

ANTONIO MARCONDES LERARIO

**Perfis de expressão de genes
relacionados a metástases em uma
coorte de pacientes adultos e
pediátricos portadores de neoplasias do
córtex da supra-renal**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Endocrinologia

Orientador: Prof. Dr. Chin Jia Lin

São Paulo

2008

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de
Hormônios e Genética Molecular LIM-42
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Aos pacientes, maior fonte de motivação para realização deste estudo

Aos meus pais

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação.

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. Wa ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Chin Jia Lin, que foi sem dúvida a pessoa que mais contribuiu para o aprendizado e aquisição das habilidades necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, além de todo o apoio, valiosas sugestões e supervisão que foram fundamentais em momentos críticos.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, pela onipresença em todas as etapas do desenvolvimento deste trabalho. Nunca faltaram incentivos, apoio e sugestões, que sem dúvida foram decisivos para o término desta tese.

À Dra. Emília Modolo Pinto e à amiga Helena Valassi, pelo importante auxílio com os experimentos, fundamentais para a obtenção de alguns resultados.

Aos demais amigos e funcionários do LIM 42 e da disciplina de Endocrinologia, em especial à Dra. Maria Cândida Villares Fragoso e à Dra. Sorahia Domenice, que contribuíram imensamente para meu aprendizado clínico.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

RESUMO

ABSTRACT

1. Introdução.....	1
1.1 Neoplasias do córtex da supra-renal.....	1
1.2 Diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas do córtex da supra-renal	3
1.2.1 Quadro clínico.....	3
1.2.2 Alterações radiológicas sugestivas de malignidade	4
1.2.3 Diagnóstico histopatológico	7
1.3 Fisiopatologia dos tumores do córtex da supra-renal.....	7
1.3.1 Mecanismos gerais da tumorigênese	7
1.3.2 Clonalidade.....	9
1.3.3 Instabilidade genômica.....	9
1.3.4 Genes Supressores Tumorais.....	10
1.3.4.1 Gene TP53.....	10
1.3.4.2 Gene MEN1.....	11
1.3.5 Fatores de Crescimento.....	13
1.3.5.1 <i>IGF2</i>	13
1.3.5.2 <i>FGFR4</i>	14
1.3.6 Fatores de transcrição.....	14
1.3.6.1 <i>GATA4</i> e <i>GATA6</i>	14
1.3.6.2 Gene <i>NR5A1</i>	17
1.4 Diagnóstico Molecular.....	17
1.5 Processo de disseminação metastática.....	18
1.5.1 Alterações na adesividade celular.....	19
1.5.1.1 Integrinas.....	20

1.5.1.2	Superfamílias das imuno-globulinas.....	20
1.5.1.3	Caderinas.....	21
1.5.2	Motilidade celular.....	22
1.5.3	Resistência a sinais pró-apoptóticos extracelulares	23
1.5.4	Proteólise da matriz extracelular.....	23
1.5.4.1	MMPs.....	24
1.5.4.2	ADAMS.....	25
1.5.4.3	Serina-proteases e sistema ativador do pasminogênio do tipo uroquinase (uPA).....	25
1.6	Invasão vascular: “intravasamento”.....	26
1.7	No espaço intravascular.....	26
1.8	Saída do espaço intravascular (extravasamento).....	27
1.9	Estabelecendo metástases.....	27
1.10	Disseminação metastática e carcinoma do córtex da supra-renal.....	28
2.	Objetivos.....	32
3.	Pacientes e métodos.....	34
3.1	Pacientes.....	34
3.2	Materiais e métodos.....	37
3.2.1	RNA referência de supra-renais.....	37
3.2.2	Extração de RNA e DNA dos tecidos tumorais.....	37
3.2.3	Extração de DNA de sangue periférico.....	39
3.2.4	Arrays de expressão.....	41
3.2.4.1	Descrição do experimento.....	41
3.2.4.2	Membrana.....	43
3.2.4.3	Síntese das seqüências-alvo de cRNA marcadas com biotina	55
3.2.4.4	Pré-hibridização e hibridização.....	58
3.2.4.5	Lavagem das membranas e ligação as streptavidina-fosfatase alcalina.....	58
3.2.4.6	Incubação com substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina	59
3.2.4.7	Digitalização da imagem e captura dos dados brutos de expressão.....	59

3.2.4.8	Análise dos dados do array de expressão.....	59
3.2.4.8.1	Normalização dos dados.....	59
3.2.4.8.2	Análise estatística.....	65
3.2.5	Análise de LOH da região 22q12.3.....	67
3.2.6	Análise de expressão da <i>MMP2</i>	68
3.2.6.1	Transcrição reversa.....	69
3.2.6.2	PCR.....	69
3.2.6.3	Aquisição do sinal e análise densitométrica.....	70
3.2.7	Análise da expressão dos genes <i>TIMP3</i> e <i>FN1</i> por PCR em tempo real.....	71
4.	Resultados.....	73
4.1	Análise global da expressão.....	73
4.2	Análise de grupamentos.....	79
4.3	Inferência comparativa das expressões gênicas.....	82
4.4	Análise de componente principal (PCA).....	86
4.5	Validação dos dados	92
4.6	Expressão da Gelatinase A.....	95
4.7	Análise de LOH da região 22q12.3.....	99
4.8	Marcadores moleculares e classificação das lesões.....	101
5.	Discussão.....	105
6.	Conclusões.....	118
7.	Referências.....	120

**LISTAS DE
FIGURAS E TABELAS**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Visão geral do experimento de array.....	42
Figura 2: Representação esquemática da membrana.....	44
Figura 3: Síntese das moléculas-alvo.....	57
Figura 4: Resultado de um experimento de array.....	74
Figura 5: Dispersão dos dados de expressão dos pacientes adultos.....	77
Figura 6: Dispersão dos dados de expressão dos pacientes pediátricos.....	78
Figura 7: Análise de grupamentos das amostras.....	81
Figura 8: Análise de componente principal dos pacientes adultos.....	88
Figura 9: Análise de componente principal dos pacientes pediátricos.....	90
Figura 10: Validação dos dados de expressão dos genes <i>TIMP3</i> e <i>FN1</i>	94
Figura 11: Expressão da <i>MMP2</i> nas amostras estudadas.....	96
Figura 12: Representação gráfica da expressão da <i>MMP2</i>	97
Figura 13: Comparação entre expressão da <i>MMP2</i> , tamanho tumoral e pontuação de Weiss.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes.....	36
Tabela 2: Descrição dos genes representados na membrana.....	45
Tabela 3: Primers e condições da PCR dos genes MMP2 e ciclofilina.....	70
Tabela 4: Genes diferencialmente expressos entre adenomas e carcinomas dos adultos.....	84
Tabela 5: Genes diferencialmente expressos pelos tumores pediátricos.....	85
Tabela 6: Estudo de LOH da região 22q12.3.....	100
Tabela 7: Análise de predição de classes dos genes diferencialmente expressos.....	103

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Lerario AM. Perfis de Expressão de Genes Relacionados a Metástases em uma Coorte de Pacientes Adultos e Pediátricos Portadores de Neoplasias do Córtex da Supra-renal [tese] Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008

O carcinoma do córtex da supra-renal (ACC) é uma neoplasia rara e de prognóstico sombrio. Embora estudos moleculares tenham explorado diversos aspectos relacionados à tumorigênese destas neoplasias, o conhecimento das vias relacionadas à disseminação metastática é restrito. O objetivo do presente estudo é avaliar a expressão de genes relacionados a metástases em uma coorte de pacientes portadores de tumores do córtex da supra-renal metastáticos e não-metastáticos, a fim de identificar vias envolvidas na disseminação metastática destas neoplasias, novos marcadores prognósticos e eventuais alvos terapêuticos.

Os perfis de expressão de 27 tumores do córtex da supra-renal de 15 pacientes adultos (8 ACC e 7 adenomas) e 12 pediátricos (5 metastáticos e 7 não-metastáticos) foram avaliados por um *array* de expressão contendo um painel de 113 genes que sabidamente estão envolvidos no processo de disseminação metastática de diversas neoplasias humanas. A análise de agrupamentos mostrou que adenoma dos pacientes adultos forma um grupo distinto dos demais tumores (ACC de adultos e tumores pediátricos). Os genes MMP11 e DENR foram identificados como diferencialmente expressos quando se compararam os adenomas e ACC de adultos. Na comparação dos tumores pediátricos nenhum gene foi diferencialmente expresso. Assim como a análise de agrupamento, a PCA utilizando grupo selecionado de genes também não foi capaz de partir os tumores pediátricos em subgrupos pela evolução. A expressão dos genes MMP2, TIMP3 e FN1 também foram avaliados por RT-PCR e foram concordantes com os dados gerados pelo *array* de expressão. O papel da LOH como causa da redução da expressão de TIMP3 foi estudado com tipagem de microssatélites. Em alguns casos, foi identificada LOH da região 22q13. Porém, em outros casos em que a expressão do TIMP3 foi bastante reduzida, não houve LOH. Em resumo, foram identificados aspectos moleculares importantes envolvidos na disseminação e metástases de neoplasias do córtex da supra-renal de adultos e crianças, bem como características biológicas deste processo. Diferentes padrões de expressão identificados em tumores metastáticos e não-metastáticos podem ajudar na predição do prognóstico.

Descritores: 1. Neoplasias das glândulas supra-renais/genética 2. Neoplasias das glândulas supra-renais/diagnóstico 3. Metástase neoplásica 4. Análise de seqüência com séries de oligonucleotídeos 5. Marcadores biológicos

ABSTRACT

Lerario AM. Expression Profiles of Metastasis-Related Genes in a Cohort of Childhood and Adult Adrenocortical Tumors [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2008

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare neoplasm with a poor prognosis. Although molecular studies have uncovered many aspects of ACC tumorigenesis, little is known about molecular pathways involved in metastatic spread. The objective of our study is to analyze the expression profile of metastasis-related genes in a cohort of metastatic and non-metastatic adrenocortical tumors in order to identify genes involved in the metastatic spread, as well as to find new prognostic markers. The expression profiles of 27 adrenocortical tumors from 15 adults (8 ACC and 7 adenomas) and 12 children (5 metastatic and 7 non-metastatic) were evaluated by an array of 113 known to be involved in human metastasis. Cluster analysis showed adult adrenocortical adenomas form a group distinct from other adrenocortical tumors (adult carcinomas and pediatric tumors). The comparison of adult adenoma and ACC revealed that *MMP11* and *DENR* were differentially expressed between these two groups while no gene was differentially expressed among pediatric adrenocortical tumors. Similarly to cluster analysis, Principal component analysis failed to identify partition amongst pediatric tumors categorized by their evolution. The expression data of *MMP2*, *TIMP3* and *FN1* genes by RT-PCR agreed with those generated by the arrays. LOH of 22q12.3 region was detected in some cases in which *TIMP3* down regulation was verified (but not in all cases). In conclusion, we have identified important aspects of molecular pathways and biological characteristics involved in metastatic spread of adrenocortical tumors. Distinctive patterns of gene expression between metastatic and non-metastatic tumors may help in prognosis prediction.

