, K.; CONESA, A.; GARCIA-ALCALDE, F. Qualimap 2: advanced multi-sample quality control for high-throughput sequencing data. **Bioinformatics**, 32, n. 2, p. 292-294, Jan 15 2016.

OLIVERA, B. M.; CRUZ, L. J.; DE SANTOS, V.; LECHEMINANT, G. W. *et al.* Neuronal calcium channel antagonists. Discrimination between calcium channel subtypes using omega-conotoxin from *Conus magus* venom. **Biochemistry**, 26, n. 8, p. 2086-2090, Apr 21 1987.

PAN, J.; MESTAS, J.; BURDICK, M. D.; PHILLIPS, R. J. *et al.* Stromal derived factor-1 (SDF-1/CXCL12) and CXCR4 in renal cell carcinoma metastasis. **Mol Cancer**, 5, p. 56, Nov 3 2006.

PANTOU, M. P.; GOURZI, P.; DEGIANNIS, D. The potential presence of the highly similar paralogue gene KCNE1B blurs the genetic basis of KCNE1-LQTS patients. **Eur J Hum Genet**, 27, n. 8, p. 1175-1177, Aug 2019.

PASSAIA, B. D. S.; DIAS, M. H.; KREMER, J. L.; ANTONINI, S. R. R. *et al.* TCF21/POD-1, a Transcriptional Regulator of SF-1/NR5A1, as a Potential Prognosis Marker in Adult and Pediatric Adrenocortical Tumors. **Front Endocrinol (Lausanne)**, 9, p. 38, 2018.

PHAN, N. N.; WANG, C. Y.; CHEN, C. F.; SUN, Z. *et al.* Voltage-gated calcium channels: Novel targets for cancer therapy. **Oncol Lett**, 14, n. 2, p. 2059-2074, Aug 2017.

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

PHILLIPS, R. J.; BURDICK, M. D.; LUTZ, M.; BELPERIO, J. A. *et al.* The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. **Am J Respir Crit Care Med**, 167, n. 12, p. 1676-1686, Jun 15 2003.

QUAGGIN, S. E.; VANDEN HEUVEL, G. B.; IGARASHI, P. Pod-1, a mesoderm-specific basic-helix-loop-helix protein expressed in mesenchymal and glomerular epithelial cells in the developing kidney. **Mech Dev**, 71, n. 1-2, p. 37-48, Feb 1998.

QUAGGIN, S. E.; SCHWARTZ, L.; CUI, S.; IGARASHI, P. *et al.* The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. **Development**, 126, n. 24, p. 5771-5783, Dec 1999.

RAO, C. V. Human adrenal LH/hCG receptors and what they could mean for adrenal physiology and pathology. **Mol Cell Endocrinol**, 329, n. 1-2, p. 33-36, Nov 25 2010.

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 31 2001.

ROBB, L.; MIFSUD, L.; HARTLEY, L.; BIBEN, C. *et al.* epicardin: A novel basic helix-loop-helix transcription factor gene expressed in epicardium, branchial arch myoblasts, and mesenchyme of developing lung, gut, kidney, and gonads. **Dev Dyn**, 213, n. 1, p. 105-113, Sep 1998.

ROSSETTI, S.; HOOGEVEEN, A. T.; SACCHI, N. The MTG proteins: chromatin repression players with a passion for networking. **Genomics**, 84, n. 1, p. 1-9, Jul 2004.

SCOTTON, C. J.; WILSON, J. L.; SCOTT, K.; STAMP, G. *et al.* Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. **Cancer Res**, 62, n. 20, p. 5930-5938, Oct 15 2002.

SENGELAUB, C. A.; NAVRAZHINA, K.; ROSS, J. B.; HALBERG, N. *et al.* PTPRN2 and PLCbeta1 promote metastatic breast cancer cell migration through PI(4,5)P2-dependent actin remodeling. **EMBO J**, 35, n. 1, p. 62-76, Jan 4 2016.

SERON-FERRE, M. and JAFFE, R. B. The fetal adrenal gland. **Annu Rev Physiol**, 43, 141-162, Mar, 1981.

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 21 1995.

SMITH, L. T.; LIN, M.; BRENA, R. M.; LANG, J. C. *et al.* Epigenetic regulation of the tumor suppressor gene TCF21 on 6q23-q24 in lung and head and neck cancer. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 103, n. 4, p. 982-987, Jan 24 2006.

