

Bárbara dos Santos Passaia

**Análise da expressão do fator de transcrição
TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em
tumores adrenocorticais humanos**

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

Área de Concentração: Ciências
Morfofuncionais

Orientadora: Profa. Dra. Claudimara Ferini
Pacicco Lotfi

Versão corrigida. A versão original eletrônica
encontra-se disponível tanto na Biblioteca do
ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e
Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo
2016

RESUMO

Passaia BP. Análise da expressão do fator de transcrição TCF21/POD-1 e de genes do ciclo celular em tumores adrenocorticais humanos. [Dissertação (Mestrado em Ciências Morfofuncionais)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

As massas adrenocorticais são majoritariamente (70-80%) adenomas adrenocorticais (ACA). Os carcinomas adrenocorticais (ACC) são mais raros e de prognóstico restrito, com incidência de 1-2 casos por milhão, com alta taxa de reincidência (70-80%). Apesar dos tumores adrenocorticais (ACT) serem raros, no Brasil a incidência desses tumores em crianças é cerca de 10 vezes superior ao do restante do mundo, devido a uma mutação do gene TP53. Atualmente, o diagnóstico de massas adrenocorticais é realizado através dos critérios de Weiss, que possuem limitações, e por isso é intensa a busca de novos marcadores moleculares que facilite o diagnóstico de ACTs. POD-1/ TCF21 é um fator de transcrição do tipo helix-loop-helix básica (bHLH) expresso nos sítios de interação mesênquima-epitélio durante o desenvolvimento embrionário. Em ACTs, POD-1 regula a expressão endógena de SF-1 através da ligação na sequência E-box da região promotora de SF-1, e nesses tumores parece estar relacionado negativamente com genes reguladores do ciclo celular, como BUB1B. BUB1B é um gene que codifica uma quinase com funções importantes durante o checkpoint mitótico. A expressão de BUB1B é considerada fator de prognóstico em diferentes tipos de tumores, inclusive em ACTs humanos, nos quais a expressão combinada de BUB1B e PINK1 (Δ CtBUB1B - Δ CtPINK1) mostrou-se um bom marcador de sobrevida em pacientes com ACC. PINK1, quinase 1 induzida por PTEN, é regulada principalmente pela mitocôndria, e em ACTs sua expressão está reduzida em ACC mais agressivos. Temos como hipótese que a expressão de POD-1 pode ter valor diferencial no diagnóstico de massas adrenocorticais, e que a análise da expressão combinada de POD-1, BUB1B e PINK1 pode ter valor diferencial para prognóstico de pacientes com ACT. Nesse trabalho foram analisados, por reação de qPCR com sondas Taqman, o cDNA obtido de 130 amostras de tumores: 79 adultos (44 ACAs e 35 ACCs), 35 crianças com menos de 5 anos de idade (27 ACAs e 8 ACCs) e 16 crianças de 5 a 18 anos de idade (6 ACAs e 10 ACCs). Nossos resultados mostram que POD-1 e BUB1B tem valor diferencial em ACT adulto e que a expressão combinada de POD-1 e BUB1B pode ser um marcador de prognóstico em pacientes com carcinoma adulto. Enquanto que, a expressão combinada de POD-1 e SF-1 pode ter valor de diagnóstico em pacientes pediátricos com menos de 5 anos. Em resumo, concluímos que estudos experimentais devem ser realizados para comprovar a relação entre os genes estudados, para que os resultados sejam sólidos o suficiente para serem utilizados no diagnóstico e prognóstico dos tumores adrenocorticais.

Palavras-chave: POD-1. BUB1B. Genes do ciclo celular. Córtex adrenal. Tumor adrenocortical.

ABSTRACT

Passaia BP. Analysis of TCF21/POD-1 transcription factor and cell cycle genes expression in adult adrenocortical tumors. [Master Thesis (Morphofunctional Sciences)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2016.

The adrenocortical masses are mostly (70-80%) adrenocortical adenomas (ACA). Adrenocortical carcinomas (ACC) are scarce and have limited prognosis, with an incidence of 1-2 cases per million and high recurrence rate (70-80%). Despite adrenocortical tumors (ACT) are rare in Brazil the incidence of these tumors in children is about 10 times higher than the rest of the world, due to a mutation of the TP53 gene. Currently, the diagnosis of adrenocortical mass is carried through Weiss criteria that have limitations, so it is intensive the search for new molecular markers that facilitate the diagnostic of ACTs. TCF21/POD-1 is a transcription factor helix-loop-helix type expressed in mesenchymal-epithelial sites of interaction during embryonic development. In ACTs, POD-1 regulates the expression of endogenous SF-1 through binding the E-box sequence of SF-1 promoter region, and seems to be negatively related with cell cycle regulatory genes such as BUB1B. BUB1B is a gene encoding a kinase with important function during mitotic checkpoint. The expression of BUB1B is considered a prognostic factor in different types of tumors, including ACTs. Combined expression of BUB1B and PINK1 (Δ CtBUB1B - Δ CtPINK1) has been shown to be a good marker of survival in adults with ACC, whereas the PINK1 expression is reduced in the most aggressive ACC. We hypothesized that the POD-1 expression may have differential value in the diagnosis of adrenocortical masses, and that the analysis of the combined expression of POD-1, BUB1B and PINK1 may have differential value for the prognosis of patients with ACT. In this work were analyzed by PCRq Taqman probes the cDNA obtained from 130 tumor samples: 79 adults (44 ACAs and 35 ACCs), 35 children under 5 years old (27 ACAs and 8 ACCs) and 16 children 5-18 years of age (6 ACAs and 10 ACCs). Our results show that POD-1 and BUB1B has differential value in adult ACT, and the combined expression of POD-1 and BUB1B may have a prognostic value in patients with adult carcinoma. In addition, the combined expression of POD-1 and SF-1 might have diagnostic value in pediatric patients younger than 5 years. In summary, we conclude that experimental studies should be conducted to confirm the relationship between the genes studied, so that the results are solid enough to be used in the diagnosis and prognosis of adrenocortical tumors.