Descriptors: 1. Adrenal gland neoplasms/genetics 2. Adrenal gland neoplasms/diagnosis 3. Neoplasm metastases 4. Oligonucleotide array sequence analysis 5. Biological markers

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Neoplasias do córtex da supra-renal

Os tumores do córtex da glândula supra-renal são neoplasias comuns em seres humanos. A prevalência aumenta com a idade, podendo atingir até 9% dos indivíduos acima de 50 anos, conforme verificado por estudos de necrópsias. Até 6% dos pacientes submetidos a exames radiológicos por motivos não relacionados, podem apresentar nódulos adrenais como achado incidental (1, 2). O carcinoma do córtex da supra-renal, no entanto, é uma entidade rara. Estima-se que sua incidência seja na ordem de 0,5-2 casos por milhão de habitantes, sendo responsável por 0,2% das mortes relacionadas ao câncer. Alguns estudos mostram uma predominância no sexo feminino. Foi relatada uma distribuição bimodal da incidência, de acordo com a idade. São descritos dois picos de incidência: um na infância, antes dos cinco anos, e outro na vida adulta, por volta da quarta e quinta décadas (3-6). No nosso meio, existe um particular interesse no estudo desta neoplasia. Nas regiões Sudeste e Sul do Brasil, foi notada uma incidência cerca de dezoito vezes a descrita na literatura para pacientes com idade inferior a 15 anos (7, 8). Durante muitos anos, hipotetizou-se que este fenômeno fosse causado por suposto poluente ambiental (9). Hoje se sabe que é decorrente de uma mutação germinativa do gene supressor tumoral *TP53* (R337H) que estes pacientes apresentam (como será visto adiante)

(10, 11). As manifestações clínicas dos carcinomas do córtex da supra-renal são decorrentes da hipersecreção hormonal (causando as síndromes de Cushing, virilizante, hiperaldosteronismo primário e feminização), de efeitos compressivos ou efeitos sistêmicos inespecíficos (febre, emagrecimento, comprometimento do estado geral). Em adultos, a maior parte dos casos de carcinomas é clinicamente não-funcionante e o diagnóstico tende a ser mais tardio. Os tumores não-funcionantes em crianças são raros (9, 12). Apesar da raridade, a doença é letal. A mortalidade em cinco anos está entre 15-47% (13). O fator prognóstico mais importante é o estadiamento, conforme proposto por MacFarlane (14) e modificado por Sullivan (15). Nos estádios I (tumor < 5 cm) e II (> 5 cm), o tumor está confinado aos limites da cápsula adrenal. Nos estádios III (invasão de órgãos adjacentes, linfonodos ou veia cava inferior) e IV (metástases à distância), a doença apresenta disseminação para além dos limites da glândula, fato que limita as possibilidades de cura cirúrgica. Os locais mais freqüentes de metástases do carcinoma do córtex da supra-renal são fígado, pulmões, ossos e sistema nervoso central (3). Infelizmente, cerca de 40%-70% encontram-se nos estádios III e IV ao diagnóstico, embora séries mais recentes tenham mostrado tendência a um diagnóstico em estádios mais precoces, provavelmente pela maior disponibilidade e melhor qualidade técnica dos exames de imagem (3, 5, 6, 16). O tratamento cirúrgico é a única modalidade terapêutica que inequivocamente tem um impacto positivo na sobrevivência. Porém, mesmo nos casos onde aparentemente se obtém uma ressecção cirúrgica completa, uma proporção significativa dos casos

apresentará recidiva ou metástases (27% dos pacientes em estágio I e 46% dos pacientes em estágio II) (6). Caso a ressecção cirúrgica não seja possível, outras opções terapêuticas incluem o agente adrenolítico mitotane, quimioterapia e radioterapia. Estas não parecem afetar a sobrevivência de forma significativa e possuem caráter apenas paliativo (17).

1.2 Diagnóstico diferencial entre carcinomas e adenomas do córtex da supra-renal

O diagnóstico definitivo de carcinoma só é estabelecido de maneira inequívoca quando há sinais clínicos ou radiológicos de disseminação da doença – presença de invasão de estruturas adjacentes ou metástases (estádios III e IV de MacFarlane). Nos estádios iniciais, o diagnóstico diferencial entre as neoplasias malignas e as benignas é uma tarefa difícil, uma vez que nessas situações o quadro clínico, radiológico e laboratorial pode ser muito semelhante. Visto que o tratamento das duas situações difere radicalmente, é fundamental que o diagnóstico seja preciso mesmo em estádios precoces.

1.2.1 Quadro Clínico

Clinicamente, a presença de síndromes mistas (síndrome de Cushing associada à síndrome virilizante) é sugestiva de malignidade (18). Este fato, do ponto de vista hormonal, é caracterizado pelo acúmulo de precursores androgênicos da biossíntese do cortisol (sobretudo DHEA e androstenediona). Isto ocorre devido aos carcinomas apresentarem diversos

defeitos nas enzimas relacionadas à esteroidogênese. Classicamente, os pacientes portadores de adenomas não apresentam níveis elevados de precursores (podem apresentar até níveis reduzidos devido à supressão do ACTH hipofisário e atrofia da adrenal contralateral) (13). Do ponto de vista de expressão gênica, as enzimas responsáveis pela esteroidogênese apresentam-se com níveis de expressão reduzidos quando comparadas aos adenomas. Um estudo recente demonstrou expressão reduzida de cinco destas enzimas (*StAR*, *CTP11A*, *CYP11B1*, *HSD3B1*, *CYP17* e *CYP21A2*) nos carcinomas (19).

1.2.2 Alterações Radiológicas Sugestivas de Malignidade

Embora não sejam critérios definitivos, algumas características de imagem podem sugerir o diagnóstico de carcinoma de supra-renal. De maneira geral, quanto maior o tamanho, maior a chance de um tumor ser maligno. Menos de 1% dos tumores menores que 4 cm são malignos, enquanto o diagnóstico de malignidade é feito em cerca de 15% dos tumores maiores que 6 cm. Segundo outro estudo, 92% dos carcinomas apresentam tamanho maior que 6 cm (20). Por essa razão, recomenda-se adrenalectomia para qualquer lesão adrenal maior que 5 cm (21). Por outro lado, carcinomas menores que 5 cm já apresentam metástases ao diagnóstico em aproximadamente 15% dos casos (22), indicando a imprecisão do critério tamanho como único parâmetro a ser observado para orientar decisões terapêuticas. De uma forma geral, algumas características radiológicas podem ser sugestivas (mas não definitivas) de malignidade. Os

carcinomas tendem a apresentarem bordas irregulares, contornos grosseiros e conteúdo heterogêneo. Além disso, 30% podem apresentar calcificações no interior, bem como áreas císticas correspondentes à hemorragia. Já os adenomas são estruturas arredondadas, com bordas lisas e conteúdo homogêneo (23). Algumas propriedades biológicas de alguns adenomas os fazem comportar de maneira diferente dos carcinomas nos exames de tomografia computadorizada e ressonância magnética. O conteúdo de lipídeos citoplasmáticos é maior nos adenomas, enquanto o conteúdo hídrico é maior nos carcinomas. À tomografia computadorizada, a gordura apresenta um sinal de baixa intensidade, inferior à da água. Portanto, os adenomas tendem a apresentar uma atenuação radiológica menos intensa que as demais lesões das supra-renais, inversamente proporcional ao seu teor de lipídeos intracitoplasmáticos (24). Convencionou-se medir a intensidade do sinal à tomografia em unidades Hounsfield (HU). Estipulou-se que a água mede 0 HU, o ar -1000 HU e o tecido ósseo +1000 HU. Os valores de atenuação para diversos tecidos do organismo são lineares dentro deste espectro. De acordo com uma meta-análise que avaliou 495 tumores de supra-renais (272 benignos e 223 malignos) à tomografia não-contrastada, estabelecendo-se um ponto de corte de 10 HU, o diagnóstico de adenoma do córtex adrenal é efetuado com uma sensibilidade de 71% e especificidade de 98% (25). Até 30% dos adenomas apresentam densidade superior a 10 HU, o que impede a diferenciação entre estes e as lesões adrenais malignas. Nestes casos, o diagnóstico diferencial pode ser feito avaliando-se a densidade após 60 segundos e 15-30 minutos da injeção de

meio de contraste iodado. Tanto as lesões malignas quanto os adenomas captam rapidamente o contraste. Porém, a queda do sinal dos adenomas é mais rápida (26). Portanto, uma redução no sinal após 15-30 minutos superior a 40% é altamente sugestiva de adenoma (sensibilidade de 96% e especificidade de 100%) (27).

À ressonância magnética, considerando-se as características de imagem dos adenomas nas seqüências T2-spin-echo, gradient-echo pós-gadolíneo e chemical-shift imaging, o diagnóstico é feito com uma acurácia de 85-90% (27).

Um exame que provou ser útil no diagnóstico diferencial entre lesões das supra-renais malignas e benignas é tomografia por emissão de pósitrons com 18-fluodesoxiglicose (18-FDG). Os carcinomas do córtex da supra-renal e metástases de outras neoplasias captam 18-FDG, enquanto os adenomas não o fazem. Os estudos iniciais demonstraram sensibilidade, especificidade e os valores preditivos positivo e negativo deste exame próximos de 100%, embora estudos mais recentes mostraram captação de 18-FDG por adenomas e feocromocitomas. Porém, o exame é pouco disponível e caro, o que dificulta sua realização na prática clínica (27).

Em crianças, a diferenciação entre adenomas e carcinomas em estádios iniciais é ainda mais complexa. Não há estudos comparando diversas técnicas de imagem no diagnóstico diferencial, de tal forma que em muitas situações é virtualmente impossível estabelecer este diagnóstico diferencial baseado nos achados dos exames de imagem.

1.2.3 Diagnóstico Histopatológico

Atualmente, o diagnóstico de malignidade é feito por sistemas de classificação que são baseados em dados clínicos e histológicos (28-30). Em geral, estes sistemas apresentam uma acurácia semelhante. Um dos sistemas de classificação mais aceitos, a malignidade é baseada na presença de pelo menos quatro de nove achados histológicos (30). Embora apresente uma boa acurácia (em prever má evolução), existem algumas limitações: a dependência de um patologista experiente, a não-reprodutibilidade entre observadores diferentes (31) e a imprevisibilidade em casos limítrofes (presença de três dos critérios) (32). Além disso, o prognóstico em crianças é geralmente melhor e a presença de quatro ou mais critérios não necessariamente são preditores de má evolução (33, 34). Um sistema de classificação mais preciso seria de grande utilidade clínica. Com este objetivo, nos últimos anos, foram estudados diversos marcadores imuno-histoquímicos e moleculares, mas até o momento, nenhum deles mostrou-se melhor que os parâmetros anátomo-patológicos.

1.3 Fisiopatologia dos tumores do córtex da supra-renal

1.3.1 Mecanismos Gerais da Tumorigênese

De acordo com um modelo recente, a tumorigênese é o resultado de uma série de eventos mutacionais que se acumulam ao longo do tempo. Esses eventos conferem às células neoplásicas habilidades que as tornam capazes de se desvencilhar de mecanismos antitumorais inatos do

organismo. As células que passam por esse “processo evolutivo”, são capazes de realizar expansão clonal, dando origem aos tumores. Essas habilidades são enumeradas a seguir: auto-suficiência de sinais proliferativos, insensibilidade aos sinais anti-proliferativos, escape dos mecanismos pró-apoptóticos, potencial replicativo ilimitado, angiogênese sustentada e capacidade de invasão e disseminação à distância (metástases). É necessário um contexto de instabilidade genômica, fenômeno que torna possível o acúmulo das mutações necessárias para que as habilidades sejam adquiridas. Um ponto interessante é que uma vez que uma mesma habilidade pode ser gerada por um repertório de eventos totalmente diversos e uma vez que uma nova habilidade seja adquirida, pouco importa quais foram as alterações iniciais desencadeantes do processo (35). O grande divisor de águas (que diferencia uma neoplasia maligna de uma benigna) é a capacidade de invasão e metástases. Cerca de 90% das mortes relacionadas aos tumores sólidos são causadas pelas metástases (36). Em pacientes portadores de carcinoma da supra-renal, a presença de metástases é o fator que mais afeta negativamente o prognóstico. Nessa situação, a sobrevida em 5 anos é inferior a 10% (5). Apesar de sua grande importância clínica, os mecanismos moleculares envolvidos no processo de disseminação metastática são relativamente pouco estudados, se comparados a outros eventos na cascata da tumorigênese, onde grandes avanços foram obtidos nas últimas décadas (37, 38).

1.3.2 Clonalidade

Estudos de clonalidade mostraram que os carcinomas são monoclonais (39), sugerindo um evento genético intrínseco como iniciador do processo de tumorigênese, e não uma expansão policlonal causada por fatores estimuladores. Por outro lado, cerca de 50% dos adenomas são policlonais (40).

1.3.3 Instabilidade Genômica

Desde os primeiros estudos anátomo-patológicos é conhecido que os carcinomas da supra-renal apresentam diversas alterações morfológicas nucleares, como múltiplas figuras de mitoses atípicas e anisocariose. Estudos de citologia de fluxo e citogenética confirmam que os carcinomas apresentam alto grau de aneuploidia (41). Os mecanismos moleculares que causam estas alterações são pouco conhecidos, mas envolvem alterações em dezenas de genes (42). Como resultado desta instabilidade, são observados ganhos e perdas cromossômicos, bem como rearranjos e ampliações em determinadas regiões. Estudos de hibridização genômica comparativa (CGH) identificaram alguns desses eventos genéticos nos carcinomas da supra-renal. Perdas freqüentes foram identificadas nos cromossomos 1p, 2q, 11q, 17p, 22p, 22q e ganhos nos cromossomos 2, 4, 5 e 19. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva entre o número de alterações cromossômicas e o tamanho tumoral, consistente com a hipótese de as alterações genéticas vão sendo acumuladas com a progressão da doença (43-46). Em tumores pediátricos, observaram-se ganhos freqüentes na região 9q34 (47, 48). Pontos de perdas ou ganhos cromossômicos são

prováveis locais de genes supressores tumorais e oncogenes, respectivamente. Particularmente, as regiões 17p e 11q abrigam os supressores tumorais *TP53* e *MEN1* respectivamente, como será visto adiante. Perda de heterozigose (LOH) nestas regiões são eventos freqüentemente encontrados em carcinomas do córtex da supra-renal (49-51).