STANDRING, S.; BORLEY, N. R.; GRAY, H. **Gray's anatomia**. 40th ed. . Rio de Janeiro: Editora Elsevier, 2010. xxiv, 1551 p.

SOROKIN, A. V.; NAIR, B. C.; WEI, Y.; AZIZ, K. E. *et al.* Aberrant Expression of proPTPRN2 in Cancer Cells Confers Resistance to Apoptosis. **Cancer Res**, 75, n. 9, p. 1846-1858, May 1 2015.

TAICHMAN, R. S.; COOPER, C.; KELLER, E. T.; PIENTA, K. J. *et al.* Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. **Cancer Res**, 62, n. 6, p. 1832-1837, Mar 15 2002.

TAMURA, M.; KANNO, Y.; CHUMA, S.; SAITO, T. *et al.* Pod-1/Capsulin shows a sex- and stage-dependent expression pattern in the mouse gonad development and represses expression of Ad4BP/SF-1. **Mech Dev**, 102, n. 1-2, p. 135-144, Apr 2001.

TESSEMA, M.; BELINSKY, S. A. Mining the epigenome for methylated genes in lung cancer. **Proc Am Thorac Soc**, 5, n. 8, p. 806-810, Dec 1 2008.

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 1 2005.

TORTI J. F. & CORREA R. **Cancer, Adrenal**. StatPearls, 2020. *E-book*.

VAL, P.; LEFRANCOIS-MARTINEZ, A. M.; VEYSSIERE, G.; MARTINEZ, A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl Recept**, 1, n. 1, p. 8, Sep 18 2003.



VANDERCAPPELLEN, J.; VAN DAMME, J.; STRUYF, S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. **Cancer Lett**, 267, n. 2, p. 226-244, Aug 28 2008.

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, I. D.; HUFF, L. M.; EVBUOMWAN, M. O.; XU, X. *et al.* Screening of cancer tissue arrays identifies CXCR4 on adrenocortical carcinoma: correlates with expression and quantification on metastases using (64)Cu-plerixafor PET. **Oncotarget**, 8, n. 43, p. 73387-73406, Sep 26 2017.

WILLIAMS, M. E.; FELDMAN, D. H.; MCCUE, A. F.; BRENNER, R. *et al.* Structure and functional expression of alpha 1, alpha 2, and beta subunits of a novel human neuronal calcium channel subtype. **Neuron**, 8, n. 1, p. 71-84, Jan 1992.

WOOD, M. A., ARCHARYA A., FINCO I., SWONGER J. M. *et al.* Fetal adrenal capsular cells serve as progenitor cells for steroidogenic and stromal adrenocortical cell lineages in M. Musculus. **Development** 140, 22, 4522-4532, Nov, 2013

WU, Y.; WANG, W.; JIANG, W.; YAO, J. *et al.* An investigation of obesity susceptibility genes in Northern Han Chinese by targeted resequencing. **Medicine (Baltimore)**, 96, n. 7, p. e6117, Feb 2017.

XU, Z.; OUYANG, L.; CASTILLO-OLIVARES, A. D.; PANDAK, W. M. *et al.* alpha(1)-Fetoprotein Transcription Factor (FTF)/Liver Receptor Homolog-1 (LRH-1) Is an Essential Lipogenic Regulator. **Biochim Biophys Acta**, 1801, n. 4, p. 473-479, Apr 2010.

YANG, Z.; JIANG, X.; LI, D.; DONG, Q. *et al.* TCF21 inhibits proliferation and chemoresistance through the AKT pathway in human gastric cancer. **Gene**, 682, p. 42-49, Jan 15 2019.

ZHANG, Y.; LIU, T.; MEYER, C. A.; EECKHOUTE, J. *et al.* Model-based analysis of ChIP-Seq (MACS). **Genome Biol**, 9, n. 9, p. R137, 2008.

ZHAO, Y. R.; WANG, J. L.; XU, C.; LI, Y. M. *et al.* HEG1 indicates poor prognosis and promotes hepatocellular carcinoma invasion, metastasis, and EMT by activating Wnt/beta-catenin signaling. **Clin Sci (Lond)**, 133, n. 14, p. 1645-1662, Jul 31 2019.

ZHOU, X.; WANG, W.; ZHANG, S.; WANG, X. *et al.* CACNA1B (Cav2.2) Overexpression and Its Association with Clinicopathologic Characteristics and Unfavorable Prognosis in Non-Small Cell Lung Cancer. **Dis Markers**, 2017, p. 6136401, 2017.