Keywords: POD-1. BUB1B. Cell cycle genes. Adrenal cortex. Adrenocortical tumor.

Introdução

1.1 Glândula suprarrenal e doenças relacionadas

A glândula suprarrenal é constituída por dois tecidos distintos, com origens embrionárias diferentes; a região mais interna é a medula, que é derivada da crista neural, e responsável pela secreção de catecolaminas, como a adrenalina. Envolvendo a medula está o córtex adrenal, que é derivado da mesoderme e compõe a maior parte do órgão. O córtex secreta hormônios esteroides responsáveis pela manutenção da homeostase corporal, e é composto por três zonas concêntricas com características histológicas diferentes. A zona mais externa é a zona glomerulosa, composta por células piramidais, organizadas em cordões, seguida da zona fasciculada, com células organizadas radialmente e separadas por vasos sanguíneos, e a mais interna, a zona reticular, composta por células menores dispostas em cordões irregulares ^{1,2}. Cada zona é responsável pela síntese e secreção de diferentes hormônios, sendo que a zona glomerulosa produz mineralocorticóides, como aldosterona, a zona fasciculada produz glicocorticóides, como cortisol, e a zona reticular hormônios andrógenos, como a testosterona ². A produção e secreção de cortisol são reguladas pela interação entre o hipotálamo, a hipófise e a glândula suprarrenal. Esse mecanismo de controle é denominado eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, ou eixo HPA (*hypothalamus-pituitary-adrenal*), que responde a estímulos internos, como estímulos neurais, e externos, como a luz do ambiente. A resposta a diferentes estímulos leva à liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH - *corticotrophin release hormone*) e da vasopressina no sistema porta hipofisário, levando à produção e secreção do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) na corrente sanguínea. O ACTH estimula, no córtex da glândula suprarrenal, a secreção de cortisol e de outros esteróides.

A regulação negativa do eixo ocorre através da inibição da síntese do hormônio CRH, da vasopressina e do ACTH quando há aumento do nível de glicocorticóides³.

A desregulação no eixo HPA pode levar a um aumento da produção do hormônio ACTH na hipófise, e conseqüentemente um aumento da produção de cortisol, sendo uma das causas da Síndrome de Cushing, que também pode ocorrer por produção ectópica do ACTH⁴. Os problemas que o hipercortisolismo pode causar incluem deficiências cardiovasculares e musculares, e também problemas psicológicos como ansiedade e depressão⁵. Quanto mais tempo o corpo permanecer exposto ao excesso de cortisol, mais os sintomas tornam-se evidentes, como aumento de gordura no abdômen e rosto, membros desproporcionais à estrutura do corpo e estrias roxas, que são características da síndrome^{4,6}.

Por outro lado, a insuficiência adrenal tem como sintomas a perda de peso, anorexia, náuseas, fraqueza e fadiga, que são causados pela deficiência de produção de glicocorticóides, mineralocorticóides ou hormônios andrógenos. A insuficiência na produção dos hormônios característicos do córtex da glândula adrenal pode ocorrer por problemas funcionais no córtex adrenal, e é denominada insuficiência adrenal primária. Os defeitos no lobo anterior da hipófise determinam a insuficiência adrenal secundária, enquanto a insuficiência adrenal terciária pode ocorrer por qualquer alteração no hipotálamo, que na maioria dos casos é causada por administração crônica excessiva de glicocorticoides sintéticos que interferem na secreção de CRH pelo hipotálamo⁷.

Diferentemente da insuficiência adrenal, o aldosteronismo primário, ou seja, o aumento de produção de aldosterona pela zona glomerulosa do córtex adrenal, leva a retenção de sódio e excreção excessiva de potássio que pode causar hipocalcemia, supressão da renina plasmática, hipertensão e

danos cardiovasculares. Normalmente está associado a hiperplasia adrenal ou a um tumor adrenocortical benigno ⁸.

1.2 Tumores adrenocorticais

Os tumores adrenocorticais (ACTs) são comumente encontrados acidentalmente através de exames de imagem, sendo majoritariamente (70-80%) tumores benignos, isto é, adenomas adrenocorticais (ACA), e que podem ser funcionantes ou não. Os adenomas funcionantes são diagnosticados por causa das alterações hormonais que eles promovem, e estão frequentemente associados à Síndrome de Cushing ou virilização ⁹. Os tumores malignos, carcinomas adrenocorticais (ACC), são mais raros e de prognóstico restrito, com incidência de 1-2 casos por milhão. Cerca de 50% dos carcinomas são funcionantes e 95% tem mais de 5 cm ¹⁰⁻¹². O tratamento para pacientes com ACC é a ressecção cirúrgica completa, que está associada a bom prognóstico, e administração do adrenolítico mitotano, no entanto, a probabilidade de reincidência do tumor é alta (70-80%) ¹³. O tratamento com o mitotano, que é derivado do inseticida DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), é a terapia química mais utilizada, porém causa reações neurológicas e gastrointestinais adversas ¹¹. Os níveis tolerados variam de 14–20 mg/dl e a dose comum tolerada é de 3-4 g por dia, sendo que a administração inicial deve ser de 2 g e o tratamento deve durar até 2 anos ¹⁰. Por isso, exames de urina devem ser realizados periodicamente para verificar a dosagem adequada para cada paciente ¹⁰.