1.3.4 Genes Supressores Tumorais

1.3.4.1 Gene *TP53*

O *TP53* é um supressor tumoral que participa de processos de bloqueio do ciclo celular em resposta a estímulos genotóxicos e é capaz desencadear apoptose frente a lesões graves do genoma celular. Mutações somáticas deste gene estão presentes em cerca de 50% dos cânceres humanos (52). Algumas séries demonstraram mutações somáticas do *TP53* em 25%-82% dos casos de neoplasias do córtex da supra-renal (53-56). Contudo, um estudo recente mostrou uma discrepância entre a presença de mutações somáticas do *TP53* e LOH na região 17p13, sugerindo a presença de outro(s) supressor(es) tumoral(is) no local (57). Mutações germinativas do *TP53* causam a síndrome de Li-Fraumeni (LFS - OMIM #151623). Esta síndrome se caracteriza pela incidência de diversos tumores malignos em idade jovem nos indivíduos afetados. Dentro do espectro das neoplasias malignas que fazem parte da LFS, encontra-se o carcinoma do córtex da supra-renal, que acomete cerca de 4% dos portadores (58). Mutações germinativas do *TP53* são também freqüentemente associadas a tumores da

supra-renal pediátricos. Dados americanos e europeus indicam que 50%-80% das crianças com diagnóstico de tumores da supra-renal (não pertencentes a famílias portadoras de LFS), são portadoras de mutações germinativas do *TP53* (59, 60). Nas regiões sudeste e sul do Brasil foi identificada uma mutação específica do *TP53* (R337H) em 70%-90% dos casos de tumores adrenocorticais pediátricos (10, 11). Um estudo funcional demonstrou que em condições “fisiológicas” esta mutação pouco interfere com a estabilidade da proteína p53. Porém, em pH próximo a 8.0, há um desestabilização significativa da estrutura quaternária em relação à proteína selvagem (61). Após o nascimento, a zona fetal da glândula supra-renal (que no terceiro trimestre da gestação corresponde a aproximadamente 90% da massa da glândula) involui rapidamente por apoptose (62). Durante esse processo, ocorrem variações extremas de pH capazes de comprometer a função do p53 mutante (63). Com isso, hipotetizou-se que os tumores pediátricos sejam derivados da zona fetal, em decorrência de um processo de apoptose defeituoso. Isso explicaria o fato do primeiro pico de incidência dos tumores da supra-renal ocorrer nos primeiros anos de vida. De fato, existem algumas semelhanças entre a atividade esteroidogênica e os perfis globais de expressão gênica entre os tumores pediátricos e a glândula supra-renal fetal (8, 64, 65).

1.3.4.2 Gene *MEN1*

A NEM-1 (neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1 – OMIN 13100) é uma síndrome de herança autossômica dominante, caracterizada pela associação de hiperparatireoidismo primário, tumores hipofisários e do

pâncreas. Outras manifestações incluem tumores carcinóides brônquicos e tumores do córtex da supra-renal em até 40 % dos casos (66), a maior parte das vezes adenomas assintomáticos, embora haja descrição de casos de carcinoma. A síndrome é causada por mutações germinativas em heterozigose do gene *MEN1*. Mutações somáticas deste gene foram descritas em tumores esporádicos da paratireóide, pâncreas e hipófise. Porém, em tumores da supra-renal esporádicos malignos e benignos, foi encontrada apenas uma mutação em 30 casos estudados, embora LOH do locus 11q13 tenha sido observada em 90% dos carcinomas e 20% dos adenomas (67). Contudo, sabe-se que perdas no cromossomo 11 geralmente envolvem todo o seu braço longo, sugerindo a presença de outro(s) supressor(es) tumoral(is) na região. Um provável candidato foi recentemente identificado por nosso grupo em um estudo de *differential display*¹. Trata-se do gene *BCSC-1*, um supressor tumoral situado na região 11q23-q24 e recentemente descrito. Cerca de 80% das linhagens celulares de diversas neoplasias estudadas mostram LOH da região e perda da expressão deste gene (68). Dados relativos à expressão do *BCSC-1* em neoplasias do córtex da supra-renal de pacientes adultos mostram uma menor expressão nos carcinomas, em relação aos adenomas, apontando um possível papel deste gene na fisiopatologia dos tumores da supra-renal.

¹ Gouvea, MN, 2007 – tese de doutorado

1.3.5 Fatores de Crescimento

1.3.5.1 *IGF2*

O fator de crescimento semelhante à insulina 2 (*IGF2*) foi relacionado ao processo de tumorigênese adrenal, após a *elucidação* do mecanismo fisiopatológico da síndrome de Beckwith-Wiedemann (BWS – OMIM #130650). A BWS é um distúrbio do crescimento somático caracterizado por macroglossia, organomegalia, anomalias no desenvolvimento e tumores embrionários (destacam-se o tumor de Wilms, o neuroblastoma e o hepatoblastoma e o carcinoma do córtex da supra-renal). O mecanismo molecular causador são anomalias estruturais (genéticas e epigenéticas) na região 11p15, levando a uma alteração de *imprinting* que resulta em expressão bialélica do *IGF2* e silenciamento de dois genes envolvidos no controle do ciclo celular: o *H19* e o *p57kip2*. Em carcinomas adrenocorticais esporádicos, foi demonstrada hiperexpressão de *IGF2* em cerca de 90% dos casos. O principal defeito molecular que leva à hiperexpressão do *IGF2* nos tumores esporádicos é a isodissomia paterna do locus 11p15 (deleção do alelo materno e duplicação do paterno, detectada por LOH deste locus). Menos freqüentemente tem sido demonstrado o *imprinting* anômalo do alelo materno (69). Recentemente, estudos independentes de expressão global por *microarray* em tumores do córtex da supra-renal validaram estes dados, demonstrando que o *IGF2* é um dos transcritos hiperexpressos mais abundantes nos carcinomas (19, 65, 70-72). Os efeitos tróficos do *IGF2* nos

tumores adrenocorticais são mediados pelo receptor tipo 1 de IGF (*IGFR1*). Expressão aumentada deste receptor também foi demonstrada (73).

1.3.5.2 *FGFR4*

O receptor do tipo 4 ao fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*) é um receptor do tipo tirosina-quinase. Estudos recentes mostraram aumento da expressão deste receptor em neoplasias do córtex da supra-renal de pacientes adultos e pediátricos (19, 65). É sabido que o *bFGF*, um potente mitógeno e fator angiogênico para a glândula supra-renal fetal é capaz de ativar o *FGFR4* (62). O mecanismo de hiperexpressão do *FGFR4* nos tumores da supra-renal é desconhecido. Um dos mecanismos descritos de hiperexpressão deste receptor é através da amplificação gênica (74). Os estudos de CGH realizados em carcinomas do córtex da supra-renal mostraram a existência de ganhos freqüentes no cromossomo 5, tanto em adultos quanto em crianças. Um estudo realizado por nosso grupo confirmou o aumento da expressão desse gene². Em pacientes adultos, os níveis de expressão do *FGFR4* pelos carcinomas foram significativamente superiores aos dos adenomas.

1.3.6 Fatores de Transcrição

1.3.6.1 *GATA4* e *GATA6*

Os fatores de transcrição da família GATA são proteínas relacionadas à organogênese, proliferação e diferenciação celular e apoptose em

² Brito, LP, Endocrine Society meeting, 2007, Toronto

diferentes tecidos. Existem 6 representantes desta classe de fatores de transcrição, que apresentam em comum uma estrutura de dedo de zinco, altamente conservada entre as espécies. Os fatores GATA 1, 2 e 3 predominam no tecido hematopoiético, enquanto os fatores GATA 4, 5 e 6 são expressos em pulmões, fígado, trato gastro-intestinal, hipotálamo, gônadas, adrenais e pituitária (75, 76). Nas gônadas, aumento na expressão de *GATA4* acompanha períodos onde há aumento da proliferação das células de Sertoli e granulosa e a estimulação de tecido ovariano imaturo por gonadotrofinas resulta em aumento da expressão de *GATA4* (77, 78). O *GATA4* parece proteger as células da granulosa da apoptose e níveis reduzidos de expressão associam-se à atresia folicular (79). Nas supra-renais, tanto em ratos como em humanos, há expressão do *GATA4* principalmente no período fetal, enquanto o *GATA6* é expresso tanto no período fetal quanto em adultos (80). Em um modelo murino que desenvolve espontaneamente tumores do córtex da supra-renal, há abundante expressão do *GATA4* no tecido tumoral, acompanhada por baixos níveis do *GATA6* (81). Um estudo recente avaliou a expressão dos fatores de transcrição *GATA4* e *GATA6* em tumores do córtex da supra-renal humanos malignos e benignos. Porém, diferentemente do que ocorre no modelo animal, tanto as supra-renais normais estudadas, quanto a linhagem de células tumorais e os tumores, apresentaram expressão de *GATA6* positiva. Expressão de *GATA4* também foi detectada nas glândulas normais e células NCIH295A. Tanto os tumores malignos quanto os benignos expressaram *GATA4*, mas os primeiros apresentaram níveis de expressão

significativamente mais elevados. Também foi notável uma relação inversa entre a expressão de *GATA4* e a do receptor de LH. Houve também uma menor expressão do *GATA6* pelos tumores malignos, comparados aos benignos e adrenais normais. Baseados nos dados de expressão do *GATA4*, foi proposto um ponto de corte capaz de separar os tumores malignos dos benignos, com alguns falso-negativos (4 de 10 tumores malignos) (82). Um estudo posterior avaliou a expressão do *GATA6* em tumores do córtex da supra-renal benignos e malignos através de imuno-histoquímica e *northern-blotting*, correlacionando a expressão deste fator com o *sterodogenic factor-1* (*SF-1*), *CYP17* e p21 (83). Em geral, foram encontrados menores níveis de expressão do *GATA6* pelos carcinomas (exceto os tumores virilizantes, que expressavam os maiores níveis dentre os tumores malignos). Houve uma relação inversa entre o score de Weiss e o nível de expressão do *GATA6*, bem como uma relação direta entre seus níveis de expressão e os do *CYP17*, sugerindo a importância do fator na manutenção da diferenciação celular. Foi notada também relação direta entre o nível de expressão de *SF-1* e o do *GATA6*, mostrando a inter-relação entre as duas proteínas, conforme previamente sugerido na literatura (83). Os fatores de transcrição da família GATA, portanto, além de apresentarem papel importante no desenvolvimento e na regulação da proliferação e diferenciação celular da adrenal adulta, parecem também estar envolvidos no processo de tumorigênese da supra-renal, afetando principalmente os processos de diferenciação celular e apoptose.

1.3.6.2 gene *NR5A1*

Estudos de CGH independentes em tumores pediátricos mostraram ampliações freqüentes na região 9q34, sugerindo a presença de um suposto oncogene (47, 48). Um candidato óbvio, o oncogene *ABL1*, foi demonstrado não estar amplificado (84). O gene *NR5A1* encontra-se na região 9q33.3 e codifica a proteína *sterodogenic factor-1* (SF-1), membro da superfamília dos receptores nucleares e que apresenta papel fundamental durante o processo de organogênese da supra-renal, além de participar do controle da expressão de enzimas da esteroidogênese (85). Foi demonstrado que o gene encontra-se amplificado em tumores pediátricos (84). Além disso, os níveis de expressão da proteína são significativamente superiores aos da supra-renal normal (86). Um estudo posterior demonstrou o papel proliferativo e anti-apoptótico em um modelo experimental de hiperexpressão deste gene em células NCI295R (87).