O diagnóstico de massas adrenocorticais é realizado através da utilização de critérios anatomopatológicos estabelecidos por Weiss e conhecidos como os critérios ou score de Weiss, que utiliza nove parâmetros morfológicos: grau nuclear, elevada taxa mitótica, presença de mitoses atípicas, células claras constituindo 25% ou menos do tumor,

arquitetura difusa, necrose, invasão de estruturas venosas, invasão sinusoidal e invasão da cápsula tumoral. O tumor é considerado carcinoma se pelo menos três desses parâmetros forem identificados na biópsia adrenocortical ¹⁴. Embora os critérios tenham sido revisados para uma maior acurácia do diagnóstico, o sistema com os nove parâmetros ainda é usado habitualmente para o diagnóstico de ACTs, apesar de possuir limitações ^{15,16}. Estas restrições parecem ser mais significativas para diferenciar tumores benignos de malignos em pacientes pediátricos, pois mesmo os critérios histológicos malignos encontrados nesses pacientes não estão relacionados a um prognóstico ruim, enquanto tumores pequenos tem um prognóstico bom, independentemente das características malignas ¹⁷. Por isso, é importante que sejam identificados novos marcadores que facilitem o diagnóstico das massas adrenocorticais, principalmente em tumores pediátricos.

1.3 Tumores adrenocorticais pediátricos

Apesar dos tumores adrenocorticais serem raros e acometerem principalmente adultos acima de 30 anos, no Brasil, especialmente nos estados de São Paulo e Paraná, a incidência de tumores adrenocorticais em crianças é cerca de 10 vezes superior ao do restante do mundo ^{10,18}. A maioria destes pacientes são crianças do sexo feminino com menos de 4 anos e de uma maneira geral apresentam melhor prognóstico do que os pacientes adultos ^{10,18,19}. A alta incidência de ACT pediátricos no Brasil ocorre devido a uma mutação germinativa no gene *TP53* (R337H) ^{20,21}. O gene *TP53* é um reconhecido supressor de tumor, além de estar relacionado com o processo de reparo do DNA ²². Em 2001, foi comprovada a perda de heterozigosidade (LOH) no cromossomo 17p13, loco *TP53*, em 85% dos

carcinomas adultos, enquanto o mesmo não foi observado em ACAs ²³. Foram observadas mutações somáticas no gene *TP53* em até 33% dos carcinomas, entretanto apenas 6% dos adenomas apresentaram mutações ²⁴. Em ACTs pediátricos as mutações germinativas foram observadas em 68% dos 37 pacientes estudados, sendo que 12 pacientes eram brasileiros e apresentavam a mutação R337H. Em três pacientes que possuíam mutações germinativas em *TP53* também foram verificadas mutações somáticas (R175H, R273C) e deleção homozigota no cromossomo 17 ²⁵. A mutação R337H em *TP53* parece estar relacionada apenas com o tecido adrenocortical, visto que pacientes com essa mutação não desenvolvem outros tipos de tumores. Essa especificidade pode ocorrer devido a troca de uma arginina por uma histidina que tornaria a proteína p53 parcialmente funcional, e dependente do pH do tecido ²⁶.

A análise de 254 pacientes pediátricos mostrou que a maioria dos casos de tumores adrenocorticais infantis ocorre no sexo feminino, e até o 3º ano de vida, enquanto a partir do 4º ano até o 12º ano de vida a distribuição torna-se igualitária entre os sexos. Também foi observado que os pacientes infantis apresentam mais virilização e, por consequência, características clínicas mais evidentes. Já os tumores adrenocorticais de jovens crianças ou adolescentes, estão mais associados à Síndrome de Cushing ou não são funcionantes. A completa ressecção cirúrgica é o melhor tratamento para tumores nessa faixa etária e o tamanho do tumor está fortemente relacionado ao risco de reincidência. Mas, de maneira geral, crianças com menos de 4 anos tem um melhor prognóstico quando comparadas às demais ¹⁹. Entretanto, ainda são poucos marcadores moleculares definidos para esta faixa etária. Entre os marcadores definidos está a expressão do receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (*IGF1R*) como fator de prognóstico em tumores pediátricos e outro

marcador relevante para ACTs pediátricos é o fator esteroideogênico 1 (SF-1)^{27,28}.

1.4 Fator Esteroideogênico 1 (SF-1/NR5A1)

O fator esteroideogênico 1 (SF-1) faz parte da superfamília de receptores nucleares, e está envolvido no desenvolvimento do tecido adrenocortical, pois está expresso no primórdio adrenogonadal e no córtex fetal e definitivo^{29,30}. No córtex adrenal definitivo tem como função o controle da expressão das enzimas envolvidas na produção de esteroides. Em tumores adrenocorticais adultos e pediátricos foi observado um aumento de cópias do gene *SF-1* de 10% e 47%, respectivamente. Enquanto a expressão da proteína SF-1 estava aumentada em 56% dos tumores pediátricos, nos tumores de adultos apenas 19% apresentavam essa proteína aumentada. No entanto, não houve diferença da expressão do gene *SF-1* entre carcinomas e adenomas, ou mesmo entre tumores funcionantes e não-funcionantes²⁸. Em tumores pediátricos a região do cromossomo 9q, que contém o gene NOTCH homólogo 1 (*NOTCH1*), que é um gene que codifica um receptor envolvido na via de sinalização Notch, importante durante o desenvolvimento, e que também contém o gene *SF-1*, está amplificada em 90% dos tumores adrenocorticais infantis, no entanto o mesmo não foi observado em ACTs adultos^{25,31,32}.

Em células de carcinoma adrenocortical humano, linhagem NCI-H295R, o aumento da expressão do gene *SF-1* aumentou a capacidade de proliferação dessas células. Em camundongos, a hiperexpressão de *SF-1* levou à hiperplasia adrenocortical e à formação de tumor, sugerindo que esse fator pode estar envolvido na tumorigênese do córtex adrenal³³. SF-1 regula a expressão de genes como o das enzimas esteroideogênicas CYP11A1 e CYP11B1, e é negativamente regulado por um fator

codificado pela região do cromossomo X associada ao sexo reverso e à hipoplasia adrenal congênita (DAX-1), que impede a ativação transcricional de *SF-1* nas gônadas^{34,35}. Na linhagem Y1 de células de tumores adrenocorticais de camundongo, foi observado que os fatores estimulatórios *upstream* 1 e 2 (USF-1 e USF-2) são capazes de se ligar à região E-box proximal de *SF-1* e estão envolvidos na estimulação da sua transcrição basal³⁶. Por outro lado, foi descrito que o fator de transcrição POD-1, também conhecido como Capsulina, Epicardina ou TCF21, foi capaz de se ligar à região promotora de *SF-1*, e regular negativamente sua expressão³⁷⁻³⁹.

1.5 O fator de transcrição TCF21/POD-1

TCF21 ou POD-1 é uma proteína regulatória do tipo helix-loop-helix básica (bHLH) expressa nos sítios de interação mesênquima-epitélio durante o desenvolvimento dos sistemas gastrointestinal, cardiovascular, respiratório e urogenital. Camundongos *knock-out* para *POD-1* morrem ao nascer por insuficiência pulmonar e cardíaca, além de apresentarem outros defeitos, o que mostra a importância desse fator no desenvolvimento embrionário⁴⁰⁻⁴⁴. Durante o desenvolvimento do primórdio adrenogonadal, as células mesenquimais que expressam a proteína do tumor de Wilms -1 (WT1) e SF-1 formarão a cápsula adrenal. Essas células apenas irão interromper sua diferenciação devido à expressão de POD-1, que por consequência irá inibir a expressão de SF-1. Por sua vez, na região subcapsular de glândulas adrenais adultas foi identificada uma população de células progenitoras similares ao primórdio adrenogonadal, que expressavam os genes *POD-1*, *WT1*, o gene codificante da proteína de ligação GATA 4 (*GATA4*) e o oncogene associado à glioma homolog 1

(*GLII*). Assim, *POD-1* seria um provável marcador de células-tronco adrenocorticais ^{45,46}.

1.6 *POD-1* em tumores adrenocorticais

Como citado anteriormente, *SF-1* pode ser reprimido por *POD-1*, que é capaz de se ligar diretamente na sequência E-box do promotor de *SF-1*, inibindo sua expressão endógena e, conseqüentemente, diminuindo a expressão das enzimas esteroidogênicas. A hiperexpressão de *POD-1* levou à diminuição da expressão de *SF-1* na linhagem NCI-H295R, células de carcinoma adrenocortical humano, e também na cultura secundária de carcinoma adrenocortical humano, células ACC-T36, obtida no nosso laboratório a partir de um fragmento de carcinoma de paciente adulto ³⁷. A relação entre *SF-1* e *POD-1* foi observada anteriormente em células de Leydig, onde *POD-1* supostamente reprime a expressão de *SF-1* por competir com USF-1, responsável pela transcrição basal deste gene. Neste trabalho, observou-se que as células de Leydig *knockout* para *POD-1* tiveram um aumento na expressão de *SF-1* e também um aumento de expansão deste grupo celular ³⁸. Em camundongos silenciados para *POD-1*, houve reversão de sexo e expressão anormal de *SF-1* no sistema urogenital ³⁹. Também foi observado que *POD-1* é capaz de se ligar em duas regiões do promotor do *Small Heterodimer Partner* (*SHP*), fator que regula negativamente o *Liver Receptor Homolog 1* (*LRH-1*) ⁴⁷. *LRH-1* é um receptor nuclear da mesma superfamília do *SF-1*, a subfamília Ftz-F1 ⁴⁸. *LRH-1* é importante para o desenvolvimento do pâncreas, do trato gastrointestinal e do fígado, e camundongos silenciados para este gene não são viáveis e morrem no estágio embrionário E7.5 ⁴⁹. *LRH-1* também regula o desenvolvimento e função dos ovários, principalmente no

metabolismo do colesterol⁵⁰. *LRH-1* também está envolvido no desenvolvimento de tumores intestinais e na capacidade de invasão em células de câncer de mama^{51,52}. Em conjunto, esses dados sugerem que *POD-1* pode ser um importante fator em células de carcinomas adrenocorticais e também em outros tipos de tumores.