1.4 Diagnóstico Molecular

O papel de algumas das alterações descritas anteriormente como marcadores prognósticos foi avaliado recentemente em casuísticas de tumores adrenocorticais em diferentes estadios. Tanto LOH das regiões 17p13 e 11p15 quanto hiperexpressão de *IGF2* estiveram associados a um maior risco maior de recorrência após a ressecção cirúrgica completa de tumores em estadios iniciais (88). Contudo, um estudo recente mostrou que nos carcinomas adrenocorticais metastáticos, a presença de LOH nas

regiões 17p13 e 11p15, bem como a hiperexpressão de IGF2, não estão associadas a uma pior sobrevida (89). Isto parece sugerir que apesar destas alterações terem um papel estabelecido nas etapas iniciais da tumorigênese, onde conferem às células neoplásicas mecanismos para escape dos mecanismos de controle do ciclo celular e auto-suficiência de fatores proliferativos, seu papel nas etapas posteriores da progressão da doença é secundário.

1.5 Processo de disseminação metastática

Uma vez que novas evidências sugerem que a disseminação de uma neoplasia pode ser um fenômeno mais precoce que se achava (90), o conhecimento acerca dos mecanismos moleculares responsáveis pela disseminação metastática poderia proporcionar a identificação de marcadores prognósticos. Diversas etapas no processo de disseminação metastática podem ser apontadas. A disseminação de uma neoplasia pode ser visto como um processo de evolução somática resultante de uma série de pressões seletivas imposta por mecanismos antitumorais inatos do próprio organismo. Estes incluem mecanismos intrínsecos à própria célula, como a maquinaria de controle do ciclo celular e indução de apoptose e os impostos pelo microambiente, como barreiras físicas (membranas basais e componentes da matriz extracelular), falta de aporte de nutrientes e fatores de crescimento, geração de radicais livres, sinais pró-apoptóticos e ataque por células do sistema imunológico (36). Todos os dias, milhões de células neoplásicas são lançadas na circulação, mas só uma mínima fração

consegue estabelecer metástases. Portanto, as células derivadas de uma lesão metastática, são descendentes de uma célula extremamente rara do tumor primário, que foi capaz de expressar todos os genes necessários para completar o processo (91).

Algumas características gerais das neoplasias metastáticas podem ser apontadas. Uma peça fundamental é a instabilidade genômica. Um processo de evolução somática pressupõe um grupo de células geneticamente heterogêneo, das quais as mais adaptadas possam ser selecionadas. Essa heterogeneidade é conferida pela instabilidade genômica, que leva a um processo de mutagênese acelerada – mutações, rearranjos cromossômicos e fenômenos epigenéticos (91). Esta instabilidade genômica é um fenômeno precoce no processo de tumorigênese. Algumas mutações de supressores tumorais conhecidos parecem ser importantes não só para iniciar o processo da tumorigênese, como também para deflagrar a instabilidade genômica, que mais tarde proporcionará o processo evolutivo que levará a neoplasia a se disseminar (92, 93).

1.5.1 Alterações na adesividade celular

Comparado aos epitélios normais, os carcinomas tendem a apresentar adesividade intercelular reduzida. Também são descritas alterações entre a dinâmica de adesões com a matriz extracelular bem como outros tipos de células. Alterações na expressão de moléculas de adesão podem fazer parte de um processo mais amplo conhecido como transição epitélio-mesênquima, a exemplo do que ocorre durante o processo da

embriogênese. As alterações nas propriedades adesivas das células neoplásicas as permitem desobedecer as regras que regem a manutenção da integridade arquitetural de cada tecido e progredir em direção ao fenótipo maligno (94). São descritas alterações nas três principais classes de moléculas de adesão:

1.5.1.1 Integrinas

Grupo de proteínas diméricas de membrana, composta por uma subunidade alfa e uma subunidade beta. Existem descritas pelo menos 18 tipos diferentes de subunidades alfa e 8 subunidades beta. Foram descritos pelo menos 24 heterodímeros diferentes, cada qual com especificidades a ligantes diferentes e vias de sinalização intracelulares específicas. São mediadores de interações entre as células e elementos da matriz extracelular e também regulam vias de sinalização que controlam alterações dinâmicas do citoesqueleto, reponsáveis por processos de motilidade celular (95). Além disso, vias de sinalização responsáveis por sinais proliferativos ou anti-apoptóticos também podem ser regulados pela interação das integrinas com elementos da matriz extracelular (95-97).

1.5.1.2 Superfamília das imuno-globulinas

As moléculas de adesão desta família são mediadoras de ligações cátion-independentes homofílicas ou heterofílicas e também atuam como receptores para integrinas e proteínas de matriz extracelular. Seu papel vai além de organizar as células em estruturas estáticas. São também mediadores bidirecionais de trocas de informações entre duas células,

através da transdução de sinais intracelulares devido à interação de suas regiões citoplasmáticas com quinases e com receptores de fatores de crescimento (98). A hiperexpressão de alguns membros desta família está associada à progressão de alguns tipos de câncer. Por exemplo, foi demonstrado que o aumento da expressão do NCAM está associado com a fase de crescimento em profundidade e com a progressão para a doença metastática dos melanomas (98, 99).

1.5.1.3 Caderinas

São moléculas que medeiam adesão entre duas células. A interação entre o domínio extracelular das E-caderinas formam as junções aderentes, entre duas células e são mediadores do processo de inibição por contato da proliferação celular (100). Perda ou redução na expressão das E-caderinas estão associados com desdiferenciação celular e maior agressividade na maioria dos carcinomas e tem papel prognóstico. O domínio citoplasmático das caderinas é o sítio de interação com as cateninas, que por sua vez ligam-se à actina do citoesqueleto. Diversos mecanismos moleculares que levam à perda da expressão das E-caderinas foram descritos, desde mutações germinativas a fenômenos epigenéticos (101, 102). A reconstituição da expressão destas moléculas está associada a uma reversão do fenótipo invasivo em diversos tipos celulares (103, 104). Além das E-caderinas, outros membros desta família apresentam alterações da expressão em câncer. A expressão das N-caderinas é capaz de aumentar a motilidade celular em diversas linhagens, tornando-as mais propensas a

invasão e metástases por favorecer a interação destas com fibroblastos e células endoteliais (105).

1.5.2 Motilidade celular

A disseminação de uma neoplasia necessariamente envolve um processo ativo de migração celular, que requer alterações dinâmicas do citoesqueleto, estabelecimento de novas interações entre as células e a matriz extracelular, proteólise localizada, contrações de miofilamentos e dissolução de adesões focais (106). Moléculas envolvidas na regulação da migração celular incluem as GTPases pequenas (Rho, cdc42 e Rac), proteases secretadas e ligadas às membranas celulares (como as metaloproteases), adesões focais contendo integrinas e os miofilamentos (96). Em cultura, células derivadas de neoplasias metastáticas movimentam-se mais rapidamente que o mesmo tipo celular originado de transformação in-vitro. Essa motilidade aumentada parece ter relação com a maior capacidade das células neoplásicas em estabelecer novas interações com elementos da matriz extracelular (107). A migração de uma célula neoplásica pode ser estimulada por fatores químicos do microambiente, como pH, hipóxia ou deprivação de nutrientes, por elementos da matriz extracelular e também por substâncias quimiotáticas, como fatores de crescimento e citocinas (36). Elementos da matriz extracelular quando degradados e solubilizados por enzimas proteolíticas são capazes de estimular a migração de células neoplásicas por quimiotaxia, acoplando a atividade proteolítica ao processo de migração (108). Outra forma com que os elementos da matriz

extracelular estimulam a migração é através de interações com os receptores de integrinas (97). As proteínas da matriz extracelular que sabidamente estimulam a motilidade são a vitronectina, trombospondina, colágenos tipo I e tipo IV e a fibronectina (109).

1.5.3 Resistência a sinais pró-apoptóticos extracelulares

Embora o processo de transformação neoplásica por si já confira às células resistência à apoptose, a progressão para um fenótipo metastático necessita de mecanismos de defesa contra fatores do microambiente capazes de induzir a morte celular. Estes fatores incluem deprivação de nutrientes, hipóxia, alterações em adesões extracelulares, mudanças no formato da célula durante o processo de invasão e exposição a novos microambientes. A expressão ectópica de fatores antiapoptóticos potentes como BCL2, BCL-XL e XIAP foi capaz de aumentar a eficiência do processo de metástases em diversos modelos experimentais (110). Outro mecanismo descrito em modelos experimentais e in-vivo é a perda da expressão da caspase 8, o que leva as células a adquirirem resistência à perda de adesão celular mediada por integrinas (111, 112).

1.5.4 Proteólise da matriz extracelular

As membranas basais são constituídas por um denso emaranhado de diversas glicoproteínas e proteoglicanos. É um componente essencial para que a estrutura arquitetural de um tecido seja mantida e ao mesmo tempo atuam como uma barreira física às células neoplásicas, que

necessariamente devem superá-la para que ocorra o processo de disseminação. A matriz extracelular promove suporte mecânico para migração e previne a indução de apoptose por anoikia. Remodelação da matriz através de proteólise é uma etapa fundamental em processos de invasão local, angiogênese, entrada e saída das células neoplásicas da circulação sanguínea, invasão de tecidos à distância e estabelecimento de metástases. Existem 6 classes de enzimas capazes de degradar elementos da matriz extracelular: as metaloproteases de matriz (MMPs), as serino-proteases de tecido, as proteases de membrana relacionadas à adamalisina (ADAMs), as metaloproteinases tipo BMP-1, as heparanases e as catepsinas.

1.5.4.1 MMPs

As MMPs são uma família de enzimas proteolíticas secretadas ou acopladas à membrana que apresentam um átomo de zinco em seu domínio catalítico. Atuam em cascatas de ativação, finamente reguladas por uma série de pontos de ativação e presença de inibidores. A maior parte destas enzimas é produzida por células do estroma, como fibroblastos ativados ou leucócitos recrutados. Sua expressão e atividade é induzida por citocinas, quimiocinas e da EMMPRIN produzida pelas células neoplásicas. Além de participar da proteólise dos elementos da matriz extracelular, é capaz de ativar outras enzimas proteolíticas, peptídeos e fatores de crescimento latentes. Além de romper barreiras físicas, a atividade destas enzimas é capaz de ativar diversos peptídeos que têm a capacidade de modular

migração celular, proliferação e sobrevivência celulares e angiogênese (96, 108).

1.5.4.2 ADAMs

As ADAMs são uma família de genes multifuncionais que têm um papel em diversos processos fisiológicos (113). São proteínas transmembranas que contêm domínios desintegrinas e metaloproteases (portanto, indicativos de processos de adesão celular e atividade catalítica). São capazes de clivar e liberar mais de 40 tipos de proteínas associadas a membranas celulares, entre elas citocinas, moléculas de adesão, fatores de crescimento e diversas outras proteases (114).

1.5.4.3 Serina-proteases e sistema ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (uPA)

A uPA e seus reguladores participam do fenótipo metastático de diversos tipos de câncer. A uPA é uma serina-protease que se liga ao seu receptor de membrana, uPAR. Esta ligação libera a atividade proteolítica da enzima, cujo principal substrato é o plasminogênio. Este é convertido em plasmina, enzima que apresenta atividade catalítica contra um amplo espectro de proteínas de matriz extracelular, além de ser capaz de ativar procollagenases e diversos fatores de crescimento latentes como o SF/HGF, bFGF e TGF-beta. Expressão aumentada dos componentes desse sistema foi documentada em diversos tumores malignos, geralmente em miofibroblastos (115, 116).

1.6 Invasão vascular: "intravasamento"

A angiogênese é um processo fundamental para a progressão tumoral. Os vasos neoformados não são apenas uma fonte de nutrientes, oxigênio e fatores de crescimento que permite o crescimento tumoral, mas também constituem vias pelas quais as células neoplásicas atingem a circulação sangüínea. (117, 118). Os mecanismos moleculares responsáveis por esse processo não são totalmente compreendidos. Um estudo recente mostrou que a hiperexpressão do gene *Twist*, um fator de transcrição associado à transição epitélio-mesênquima, aumentou as taxas de intravasamento. Não se sabe se este é um efeito específico ou simplesmente uma consequência do fato do gene *Twist* aumentar a motilidade celular como de maneira geral, propiciando que mais células se movimentem em direção aos vasos sangüíneos de acordo com gradientes quimiotáticos (107, 119).

1.7 No espaço intravascular

Uma vez que as células tumorais ganham acesso à circulação sangüínea, devem ser capazes de sobreviver a este ambiente hostil. O ambiente intravascular impõe uma série de ameaças às células neoplásicas, que vão desde forças hemodinâmicas até o ataque por células do sistema imunológico. Uma das estratégias adotadas pelas células neoplásicas é a de associarem-se às plaquetas, que por sua vez atuam como verdadeiros escudos, aumentando as chances de sucesso de um implante bem sucedido em algum leito capilar (120).