Em trabalho anterior a expressão de *POD-1* foi analisada por ensaio de microarray (*Gene Expression Omnibus (GEO)* série GSE10927), em 10 amostras de tecido adrenocortical normal humano, 22 ACAs e 33 ACCs, e foi observado que *POD-1* está mais expresso em adenomas do que em carcinomas adultos. Foi também detectado através do *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes pathways (KEGG)* que 3 vias principais estão correlacionadas negativamente com *POD-1*: 1) ciclo celular; 2) mecanismos de controle do mRNA; 3) Biossíntese de glicosaminoglicanos heparan sulfato. Nove genes de controle do ciclo celular foram correlacionados negativamente com *POD-1*: tirosina 3-mono-oxigenase (*YWHAQ*), quinase de ponto de checagem 2 (*CHEK2*), fator de transcrição E2F2 (*E2F2*), complexo de reconhecimento de origem – subunidade 2 (*ORC2*), proteína quinase associada à fase S - 2 (*SKP2*), BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1 (*BUB1B*), ciclina A2 (*CCNA2*), ciclina B2 (*CCNB2*) e ciclina dependente de quinase 1 (*CDK1*). O que sugere o envolvimento de *POD-1* com o controle do ciclo celular^{37,53}.

1.7 O gene BUB1 budding uninhibited by benzimidazoles homologo beta 1 (*BUB1B*)

BUB1B, também chamado de *BUB1R*, é um gene que codifica uma quinase do checkpoint mitótico. *BUB1B* compõe o complexo de checkpoint mitótico juntamente com *BUB3*, *MAD2* e *CDC20*, e impede a progressão da mitose para a anáfase, bloqueando o complexo promotor da

anáfase enquanto não houver a correta ligação dos cinetócoros ao fuso mitótico⁵⁴⁻⁵⁶. O aumento da expressão de *BUB1B* foi correlacionado com a capacidade de invasão, ocorrência de metástase e com mau prognóstico em grupo de pacientes com câncer gástrico⁵⁷, ao mesmo tempo em que a expressão da proteína *BUB1B* também foi considerada como fator de prognóstico em adenocarcinomas da cabeça do pâncreas⁵⁸. Já a diminuição da expressão de *BUB1B* em camundongos reduziu a formação de novos tumores e diminuiu a ocorrência de metástase. Também foi observado em adenocarcinoma pulmonar que *BUB1B* estava hiperexpresso em pacientes em estágios avançados da doença. Quando comparado aos tecidos normais de pulmão, *BUB1B* estava mais expresso em 72% dos tumores, enquanto apenas 2,6% tinham mutações somáticas⁵⁹.

BUB1B foi considerado fator de prognóstico em tumores adrenocorticais humanos, pois a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* (quinase 1 induzida por PTEN), isto é, $\Delta\text{CtBUB1B} - \Delta\text{CtPINK1}$, mostrou-se bom marcador de sobrevida em pacientes com carcinoma adrenocortical. Pacientes com carcinoma que apresentavam a expressão combinada de *BUB1B* e *PINK1* menor que o ponto de corte igual a 6.32, apresentavam pior prognóstico do que os pacientes com expressão acima desse ponto de corte. Com isso, através da análise combinada de *BUB1B* e *PINK1* foi sugerido um subgrupo mais agressivo dentre os carcinomas adrenocorticais^{60,61}.

PINK1 foi identificado em 2001⁶². Normalmente, *PINK1* é clivado na mitocôndria após ser importado através de uma enzima conhecida como translocase da membrana externa da mitocôndria (TOM), portanto, é esperado que os níveis de *PINK1* sejam baixos quando a célula está em condições normais, e se torne elevado quando a mitocôndria estiver disfuncional⁶³. Foi observado em linhagens de câncer de mama que a expressão de *PINK1* diminuiu a apoptose e o crescimento celular⁶⁴. Em

massas adrenocorticais, a expressão de *PINK1* está reduzida em carcinomas mais agressivos ⁶⁰.

Assim, devido à limitação existente para distinguir tumores adrenocorticais e a dificuldade em prever o prognóstico em pacientes com carcinomas, analisamos a expressão de alguns genes relacionados aos tumores adrenocorticais. Essa análise talvez possa responder nossa hipótese de que a expressão de *POD-1* pode ter valor diferencial no diagnóstico de massas adrenocorticais, e que a expressão combinada dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* possam ser determinantes no prognóstico de pacientes com carcinomas do córtex da suprarrenal.

Conclusões

Tumores adrenocorticais adultos:

- a avaliação da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B* e *PINK1* em amostras de adenomas e carcinomas, mostrou que *POD-1* e *BUB1B* estão diferencialmente expressos em ACA e ACC de adultos, apesar de a correlação entre esses dois genes não ter sido comprovada experimentalmente.

- a expressão de *PINK1* não mostrou diferença significativa entre ACAs e ACCs adultos. Por sua vez, a análise da expressão combinada dos genes *POD-1* e *BUB1B* sugere que essa combinação pode ter valor prognóstico em pacientes com carcinoma adulto.

- a expressão relativa de *PINK1* e a expressão relativa de *IGF1R* foram correlacionadas positivamente em adenomas adultos e negativamente em carcinomas adultos, porém a relação entre esses dois genes ainda é desconhecida.

Tumores adrenocorticais pediátricos: com mais de 5 anos:

-a análise da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1* e *SF-1* mostrou que estes genes têm expressões similares em adenomas e carcinomas.

- os pacientes pediátricos com mais de 5 anos apresentaram sobrevida pior do que os pediátricos com menos de 5 anos e semelhante aos pacientes com carcinomas adultos. Porém, não foi possível definir um fator de diagnóstico para essa faixa etária.

- a expressão de *POD-1* e *IGF1R* está correlacionada positivamente em adenomas, enquanto que a expressão relativa de *SF-1* e *BUB1B* está correlacionada positivamente em carcinomas. São necessários mais estudos

com pacientes pediátricos dessa faixa etária para confirmar a correlação desses fatores.

Tumores adrenocorticais pediátricos: com menos de 5 anos:

- a análise da expressão dos genes *POD-1*, *BUB1B*, *PINK1* e *SF-1* mostrou que estes genes têm expressões similares em adenomas e carcinomas pediátricos.

- a análise da expressão combinada de *POD-1* e *SF-1* e de *POD-1* e *PINK1*, mostrou que esses fatores podem ter valor de diagnóstico em tumores pediátricos com menos de 5 anos, bem como a relação negativa em adenomas da expressão de *PINK1* e *IGF1R*. Essas correlações precisam ser experimentalmente investigadas para serem confirmadas.

Referências*

1. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia Básica*. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 398p
2. Gray HFRS. *Gray Anatomia*. 29ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara; 1998. 1103p
3. Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR. *Williams textbook of endocrinology*. 9ª ed. Philadelphia : Saunders; 1998. 517p
4. Ctvrtlik F, Koranda P, Tichy T. Adrenal disease: a clinical update and overview of imaging. A review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2014;158(1):23-34.
5. Lindsay JR, Nansel T, Baid S, Gumowski J, Nieman LK. Long-term impaired quality of life in Cushing's syndrome despite initial improvement after surgical remission. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(2):447-53.
6. Nieman LK. Cushing's syndrome: update on signs, symptoms and biochemical screening. *Eur J Endocrinol*. 2015;173(4):M33-8.
7. De Groot LJ, Beck-Peccoz P, Chrousos G, et al., editors. *Adrenal Insufficiency*. [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000 [Updated 2013 Nov 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279083/>
8. Funder JW, Carey RM, Fardella C, Gomez-Sanchez CE, Mantero F, Stowasser M, et al. Case detection, diagnosis, and treatment of patients with primary aldosteronism: an endocrine society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93(9):3266-81.
9. Kerkhofs TM, Roumen RM, Demeyere TB, van der Linden AN, Haak HR. Adrenal tumors with unexpected outcome: a review of the literature. *Int J Endocrinol*. 2015;2015:710514.
10. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, et al. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(3):667-80.
11. Aufforth RD, Nilubol N. Emerging therapy for adrenocortical carcinoma. *Int J Endocr Oncol*. 2014;1(2):173-82.
12. Ayala-Ramirez M, Jasim S, Feng L, Ejaz S, Deniz F, Busaidy N, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical outcomes and prognosis of 330 patients at a tertiary care center. *Eur J Endocrinol*. 2013;169(6):891-9.

* De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. [2011 Jul 15]. Available from: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

13. Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, Bentrem DJ, Winchester DJ, Kebebew E, et al. Adrenocortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. *Cancer*. 2008;113(11):3130-6.
14. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 1984;8(3):163-9.
15. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol*. 2002;26(12):1612-9.
16. Papotti M, Libe R, Duregon E, Volante M, Bertherat J, Tissier F. The Weiss score and beyond--histopathology for adrenocortical carcinoma. *Horm Cancer*. 2011;2(6):333-40.
17. Michalkiewicz EL, Sandrini R, Bugg MF, Cristofani L, Caran E, Cardoso AM, et al. Clinical characteristics of small functioning adrenocortical tumors in children. *Med Pediatr Oncol*. 1997;28(3):175-8.
18. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, DeLacerda L, Pianovsky MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999;84(3):1116-21.
19. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, et al. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. *J Clin Oncol*. 2004;22(5):838-45.
20. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(16):9330-5.
21. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbini MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001;86(10):4970-3.
22. Wasserman JD, Zambetti GP, Malkin D. Towards an understanding of the role of p53 in adrenocortical carcinogenesis. *Mol Cell Endocrinol*. 2012;351(1):101-10.
23. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, Coste J, Louvel A, Baudin E, et al. Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res*. 2001;61(18):6762-7.
24. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(1):13-28.
25. Pinto EM, Chen X, Easton J, Finkelstein D, Liu Z, Pounds S, et al. Genomic landscape of paediatric adrenocortical tumours. *Nat Commun*. 2015;6:6302.
26. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. *Nat Struct Biol*. 2002;9(1):12-6.