1.8 Saída do espaço intravascular (extravasamento)

Uma vez na circulação, as células neoplásicas serão semeadas por todo o organismo, de acordo com padrões de distribuição hemodinâmica. O processo de saída das células neoplásicas do ambiente intravascular pode ocorrer por forças mecânicas após crescimento da lesão metastática impactada em determinado leito capilar ou por alterações na permeabilidade vascular induzida nas células endoteliais por fatores secretados pelas próprias células cancerosas. Dentre estes, pode-se citar o próprio VEGF, que por sua vez induz ativação das quinases Src nas células endoteliais, levando à perda das junções célula-célula (121, 122).

1.9 Estabelecendo metástases

Após a saída da corrente sanguínea, são três os desfechos possíveis: as células permanecerão em estado de dormência, sem proliferar, haverá uma proliferação limitada pela incapacidade de realizar angiogênese (micrometástases) ou haverá progressão para metástases macroscópicas vascularizadas (118). Modelos experimentais mostram que cerca de 90% das células neoplásicas injetadas na corrente sanguínea são capazes de sair do sistema circulatório, penetrando no parênquima de outros órgãos. A imensa maioria entrará em apoptose ou permanecerão viáveis, mas em estado latente. Apenas 0,02% progredirá para metástases macroscópicas. (123, 124). O desenvolvimento de metástases vascularizadas dependerá da interação entre as células neoplásicas e o tecido em questão. Fatores locais

presentes nos diferentes órgãos parecem influenciar quais linhagens de células neoplásicas serão ou não capazes de se proliferar (125).

1.10 Disseminação metastática e carcinoma do córtex da supra-renal

Alguns dos processos descritos anteriormente têm sido cogitados como possíveis alvos terapêuticos para estratégias voltadas contra a disseminação metastática têm sido desenvolvidas (36, 118). Portanto, é fundamental o conhecimento dos mecanismos que participam do processo em determinada neoplasia. Nas neoplasias da supra-renal, o processo permanece obscuro em sua maior parte, uma vez que poucos estudos foram desenhados especificamente para abordar este tema. Duas metaloproteases – enzimas proteolíticas que atuam em diversas etapas do crescimento tumoral e disseminação metastática (108) – foram demonstradas hiperexpressas em carcinomas mas não nos adenomas, através de um estudo de hibridização in-situ (126) e mais recentemente por imunohistoquímica (127). Outros poucos estudos avaliaram a presença de genes relacionados às vias de metástases em carcinomas adrenocorticais. Angiogênese é uma etapa fundamental no processo de invasão tecidual e nas metástases. Altos níveis de expressão de VEGF-A e baixos níveis de trombospondina-1 (fatores pro e antiangiogênico, respectivamente) foram observados em 75% dos carcinomas adrenocorticais, em contraste com os adenomas (128). Outra via implicada no desenvolvimento de doença metastática é a via do *Wnt* (129). Em um estudo recente, acúmulos nuclear e citoplasmático anômalo de β -catenina, uma proteína da via *Wnt* envolvida

em processos de adesão e proliferação celulares, era freqüentemente observada em adenomas e carcinomas (10/26 and 11/13, respectivamente). Em 7 adenomas e 4 carcinomas foram identificadas mutações somáticas ativadoras do gene *CTNNB1* (130). Com o objetivo de adicionar conhecimentos a essa área, esta tese estuda a expressão de um painel de 113 genes sabidamente envolvidos em processos de invasão e metatástases em neoplasias humanas, através de um *array* de expressão via-específico, em tumores do córtex da supra-renal metastáticos e não-metastático de adultos e crianças.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 “Dissecar” molecularmente os mecanismos envolvidos na invasão tecidual e na disseminação à distância (metástases) de carcinomas de córtex adrenal pela avaliação da expressão de 113 genes que sabidamente participam de processos de invasão celular e disseminação à distância (metástases), em amostras de tecido tumoral de uma coorte de pacientes portadores de neoplasias do córtex adrenal.

2.2 Correlacionar os achados moleculares com a evolução de cada paciente, estabelecendo relações entre o perfil de expressão e o prognóstico da doença

2.3 Identificar as vias relevantes à invasão e metástase de carcinoma de córtex adrenal e testar o potencial destes como novos marcadores prognósticos.

PACIENTES E MÉTODOS

3. PACIENTES E MÉTODOS

3.1 Pacientes

Trinta pacientes portadores de neoplasias do córtex da supra-renal (17 adultos e 13 crianças - consideramos crianças pacientes com idade igual ou inferior a 16 anos) foram submetidos ao tratamento cirúrgico e acompanhados no ambulatório da Endocrinologia do Hospital das Clínicas da FMUSP. Os pacientes ou responsáveis assinaram termo de consentimento informado e o trabalho foi aprovado pelo comitê de ética da instituição. As características demográficas e clínicas, assim como a evolução dos pacientes encontram-se na Tabela 1. Dentre os adultos, 9 pacientes apresentavam uma pontuação de Weiss < 3 , sendo portanto classificados como adenomas. Destes, nos chama a atenção o paciente BA252, que apesar de uma pontuação de Weiss = 2, o tumor era maior que 5 cm, apresentava padrão heterogêneo à tomografia computadorizada e níveis séricos elevados de precursores da esteroidogênese, características sugestivas de carcinoma (dados não mostrados). Dentre os pacientes com pontuação de Weiss > 3 (n=8), cinco já apresentavam doença metastática ao diagnóstico (estadio IV). Destes, todos tiveram um desfecho fatal entre 6 meses e 3,8 anos. Dentre os pacientes com pontuação de Weiss > 3 que não apresentavam doença metastática ao diagnóstico, em dois (MA253 e MA258) era evidente a invasão de estruturas adjacentes – linfonodos e veia cava inferior – e, portanto, foram classificados como estágio III. O paciente

MA253 apresentou recorrência local e após um ano da primeira cirurgia acabou falecendo por progressão da doença. O paciente MA258 recebeu tratamento profilático com mitotane no pós-operatório por um período de nove meses. Evoluiu para insuficiência adrenal permanente e encontra-se sem sinais de recidiva após oito anos da cirurgia. O paciente MA256, classificado como carcinoma pela pontuação de Weiss, evoluiu bem, sem sinais de recidiva após 6 anos. Dentre as crianças (n=13), cinco pacientes apresentaram doença metastática. O paciente MC243 apresentava metástases pulmonares já ao diagnóstico. Foi submetido à ressecção cirúrgica do tumor primário e recebeu tratamento com mitotane associado a agentes quimioterápicos (cisplatina e etoposide). Apesar do tratamento, evoluiu ao óbito por progressão da doença. Os pacientes MC270 e MC269 apresentaram recidiva local e doença metastática no seguimento. Apesar de intervenções cirúrgicas e quimioterapia, evoluíram com progressão da doença e óbito. Os pacientes MC233 e MC268 apresentaram metástases pulmonares no seguimento. Foram submetidos à ressecção cirúrgica destas e encontram-se sem sinais de recidiva após 7 e 5 anos respectivamente.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes portadores de tumores da supra-renal

Paciente	Idade ao diagnóstico (anos)	sexo	Síndrome Clínica*	Tamanho (cm)	Estádio§	Pontuação de Weiss	Seguimento (anos)	Evolução
BC202	2,5	M	V	6,5	II	4	13	Sem recorrência
BC251	3	F	V	6	II	3	13	Sem recorrência
BC263	2,5	F	V	4,5	I	-	4	Sem recorrência
BC264	2	F	V	4,5	I	-	2	Sem recorrência
BC290	9	M	C	4,5	I	2	6	Sem recorrência
BC315	1,5	F	V	3	I	4	9	Sem recorrência
MC268	1	F	V/C	8	II	7	4	Metástase pulmonar após 1,5 anos
MC269	6	F	V/C	7	III	7	2,5	Recorrência local e óbito após 2 anos
MC243	15	F	V	18	IV	7	2	Doença progressiva ; óbito após 18 meses
MC233	2,5	M	V	5	II	7	7	Metástases pulmonares ressecadas, vivo após 8 anos
MC270	2,5	M	V	6	III	7	1	Metástases hepáticas e recorrência local ; óbito
BA147	38	F	IN	3,5	I	0	14	Sem recorrência
BA273	42	F	C	3	I	1	11	Sem recorrência
BA267	40	F	IN	2	I	0	9	Sem recorrência
BA297	36	F	V/C	2	I	3	6	Sem recorrência
MA148	21	F	V	13	IV	7	0,8	Óbito
MA253	30	M	F	10	III	4	1	Óbito
MA260	29	M	C	19	IV	8	0,5	Óbito
MA262	23	F	V/C	14	IV	6	1,3	Óbito
MA289	18	F	V	13	III	7	0,6	Óbito
MA281	44	F	V	18	IV	8	3,8	Óbito
BA252	28	F	V	6,7	II	2	2	Sem recorrência
BC257	2,3	F	V	2,5	I	5	4,5	Sem recorrência
BA254	37	F	C	4,5	I	1	8,5	Sem recorrência
MA256	49	F	V/C	15,5	II	4	6	Sem recorrência
MA258	45	F	C	10	III	7	9	Sem recorrência
BA259	50	F	V	4,5	I	3	4,5	Sem recorrência
TA001	33	F	C	6	II	0	1	Sem recorrência
TA002	24	F	C	3	I	2	11	Sem recorrência
TP002	2	F	V	5,2	II	7	4	Sem recorrência
TP001	1	M	V	4,5	I	5	14	Sem recorrência
TP003	2	M	V	6	II	5	6	Sem recorrência

*V: Virilização; C: Síndrome de Cushing; V/C: síndrome mista (virilização+Cushing); F: Feminização; IN: "incidentaloma"

§Estadiamento de acordo com a classificação de MacFarlane modificada por Sullivan

3.2 Materiais e Métodos

3.2.1 RNA referência de supra-renais

Como referência para comparações dos perfis de expressão gênica nos experimentos de *microarray* e real-time RT-PCR, foi utilizado um pool comercial de RNA de glândulas supra-renais de indivíduos normais. Este pool consiste em uma preparação comercial de RNA total (Human Adrenal Gland Total RNA, Clontech, Palo Alto, CA, lot. No. 1050635) proveniente de 62 indivíduos de ambos os sexos, com idades entre 15 e 61 anos de idade. É fornecido em suspensão alcoólica e, para o uso, uma alíquota deste preparado foi submetida à centrifugação para sedimentação do RNA precipitado. O “pellet” obtido foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em água livre de RNase.

3.2.2 Extração de RNA e DNA dos tecidos tumorais

Todos os reagentes e soluções utilizados na extração ou processamento do RNA são livres de RNase, conforme indicado pelos fornecedores. A água utilizada para o preparo das soluções necessárias no processo de extração foi tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), com a finalidade de se eliminar qualquer atividade de RNase. Foi adicionada a proporção (v/v) de 0,1% de DEPC em água Milli-Q. Após 12 a 18 horas de repouso, o DEPC foi inativado por autoclavagem (121 °C por 15 minutos).

Além disso, foram tomados outros cuidados para se evitar a degradação do RNA: tratamento da vidraria com calor seco (200 °C por 4 horas), uso de luvas para manipulação do instrumental, emprego de preparado comercial específico para eliminação de RNase (RNaseZap, Ambion, Austin TX) nas cubas de eletroforese e no instrumental utilizado na homogeneização dos tecidos.

Os fragmentos tumorais foram retirados de amostras congeladas em nitrogênio líquido desde o momento em que os pacientes foram submetidos à cirurgia. Estes foram imediatamente pesados e colocados em TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad CA), na proporção de 1 mL para cada 100 mg de tecido. Em seguida, procedeu-se a homogeneização dos tecidos através de homogenizador elétrico rotativo (Biospec Products, Bartlesville, OK) e a extração do RNA conforme o protocolo fornecido pelo fabricante do TRIZOL, como descrito a seguir: coloca-se o tecido homogenizado em TRIZOL em tubos Eppendorf de 1,5 mL e adiciona-se 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de TRIZOL. Após 15 segundos de agitação manual, é feita uma centrifugação. Observa-se a formação de três fases. Retira-se a fase aquosa (onde está o RNA total), transferindo-a para outro tubo. Adiciona-se isopropanol (0,5 mL para cada mL de TRIZOL) e após centrifugação (10 minutos a 20.000 g, a 2°C), observa-se a formação de um “pellet”, que corresponde ao RNA total precipitado. Em seguida, o “pellet” é lavado com etanol 75%, novamente centrifugado (7500 g por 5 minutos a 2 °C) e seco. Então, procede-se a dissolução do “pellet” resultante em 50 µL de água tratada com DEPC. Através de medidas espectrofotométricas, o RNA é

quantificado e a possível contaminação por proteínas é verificada. (considerou-se uma relação 260/280 OD medida em TE como satisfatória entre os valores de 1.8 e 2). Para verificação da integridade das amostras, foi feita eletroforese em gel de agarose 1%. Foram consideradas íntegras aquelas amostras que apresentaram as bandas ribossomais 18S e 28S intactas à visualização por transiluminação com luz ultravioleta após coloração com solução de brometo de etídio. As amostras foram conservadas a -80°C.

A extração do DNA tumoral foi feita nas mesmas amostras utilizadas para a extração do RNA, conforme o protocolo para extração de DNA fornecido pelo fabricante. Resumidamente, procede-se a retirada completa da fase aquosa da reação (que contém o RNA) e adiciona-se etanol 100% para a precipitação do DNA. Após centrifugação, retira-se a fase líquida (que posteriormente pode ser utilizada para extração de proteínas) e lava-se o “pellet” por três vezes com solução de etanol 10% contendo citrato de sódio 0,1M, intercalando com incubação em temperatura ambiente por 30 minutos e centrifugação a 2000g por 5 minutos a 2°C. Posteriormente, lava-se o “pellet” em etanol 75%, procede-se a secagem e ressuspensão em NaOH 8mM.

3.2.3 Extração de DNA de sangue periférico

A extração de DNA genômico de leucócitos foi realizada a partir de sangue periférico. Foram colhidos 15ml de sangue venoso em ácido etilenodiaminotetracético (EDTA 25mM).O *pellet* leucocitário foi obtido a

partir da lise dos glóbulos vermelhos utilizando-se a solução de lise (NH_4Cl 114mM, NH_4HCO_3 1mM) com incubação a 4°C por 30 minutos, seguida de centrifugação do material a 4°C por 15 minutos a 3000 rpm (Sorvall, RT7, Alemanha) desprezando-se o sobrenadante. Este procedimento foi repetido mais uma vez. O botão de células brancas foi então suspenso em 9 mL de solução de lise de glóbulos brancos (NaCl 150mM, Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 10mM pH 8,0) com 180 μL de dodecil sulfato de sódio a 10% (SDS) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e 150 μL de proteinase K (10 mg/mL) (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, EUA) e incubado a 37°C por 18 horas.

No dia seguinte, adicionou-se 3,6 mL de solução de NaCl 6M, agitou-se vigorosamente durante 15 segundos e centrifugou-se o material por 15 minutos a 3000 rpm. O sobrenadante foi transferido para um tubo novo e o DNA precipitado, acrescentando-se o dobro do volume de etanol absoluto gelado e homogeneizando-se cuidadosamente por inversão. O DNA precipitado foi retirado do tubo, em seguida lavado com etanol 70% durante 5 minutos. Repetiu-se a operação mais três vezes. Por último, o DNA foi lavado em etanol absoluto, seco por centrifugação à vácuo (Eppendorf, concentrator 5301, Alemanha) e ressuspenso em solução de TE (Tris-HCl 10mM pH 8,0, EDTA 0,1mM; pH 8,0).

A concentração do DNA foi estimada a partir da leitura da densidade óptica por espectrofotometria com luz ultravioleta (Ultrospec III - Pharmacia Biotech, EUA); o grau de pureza foi avaliado pela relação $A_{260/280}$ e a integridade do material verificada após eletroforese em gel de agarose 1%. As amostras foram armazenadas até sua utilização a 4°C.

3.2.4 Arrays de Expressão

3.2.4.1 Descrição do Experimento

Em linhas gerais, o experimento consiste em medir de maneira paralela, em cada uma das amostras, a expressão de 113 genes selecionados por participar de processos de invasão e metástases em diversas neoplasias humanas. Imobilizadas na membrana em posições conhecidas, estão oligonucleotídeos sintéticos com seqüências referentes a esses genes (chamadas de “sondas”). A partir do RNA total obtido das amostras tumorais, são sintetizadas moléculas de RNA complementar (cRNA) marcadas com biotina (chamadas de seqüências-alvo). A ligação entre as seqüências-alvo e as sondas imobilizadas na membrana ocorre de forma específica. Energia luminosa (quimioluminescência) é gerada por uma reação enzimática e será proporcional ao número de seqüências-alvo ligadas em cada posição da membrana. A intensidade da luminescência é então convertida em um valor numérico proporcional à expressão de cada gene. O experimento pode ser dividido nas seguintes etapas: síntese e purificação das seqüências-alvo marcadas, pré-hibridização das membranas, hibridização, lavagem, ligação da fosfatase alcalina conjugada à estreptavidina, incuacão com substrato quimioluminescente, captura do sinal, digitalização da imagem e extração dos dados numéricos. A Figura 1 representa uma visão geral do protocolo.

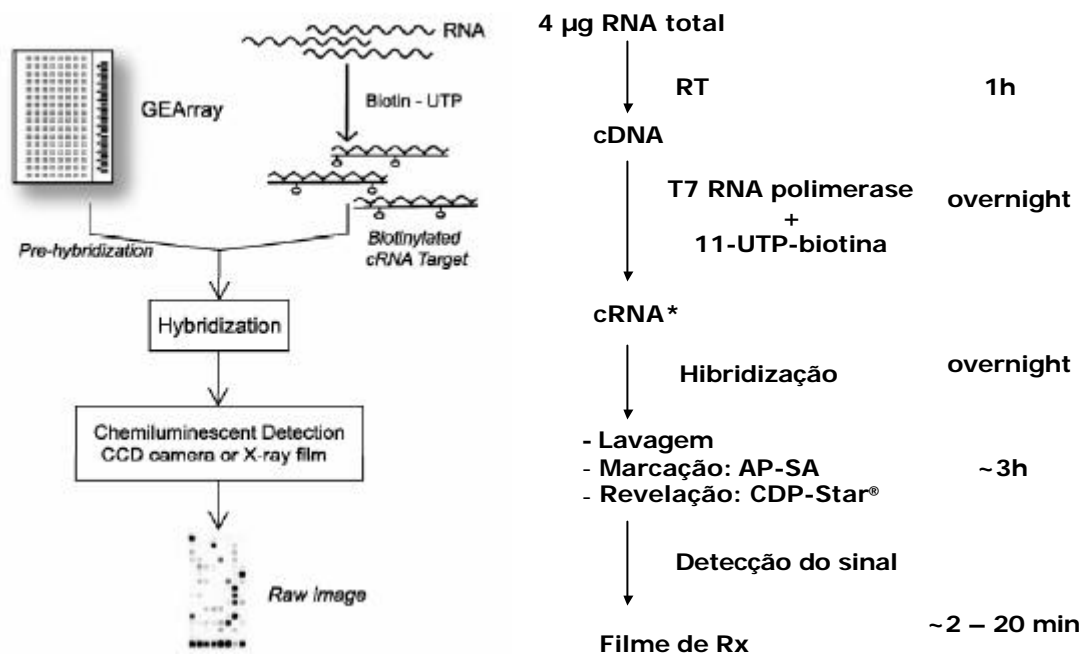


Figura 1: Visão geral do experimento desde a síntese das moléculas-alvo de cRNA até a detecção do sinal luminoso.

3.2.4.2 Membrana

Consiste em uma membrana de nylon (5 x 3,5 cm), contendo sondas específicas (oligonucleotídeos sintéticos de aproximadamente 60 pares de base) referentes a 113 genes envolvidos no processo de metástases, 4 genes constitutivos e controles negativos (seqüências não-humanas e spots em branco (Oligo GEArray Human Tumor Metastasis Microarray – OHS-028, SuperArray, Frederick, MD). As membranas vêm em um cilindro plástico com tampa móvel de 5 mL de capacidade, utilizado para o processo de hibridação das moléculas-alvo. A Figura 2 é uma representação esquemática da membrana. Na Tabela 3, encontram-se os genes e respectivas anotações funcionais. Estes genes participam de diversos processos biológicos que participam nas diversas fases da cascata metastática. Podem ser classificados em sete categorias, de acordo com suas funções e características estruturais, a saber: adesão celular, proteínas de matriz extracelular, genes do ciclo celular, crescimento e proliferação celulares, apoptose, fatores de transcrição e reguladores e outros genes relacionados às metástases.

RPS27A	APC	BAI1	BRMS1	CAV1	CCL7	CD44	CDH1
CDH11	CDH12	CDH19	CDH6	CDH8	CDK4	CDK2NA	CDH4
COL4A2	CST7	CTBP1	CTNNA1	CTNNA1	CTSK	CTSL	CXCL12
CXCR4	DCC	DENR	EPHB2	ETV4	ETV6	EWSR1	FAT
FGFR4	FLT4	FN1	FXDY5	GNRH1	GNRH2	GPNMB	KISS1R
GZMA	HDAC1	HGF	HPSE	HRAS	HTATIP2	IGF1	IL18
IL1B	IL8RB	ITGA7	ITGB3	CD82	KISS1	KRAS	LAMR1
MCAM	MDM2	MET	METAP2	MGAT5	MMP10	MMP11	MMP13
MMP2	MMP3	MMP7	MMP9	MTA1	MTA2	MTSS1	MYB
MYC	MYCL1	NF2	NME1	NME2	NME4	NR4A3	PCOLN3
PLAUR	PNN	PTEN	PTHLH	PTP4A3	RB1	RECK	RHOC
RORB	S100A4	SERPINB5	SET	SLPI	SMAD2	SMAD4	SRC
SSTR2	SYK	TCF20	TGFB1	TIAM1	TIAM2	TIMP2	TIMP3
TIMP4	TMPRSS4	TNFSF10	TP53	TPBG	TRPM1	TSHR	TWIST1
VEGF	VIL2	PUC18	Blank	Blank	AS1R2	AS1R1	AS1
GAPDH	B2M	HSPCB	HSPCB	ACTB	ACTB	BAS2C	BAS2C

- Adesão Celular
- Proteínas de Matriz Extracelular
- Ciclo celular
- Cresto. e prolif. celular
- Apoptose
- Fatores de Transcrição/Reguladores
- Outros

Figura 2: Representação esquemática da membrana e categorias funcionais dos genes

Tabela 2: Descrição dos genes representados na membrana quanto à sua localização e anotações funcionais

Posição	Identificador	Símbolo	Descrição	Anotação Funcional
1	NM_002954	RPS27A	Ribosomal protein S27a	Intracellular;Protein biosynthesis;Structural constituent of ribosome;Ribosome;
2	NM_000038	APC	Adenomatous polyposis coli	Cell adhesion;Signal transduction;Beta-catenin binding;Microtubule binding;Wnt receptor signaling pathway;Negative regulation of cell cycle;Protein complex assembly;
3	NM_001702	BAI1	Brain-specific angiogenesis inhibitor 1	Cell adhesion;Signal transduction;Protein binding;Negative regulation of cell proliferation;Integral to plasma membrane;Axonogenesis;Intercellular junction;G-protein coupled receptor activity;Neuropeptide signaling pathway;Peripheral nervous system development;Brain-specific angiogenesis inhibitor activity;
4	NM_015399	BRMS1	Breast cancer metastasis suppressor 1	Cellular_component unknown;Negative regulation of cell cycle;Molecular_function unknown;
5	NM_001753	CAV1	Caveolin 1, caveolae protein, 22kDa	Structural molecule activity;Integral to plasma membrane;Caveolar membrane;
6	NM_006273	CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	Signal transduction;Immune response;Inflammatory response;Extracellular space;Heparin binding;Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata);Cell-cell signaling;Chemokine activity;Calcium ion homeostasis;Chemotaxis;
7	NM_000610	CD44	CD44 molecule (Indian blood group)	Cell adhesion;Receptor activity;Membrane;Collagen binding;Hyaluronic acid binding;Cell-cell adhesion;Cell-matrix adhesion;Integral to plasma membrane;
8	NM_004360	CDH1	Cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	Integral to membrane;Calcium ion binding;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;
9	NM_001797	CDH11	Cadherin 11, type 2, OB-cadherin (osteoblast)	Integral to membrane;Calcium ion binding;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;Ossification;
10	NM_004061	CDH12	Cadherin 12, type 2 (N-cadherin 2)	Integral to membrane;Calcium ion binding;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;
11	NM_021153	CDH19	Cadherin 19, type 2	Integral to membrane;Calcium ion binding;Protein binding;Homophilic cell adhesion;
12	NM_004932	CDH6	Cadherin 6, type 2, K-cadherin (fetal kidney)	Integral to membrane;Calcium ion binding;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;
13	NM_001796	CDH8	Cadherin 8, type 2	Integral to membrane;Calcium ion binding;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;
14	NM_000075	CDK4	Cyclin-dependent kinase 4	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Regulation of cell cycle;Cyclin-dependent protein kinase activity;Protein kinase activity;G1/S transition of mitotic cell cycle;
15	NM_000077	CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	Nucleus;Negative regulation of cell cycle;Negative regulation of cell proliferation;Cell cycle arrest;Cell cycle;Cyclin-dependent protein kinase inhibitor activity;Regulation of cyclin dependent protein kinase activity;Kinase activity;Cell cycle checkpoint;