27. Almeida MQ, Fragoso MC, Lotfi CF, Santos MG, Nishi MY, Costa MH, et al. Expression of insulin-like growth factor-II and its receptor in pediatric and adult adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008;93(9):3524-31.
28. Almeida MQ, Soares IC, Ribeiro TC, Fragoso MC, Marins LV, Wakamatsu A, et al. Steroidogenic factor 1 overexpression and gene amplification are more frequent in adrenocortical tumors from children than from adults. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95(3):1458-62.
29. Val P, Lefrancois-Martinez AM, Veyssiere G, Martinez A. SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. *Nucl Recept.* 2003;1(1):8.
30. Hanley NA, Rainey WE, Wilson DI, Ball SG, Parker KL. Expression profiles of SF-1, DAX1, and CYP17 in the human fetal adrenal gland: potential interactions in gene regulation. *Mol Endocrinol.* 2001;15(1):57-68.
31. Assie G, Letouze E, Fassnacht M, Jouinot A, Luscap W, Barreau O, et al. Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet.* 2014;46(6):607-12.
32. Radtke F, MacDonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch. *Nat Rev Immunol.* 2013;13(6):427-37.
33. Doghman M, Karpova T, Rodrigues GA, Arhatte M, De Moura J, Cavalli LR, et al. Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. *Mol Endocrinol.* 2007;21(12):2968-87.
34. Morohashi K, Zanger UM, Honda S, Hara M, Waterman MR, Omura T. Activation of CYP11A and CYP11B gene promoters by the steroidogenic cell-specific transcription factor, Ad4BP. *Mol Endocrinol.* 1993;7(9):1196-204.
35. Ito M, Yu R, Jameson JL. DAX-1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. *Mol Cell Biol.* 1997;17(3):1476-83.
36. Harris AN, Mellon PL. The basic helix-loop-helix, leucine zipper transcription factor, USF (upstream stimulatory factor), is a key regulator of SF-1 (steroidogenic factor-1) gene expression in pituitary gonadotrope and steroidogenic cells. *Mol Endocrinol.* 1998;12(5):714-26.
37. Franca MM, Ferraz-de-Souza B, Santos MG, Lerario AM, Fragoso MC, Latronico AC, et al. POD-1 binding to the E-box sequence inhibits SF-1 and StAR expression in human adrenocortical tumor cells. *Mol Cell Endocrinol.* 2013;371(1-2):140-7.
38. Cui S, Ross A, Stallings N, Parker KL, Capel B, Quaggin SE. Disrupted gonadogenesis and male-to-female sex reversal in Pod1 knockout mice. *Development.* 2004;131(16):4095-105.
39. Tamura M, Kanno Y, Chuma S, Saito T, Nakatsuji N. 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.* 2001;102(1-2):135-44.
40. Quaggin SE, Vanden Heuvel GB, 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.* 1998;71(1-2):37-48.

41. Quaggin SE, Schwartz L, Cui S, Igarashi P, Deimling J, Post M, et al. The basic-helix-loop-helix protein pod1 is critically important for kidney and lung organogenesis. *Development*. 1999;126(24):5771-83.
42. Quaggin SE. Transcriptional regulation of podocyte specification and differentiation. *Microsc Res Tech*. 2002;57(4):208-11.
43. Lu J, Richardson JA, Olson EN. Capsulin: a novel bHLH transcription factor expressed in epicardial progenitors and mesenchyme of visceral organs. *Mech Dev*. 1998;73(1):23-32.
44. Lu J, Chang P, Richardson JA, Gan L, Weiler H, Olson EN. The basic helix-loop-helix transcription factor capsulin controls spleen organogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(17):9525-30.
45. Bandiera R, Vidal VP, Motamedi FJ, Clarkson M, Sahut-Barnola I, von Gise A, et al. WT1 maintains adrenal-gonadal primordium identity and marks a population of AGP-like progenitors within the adrenal gland. *Dev Cell*. 2013;27(1):5-18.
46. Bandiera R, Sacco S, Vidal VP, Chaboissier MC, Schedl A. Steroidogenic organ development and homeostasis: A WT1-centric view. *Mol Cell Endocrinol*. 2015;408:145-55.
47. Franca MM, Ferraz-de-Souza B, Lerario AM, Fragoso MC, Lotfi CF. POD-1/TCF21 Reduces SHP Expression, Affecting LRH-1 Regulation and Cell Cycle Balance in Adrenocortical and Hepatocarcinoma Tumor Cells. *Biomed Res Int*. 2015;2015:841784.
48. Becker-Andre M, Andre E, DeLamarter JF. Identification of nuclear receptor mRNAs by RT-PCR amplification of conserved zinc-finger motif sequences. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993;194(3):1371-9.
49. Pare JF, Malenfant D, Courtemanche C, Jacob-Wagner M, Roy S, Allard D, et al. The fetoprotein transcription factor (FTF) gene is essential to embryogenesis and cholesterol homeostasis and is regulated by a DR4 element. *J Biol Chem*. 2004;279(20):21206-16.
50. Mouzat K, Baron S, Marceau G, Caira F, Sapin V, Volle DH, et al. Emerging roles for LXRs and LRH-1 in female reproduction. *Mol Cell Endocrinol*. 2013;368(1-2):47-58.
51. Chand AL, Wijayakumara DD, Knowler KC, Herridge KA, Howard TL, Lazarus KA, et al. The orphan nuclear receptor LRH-1 and ERalpha activate GREB1 expression to induce breast cancer cell proliferation. *PLoS One*. 2012;7(2):e31593.
52. Schoonjans K, Dubuquoy L, Mebis J, Fayard E, Wendling O, Haby C, et al. Liver receptor homolog 1 contributes to intestinal tumor formation through effects on cell cycle and inflammation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(6):2058-62.
53. Giordano TJ, Kuick R, Else T, Gauger PG, Vinco M, Bauersfeld J, et al. Molecular classification and prognostication of adrenocortical tumors by transcriptome profiling. *Clin Cancer Res*. 2009;15(2):668-76.