16	NM_001273	CHD4	Chromodomain helicase DNA binding protein 4	ATP binding;Nucleus;Zinc ion binding;Ubiquitin-protein ligase activity;Protein ubiquitination;Ubiquitin ligase complex;Regulation of transcription from Pol II promoter;Chromatin;ATP-dependent DNA helicase activity;Chromatin modification;Chromatin binding;Chromatin assembly or disassembly;Chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota);
17	NM_001846	COL4A2	Collagen, type IV, alpha 2	Cytoplasm;Extracellular matrix structural constituent;Phosphate transport;Collagen;Extracellular matrix organization and biogenesis;Collagen type IV;
18	NM_003650	CST7	Cystatin F (leukocystatin)	Immune response;Cysteine protease inhibitor activity;
19	NM_001328	CTBP1	C-terminal binding protein 1	Golgi apparatus;Protein amino acid phosphorylation;Nucleus;Oxidoreductase activity;Negative regulation of cell proliferation;Viral genome replication;Protein C-terminus binding;Oxidoreductase activity, acting on the CH-OH group of donors, NAD or NADP as acceptor;L-serine biosynthesis;
20	NM_001903	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), alpha 1, 102kDa	Structural molecule activity;Cell adhesion;Protein binding;Cytoskeleton;
21	NM_001904	CTNNA1	Catenin (cadherin-associated protein), beta 1, 88kDa	Plasma membrane;Structural molecule activity;Cell adhesion;Nucleus;Protein binding;Wnt receptor signaling pathway;Signal transducer activity;Regulation of transcription from Pol II promoter;Cytoskeleton;Transcription;Intercellular junction;
22	NM_000396	CTSK	Cathepsin K	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Lysosome;Cathepsin K activity;
23	NM_001912	CTSL1	Cathepsin L1	Hydrolase activity;Extracellular;Proteolysis and peptidolysis;Lysosome;Cathepsin L activity;
24	NM_000609	CXCL12	Chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	Cell adhesion;Signal transduction;Extracellular;Immune response;Inflammatory response;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Response to virus;Growth factor activity;Cell-cell signaling;Chemokine activity;Calcium ion homeostasis;Chemotaxis;Circulation;Regulation of actin polymerization and/or depolymerization;
25	NM_003467	CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	Integral to membrane;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Rhodopsin-like receptor activity;C-C chemokine receptor activity;C-X-C chemokine receptor activity;
26	NM_005215	DCC	Deleted in colorectal carcinoma	Negative regulation of cell cycle;Induction of apoptosis;Integral to plasma membrane;Transmembrane receptor activity;Axonogenesis;
27	NM_003677	DENR	Density-regulated protein	Cell growth and/or maintenance;Cellular_component unknown;Translation initiation factor activity;Translational initiation;
28	NM_004442	EPHB2	EPH receptor B2	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Neurogenesis;Transmembrane-ephrin receptor activity;
29	NM_001986	ETV4	Ets variant gene 4 (E1A enhancer binding protein, E1AF)	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Transcription factor activity;Transcriptional activator activity;

30	NM_001987	ETV6	Ets variant gene 6 (TEL oncogene)	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Cell growth and/or maintenance;Transcription factor activity;
31	NM_005243	EWSR1	Ewing sarcoma breakpoint region 1	Nucleic acid binding;Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Cell growth and/or maintenance;Zinc ion binding;Calmodulin binding;RNA binding;
32	NM_005245	FAT	FAT tumor suppressor homolog 1 (Drosophila)	Calcium ion binding;Structural molecule activity;Cell adhesion;Protein binding;Homophilic cell adhesion;Integral to plasma membrane;Cell-cell signaling;Morphogenesis;
33	NM_002011	FGFR4	Fibroblast growth factor receptor 4	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Protein-tyrosine kinase activity;Receptor activity;Integral to plasma membrane;Fibroblast growth factor receptor activity;Fibroblast growth factor receptor signaling pathway;
34	NM_002020	FLT4	Fms-related tyrosine kinase 4	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Receptor activity;Membrane;Integral to plasma membrane;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Vascular endothelial growth factor receptor activity;
35	NM_002026	FN1	Fibronectin 1	Cell adhesion;Extracellular;Oxidoreductase activity;Collagen binding;Extracellular matrix structural constituent;Heparin binding;Acute-phase response;Cell migration;Metabolism;Response to wounding;
36	NM_014164	FXYS5	FXYS domain containing ion transport regulator 5	Integral to membrane;Ion transport;Actin binding;Ion channel activity;Cadherin binding;Microvillus biogenesis;Negative regulation of calcium-dependent cell-cell adhesion;
37	NM_000825	GNRH1	Gonadotropin-releasing hormone 1 (luteinizing-releasing hormone)	Signal transduction;Extracellular;Negative regulation of cell proliferation;Development;Soluble fraction;Cell-cell signaling;Luteinizing hormone-releasing factor activity;
38	NM_178332	GNRH2	Gonadotropin-releasing hormone 2	Signal transduction;Extracellular;Development;Soluble fraction;Hormone activity;
39	NM_002510	GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	Integral to membrane;Negative regulation of cell proliferation;
40	NM_032551	KISS1R	KISS1 receptor	Integral to membrane;Protein binding;G-protein coupled receptor protein signaling pathway;Receptor activity;Rhodopsin-like receptor activity;Behavior;Neuropeptide receptor activity;
41	NM_006144	GZMA	Granzyme A (granzyme 1, cytotoxic T-lymphocyte-associated serine esterase 3)	Hydrolase activity;Immune response;Proteolysis and peptidolysis;Apoptosis;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Granzyme A activity;Cytolysis;
42	NM_004964	HDAC1	Histone deacetylase 1	Hydrolase activity;Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Cytoplasm;Anti-apoptosis;Transcription factor activity;Transcription factor binding;Histone deacetylase activity;Chromatin modification;Histone deacetylation;Histone deacetylase complex;

43	NM_000601	HGF	Hepatocyte growth factor (hepapoietin A; scatter factor)	Proteolysis and peptidolysis;Cellular_component unknown;Growth factor activity;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;Mitosis;
44	NM_006665	HPSE	Heparanase	Inflammatory response;Beta-glucuronidase activity;Proteoglycan metabolism;
45	NM_005343	HRAS	V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog	GTP binding;GTPase activity;Small GTPase mediated signal transduction;Plasma membrane;Cytoplasm;Cell growth and/or maintenance;Regulation of cell cycle;Cell surface receptor linked signal transduction;Organogenesis;Cell motility;Chemotaxis;
46	NM_006410	HTATIP2	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30kDa	Nucleus;Induction of apoptosis;Anti-apoptosis;Regulation of transcription from Pol II promoter;RNA polymerase II transcription factor activity;Transcription coactivator activity;
47	NM_000618	IGF1	Insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)	Signal transduction;Extracellular;Positive regulation of cell proliferation;Growth factor activity;Hormone activity;Insulin-like growth factor receptor binding;Prothoracicotrophic hormone activity;DNA replication;RAS protein signal transduction;Cell motility;Glycolate metabolism;Muscle development;Physiological process;Skeletal development;
48	NM_001562	IL18	Interleukin 18 (interferon-gamma-inducing factor)	Extracellular;Immune response;Induction of apoptosis via death domain receptors;Signal transducer activity;Interleukin-1 receptor binding;Cell-cell signaling;Angiogenesis;Interferon-gamma biosynthesis;Positive regulation of activated T-cell proliferation;T-helper 2 type immune response;Chemokine biosynthesis;Granulocyte macrophage colony-stimulating factor biosynthesis;Interleukin-13 biosynthesis;Interleukin-2 biosynthesis;Regulation of cell adhesion;Sleep;
49	NM_000576	IL1B	Interleukin 1, beta	Cell proliferation;Signal transduction;Immune response;Apoptosis;Negative regulation of cell proliferation;Regulation of cell cycle;Inflammatory response;Signal transducer activity;Extracellular space;Interleukin-1 receptor binding;Antimicrobial humoral response (sensu Vertebrata);Cell-cell signaling;
50	NM_001557	IL8RB	Interleukin 8 receptor, beta	Cell proliferation;Cytoplasm;Inflammatory response;Signal transducer activity;Integral to plasma membrane;Cell motility;Chemotaxis;Rhodopsin-like receptor activity;Cellular defense response;Interleukin-8 receptor activity;G-protein signaling, coupled to IP3 second messenger (phospholipase C activating);
51	NM_002206	ITGA7	Integrin, alpha 7	Protein binding;Receptor activity;Homophilic cell adhesion;Cell-matrix adhesion;Muscle development;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Cellular morphogenesis;
52	NM_000212	ITGB3	Integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)	Protein binding;Receptor activity;Cell-matrix adhesion;Integrin-mediated signaling pathway;Integrin complex;Blood coagulation;
53	NM_002231	CD82	CD82 molecule	Integral to plasma membrane;
54	NM_002256	KISS1	KISS-1 metastasis-suppressor	Cytoskeleton organization and biogenesis;

55	NM_004985	KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	GTP binding;GTPase activity;Small GTPase mediated signal transduction;Cell growth and/or maintenance;Regulation of cell cycle;
56	NM_002295	RPSA	Ribosomal protein SA	
57	NM_006500	MCAM	Melanoma cell adhesion molecule	Cell adhesion;Protein binding;Integral to plasma membrane;Morphogenesis;
58	NM_002392	MDM2	Mdm2, transformed 3T3 cell double minute 2, p53 binding protein (mouse)	Nucleus;Protein binding;Cell growth and/or maintenance;Protein complex assembly;Negative regulation of cell proliferation;Regulation of cell cycle;Zinc ion binding;Negative regulation of transcription from Pol II promoter;Ligase activity;Ubiquitin-protein ligase activity;Protein ubiquitination;Ubiquitin ligase complex;Negative regulator of basal transcription activity;Regulation of protein catabolism;Nucleolus;Nucleoplasm;
59	NM_000245	MET	Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Integral to membrane;Cell proliferation;Signal transduction;Protein-tyrosine kinase activity;Cell surface receptor linked signal transduction;Receptor activity;Integral to plasma membrane;Hepatocyte growth factor receptor activity;
60	NM_006838	METAP2	Methionyl aminopeptidase 2	Hydrolase activity;Proteolysis and peptidolysis;Regulation of translation;Peptidase activity;Protein modification;Methionyl aminopeptidase activity;
61	NM_002410	MGAT5	Mannosyl (alpha-1,6)-glycoprotein beta-1,6-N-acetylglucosaminyltransferase	Integral to membrane;Transferase activity, transferring glycosyl groups;Golgi membrane;N-linked glycosylation;Alpha-1,6-mannosyl-glycoprotein 6-beta-N-acetylglucosaminyltransferase activity;
62	NM_002425	MMP10	Matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	Hydrolase activity;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular space;Stromelysin 2 activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
63	NM_005940	MMP11	Matrix metalloproteinase 11 (stromelysin 3)	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Morphogenesis;Extracellular matrix (sensu Metazoa);Stromelysin 3 activity;
64	NM_002427	MMP13	Matrix metalloproteinase 13 (collagenase 3)	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Proteolysis and peptidolysis;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular space;Metalloendopeptidase activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);Collagenase activity;
65	NM_004530	MMP2	Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase)	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular matrix;Extracellular space;Gelatinase A activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
66	NM_002422	MMP3	Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin 1, progelatinase)	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular space;Stromelysin 1 activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
67	NM_002423	MMP7	Matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	Hydrolase activity;Calcium ion binding;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular matrix;Extracellular space;Matrilysin activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);