54. Kim S, Yu H. Mutual regulation between the spindle checkpoint and APC/C. *Semin Cell Dev Biol.* 2011;22(6):551-8.
55. Sudakin V, Chan GK, Yen TJ. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *J Cell Biol.* 2001;154(5):925-36.
56. Lampson MA, Kapoor TM. The human mitotic checkpoint protein BubR1 regulates chromosome-spindle attachments. *Nat Cell Biol.* 2005;7(1):93-8.
57. Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(3):639-45.
58. Gladhaug IP, Westgaard A, Schjolberg AR, Burum-Auensen E, Pomianowska E, Clausen OP. Spindle proteins in resected pancreatic head adenocarcinomas: BubR1 is an independent prognostic factor in pancreatobiliary-type tumours. *Histopathology.* 2010;56(3):345-55.
59. Chen H, Lee J, Kljavin NM, Haley B, Daemen A, Johnson L, et al. Requirement for BUB1B/BUBR1 in tumor progression of lung adenocarcinoma. *Genes Cancer.* 2015;6(3-4):106-18.
60. de Reynies A, Assie G, Rickman DS, Tissier F, Groussin L, Rene-Corail F, et al. Gene expression profiling reveals a new classification of adrenocortical tumors and identifies molecular predictors of malignancy and survival. *J Clin Oncol.* 2009;27(7):1108-15.
61. Fragoso MC, Almeida MQ, Mazzuco TL, Mariani BM, Brito LP, Goncalves TC, 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.* 2012;166(1):61-7.
62. Unoki M, Nakamura Y. Growth-suppressive effects of BPOZ and EGR2, two genes involved in the PTEN signaling pathway. *Oncogene.* 2001;20(33):4457-65.
63. Greene AW, Grenier K, Aguilera MA, Muise S, Farazifard R, Haque ME, et al. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep.* 2012;13(4):378-85.
64. Berthier A, Navarro S, Jimenez-Sainz J, Rogla I, Ripoll F, Cervera J, et al. PINK1 displays tissue-specific subcellular location and regulates apoptosis and cell growth in breast cancer cells. *Hum Pathol.* 2011;42(1):75-87.
65. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, Chen TR, Triche TJ, Myers CE, et al. Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res.* 1990;50(17):5488-96.
66. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
67. Dube C, Bergeron F, Vaillant MJ, 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 Lett.* 2009;275(1):127-38.

68. Yang Z, Li DM, Xie Q, Dai DQ. Protein expression and promoter methylation of the candidate biomarker TCF21 in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2015;141(2):211-20.

69. Ye YW, Jiang ZM, Li WH, Li ZS, Han YH, Sun L, et al. Down-regulation of TCF21 is associated with poor survival in clear cell renal cell carcinoma. *Neoplasma.* 2012;59(6):599-605.

70. Wang J, Gao X, Wang M, Zhang J. Clinicopathological significance and biological role of TCF21 mRNA in breast cancer. *Tumour Biol.* 2015.

71. Dai Y, Duan H, Duan C, Zhou R, He Y, Tu Q, et al. Down-regulation of TCF21 by hypermethylation induces cell proliferation, migration and invasion in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016;469(3):430-6.

72. Scintu M, Vitale R, Prencipe M, Gallo AP, Bonghi L, Valori VM, et al. Genomic instability and increased expression of BUB1B and MAD2L1 genes in ductal breast carcinoma. *Cancer Lett.* 2007;254(2):298-307.

73. Ando K, Kakeji Y, Kitao H, Iimori M, Zhao Y, Yoshida R, et al. High expression of BUBR1 is one of the factors for inducing DNA aneuploidy and progression in gastric cancer. *Cancer Sci.* 2010;101(3):639-45.

74. Lee KS, Wu Z, Song Y, Mitra SS, Feroze AH, Cheshier SH, et al. Roles of PINK1, mTORC2, and mitochondria in preserving brain tumor-forming stem cells in a noncanonical Notch signaling pathway. *Genes Dev.* 2013;27(24):2642-7.

75. van der Merwe C, Jalali Sefid Dashti Z, Christoffels A, Loos B, Bardien S. Evidence for a common biological pathway linking three Parkinson's disease-causing genes: parkin, PINK1 and DJ-1. *Eur J Neurosci.* 2015;41(9):1113-25.

76. Pickrell AM, Youle RJ. The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron.* 2015;85(2):257-73.

77. O'Flanagan CH, Morais VA, Wurst W, De Strooper B, O'Neill C. The Parkinson's gene PINK1 regulates cell cycle progression and promotes cancer-associated phenotypes. *Oncogene.* 2015;34(11):1363-74.

78. O'Flanagan CH, Morais VA, O'Neill C. PINK1, cancer and neurodegeneration. *Oncoscience.* 2016;3(1):1-2.

79. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol.* 2003;162(2):521-31.

80. Seron-Ferre M, Jaffe RB. The fetal adrenal gland. *Annu Rev Physiol.* 1981;43:141-62.

81. Hui XG, Akahira J, Suzuki T, Nio M, Nakamura Y, Suzuki H, et al. Development of the human adrenal zona reticularis: morphometric and immunohistochemical studies from birth to adolescence. *J Endocrinol.* 2009;203(2):241-52.