68	NM_004994	MMP9	Matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase)	Hydrolase activity;Zinc ion binding;Collagen catabolism;Extracellular space;Gelatinase B activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);Collagenase activity;
69	NM_004689	MTA1	Metastasis associated 1	Signal transduction;Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Transcription factor activity;Protein biosynthesis;Structural constituent of ribosome;Ribosome;
70	NM_004739	MTA2	Metastasis associated 1 family, member 2	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Transcription factor activity;Histone deacetylase complex;Chromatin assembly or disassembly;
71	NM_014751	MTSS1	Metastasis suppressor 1	Nucleic acid binding;Receptor binding;Cell adhesion;Negative regulation of cell cycle;Cell motility;Muscle development;Transmembrane receptor protein tyrosine kinase signaling pathway;Neurogenesis;Actin cytoskeleton organization and biogenesis;Actin cytoskeleton;Endocytic vesicle;Actin monomer binding;Ruffles;Microspike biogenesis;
72	NM_005375	MYB	V-myb myeloblastosis viral oncogene homolog (avian)	DNA binding;Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Cell growth and/or maintenance;Transcriptional activator activity;Nuclear matrix;
73	NM_002467	MYC	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	Cell proliferation;Nucleus;Transcription factor activity;Regulation of transcription from Pol II promoter;Cell cycle arrest;Iron ion homeostasis;
74	NM_005376	MYCL1	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog 1, lung carcinoma derived (avian)	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Cell growth and/or maintenance;Transcription factor activity;
75	NM_000268	NF2	Neurofibromin 2 (merlin)	Plasma membrane;Structural molecule activity;Negative regulation of cell cycle;Negative regulation of cell proliferation;Cytoskeleton;Cytoskeletal protein binding;Perception of sound;
76	NM_000269	NME1	Non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in	ATP binding;Transferase activity;Nucleus;Negative regulation of cell cycle;Negative regulation of cell proliferation;Kinase activity;Nucleoside-diphosphate kinase activity;CTP biosynthesis;GTP biosynthesis;UTP biosynthesis;Nucleoside triphosphate biosynthesis;
77	NM_002512	NME2	Non-metastatic cells 2, protein (NM23B) expressed in	ATP binding;Transferase activity;Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Negative regulation of cell cycle;Negative regulation of cell proliferation;Transcription factor activity;Kinase activity;Nucleoside-diphosphate kinase activity;CTP biosynthesis;GTP biosynthesis;UTP biosynthesis;Nucleoside triphosphate biosynthesis;

78	NM_005009	NME4	Non-metastatic cells 4, protein expressed in	ATP binding;Transferase activity;Mitochondrion;Kinase activity;Nucleoside-diphosphate kinase activity;CTP biosynthesis;GTP biosynthesis;UTP biosynthesis;Nucleoside metabolism;
79	NM_006981	NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Cell growth and/or maintenance;Transcription factor activity;Binding;Steroid hormone receptor activity;Thyroid hormone receptor activity;
80	NM_002768	CHMP1A	Chromatin modifying protein 1A	Zinc ion binding;Metalloproteinase activity;
81	NM_002659	PLAUR	Plasminogen activator, urokinase receptor	Plasma membrane;Cell surface receptor linked signal transduction;Blood coagulation;Chemotaxis;U-plasminogen activator receptor activity;Extrinsic to membrane;

82	NM_002687	PNN	Pinin, desmosome associated protein	Plasma membrane;Structural molecule activity;Cell adhesion;Nucleus;Intercellular junction;Intermediate filament;
83	NM_000314	PTEN	Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	Hydrolase activity;Cell cycle;Protein amino acid dephosphorylation;Protein tyrosine phosphatase activity;Protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity;Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate 3-phosphatase activity;Negative regulation of progression through cell cycle;
84	NM_002820	PTH1H	Parathyroid hormone-like hormone	Nucleus;Cytoplasm;Negative regulation of cell proliferation;Positive regulation of cell proliferation;Extracellular space;Hormone activity;Cell-cell signaling;Pregnancy;Epidermis development;Lactation;CAMP metabolism;
85	NM_007079	PTP4A3	Protein tyrosine phosphatase type IVA, member 3	Protein amino acid dephosphorylation;Phosphoprotein phosphatase activity;Prenylated protein tyrosine phosphatase activity;
86	NM_000321	RB1	Retinoblastoma 1 (including osteosarcoma)	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Negative regulation of cell cycle;Transcription factor activity;Negative regulation of transcription from Pol II promoter;Chromatin;Cell cycle checkpoint;
87	NM_021111	RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs	Negative regulation of cell cycle;Membrane fraction;Membrane;Metalloendopeptidase inhibitor activity;Serine-type endopeptidase inhibitor activity;
88	NM_175744	RHOA	Ras homolog gene family, member C	GTP binding;GTPase activity;Small GTPase mediated signal transduction;Cell growth and/or maintenance;Signal transducer activity;Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade;Catalytic activity;
89	NM_006914	RORB	RAR-related orphan receptor B	Regulation of transcription, DNA -dependent;Nucleus;Protein binding;Transcription factor activity;Steroid hormone receptor activity
90	NM_002961	S100A4	S100 calcium binding protein A4	Calcium ion binding;

91	NM_002639	SERPINB5	Serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 5	Cell motility;Serine-type endopeptidase inhibitor activity;
92	NM_003011	SET	SET translocation (myeloid leukemia-associated)	Nucleus;Cell growth and/or maintenance;DNA replication;Endoplasmic reticulum;Protein phosphatase inhibitor activity;Nucleosome disassembly;Histone binding;Nucleosome assembly;Protein phosphatase type 2A regulator activity;Perinuclear region;Negative regulation of histone acetylation;Nucleocytoplasmic transport;
93	NM_003064	SLPI	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	Serine-type endopeptidase inhibitor activity;
94	NM_005901	SMAD2	SMAD family member 2	Signal transduction;Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Protein binding;
95	NM_005359	SMAD4	SMAD family member 4	Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Cytoplasm;Transcription factor activity;Transcription cofactor activity;SMAD protein heteromerization;
96	NM_005417	SRC	V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog (avian)	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Protein kinase cascade;Protein binding;Cell growth and/or maintenance;Protein-tyrosine kinase activity;SH3/SH2 adaptor protein activity;Signal complex formation;
97	NM_001050	SSTR2	Somatostatin receptor 2	Response to nutrients;Protein binding;Negative regulation of cell proliferation;Integral to plasma membrane;Cell-cell signaling;G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger;Rhodopsin-like receptor activity;Somatostatin receptor activity;Digestion;PDZ domain binding;
98	NM_003177	SYK	Spleen tyrosine kinase	ATP binding;Transferase activity;Protein amino acid phosphorylation;Cell proliferation;Intracellular signaling cascade;Protein-tyrosine kinase activity;Protein complex assembly;Organogenesis;Integrin-mediated signaling pathway;Leukocyte cell adhesion;Integrin binding;Neutrophil chemotaxis;
99	NM_005650	TCF20	Transcription factor 20 (AR1)	DNA binding;Regulation of transcription, DNA - dependent;Nucleus;Transcription coactivator activity;
100	NM_000660	TGFB1	Transforming growth factor, beta 1	Cell proliferation;Anti-apoptosis;Regulation of cell cycle;Growth factor activity;Cell-cell signaling;Transforming growth factor beta receptor signaling pathway;Transforming growth factor beta receptor binding;Cell growth;
101	NM_003253	TIAM1	T-cell lymphoma invasion and metastasis 1	Receptor signaling protein activity;Protein binding;Intracellular signaling cascade;Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity;
102	NM_001010927	TIAM2	T-cell lymphoma invasion and metastasis 2	Receptor signaling protein activity;Protein binding;Intracellular signaling cascade;Guanyl-nucleotide exchange factor activity;
103	NM_003255	TIMP2	TIMP metalloproteinase inhibitor 2	Metalloendopeptidase inhibitor activity;Extracellular matrix (sensu Metazoa);

104	NM_000362	TIMP3	TIMP metallopeptidase inhibitor 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	Induction of apoptosis by extracellular signals;Extracellular matrix;Metalloendopeptidase inhibitor activity;Visual perception;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
105	NM_003256	TIMP4	TIMP metallopeptidase inhibitor 4	Metalloendopeptidase inhibitor activity;Biological_process unknown;Extracellular matrix (sensu Metazoa);
106	NM_019894	TMPRSS4	Transmembrane protease, serine 4	Hydrolase activity;Integral to membrane;Proteolysis and peptidolysis;Scavenger receptor activity;Chymotrypsin activity;Trypsin activity;
107	NM_003810	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	Signal transduction;Immune response;Induction of apoptosis;Apoptosis;Positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade;Integral to plasma membrane;Soluble fraction;Cell-cell signaling;Tumor necrosis factor receptor binding;
108	NM_000546	TP53	Tumor protein p53	ATP binding;Cell proliferation;Regulation of transcription, DNA-dependent;Protein binding;Negative regulation of cell cycle;Apoptosis;Mitochondrion;Transcription factor activity;Zinc ion binding;DNA damage response, signal transduction resulting in induction of apoptosis;Cell cycle arrest;Nucleolus;Cell cycle checkpoint;DNA strand annealing activity;Copper ion binding;Nuclease activity;DNA recombination;Base-excision repair;Caspase activation via cytochrome c;Cell aging;Cell differentiation;Induction of apoptosis by hormones;Negative regulation of cell growth;Nucleotide-excision repair;Regulation of mitochondrial membrane permeability;Protein tetramerization activity;Negative regulation of helicase activity;
109	NM_006670	TPBG	Trophoblast glycoprotein	Cell adhesion;Integral to plasma membrane;Cell motility;
110	NM_002420	TRPM1	Transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1	Membrane fraction;Integral to plasma membrane;Cation transport;Calcium channel activity;
111	NM_000369	TSHR	Thyroid stimulating hormone receptor	Positive regulation of cell proliferation;Signal transducer activity;Integral to plasma membrane;Cell-cell signaling;G-protein signaling, coupled to cyclic nucleotide second messenger;Heterotrimeric G-protein complex;Thyroid-stimulating hormone receptor activity;
112	NM_000474	TWIST1	Twist homolog 1 (acrocephalosyndactyly 3; Saethre-Chotzen syndrome) (Drosophila)	DNA binding;Regulation of transcription, DNA-dependent;Nucleus;Protein binding;Negative regulation of transcription from Pol II promoter;RNA polymerase II transcription factor activity;Skeletal development;Cell differentiation;Morphogenesis;Enzyme inhibitor activity;Chromosome organization and biogenesis (sensu Eukaryota);

113	NM_003376	VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Cell proliferation;Signal transduction;Extracellular;Regulation of cell cycle;Positive regulation of cell proliferation;Homophilic cell adhesion;Membrane;Soluble fraction;Heparin binding;Growth factor activity;Response to stress;Vascular endothelial growth factor receptor binding;Angiogenesis;
114	NM_003379	EZR	Ezrin	Structural molecule activity;Membrane;Cytoskeleton;Cytoskeletal protein binding;Cellular morphogenesis;Cytoskeletal anchoring;Microvillus;
115	L08752	PUC18	PUC18 Plasmid DNA	
116		BLANK		
117		BLANK		
118	SA_00005	AS1R2	Artificial Sequence 1 Related 2 (80% identity)(48/60)	
119	SA_00004	AS1R1	Artificial Sequence 1 Related 1 (90% identity)(54/60)	
120	SA_00003	AS1	Artificial Sequence 1	
121	NM_002046	GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	Cytoplasm;Oxidoreductase activity;Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (phosphorylating) activity;Glucose metabolism;Glycolysis;
122	NM_004048	B2M	Beta-2-microglobulin	Extracellular;Immune response;
123	NM_007355	HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	ATP binding;Protein binding;Cytoplasm;Heat shock protein activity;Protein folding;TPR domain binding;Nitric-oxide synthase regulator activity;Positive regulation of nitric oxide biosynthesis;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;ATP binding;Protein binding;Cytoplasm;Heat shock protein activity;Protein folding;TPR domain binding;Nitric-oxide synthase regulator activity;Positive regulation of nitric oxide biosynthesis;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;
124	NM_007355	HSP90AB1	Heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class B member 1	ATP binding;Protein binding;Cytoplasm;Heat shock protein activity;Protein folding;TPR domain binding;Nitric-oxide synthase regulator activity;Positive regulation of nitric oxide biosynthesis;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;ATP binding;Protein binding;Cytoplasm;Heat shock protein activity;Protein folding;TPR domain binding;Nitric-oxide synthase regulator activity;Positive regulation of nitric oxide biosynthesis;Unfolded protein binding;Response to unfolded protein;
125	NM_001101	ACTB	Actin, beta	
126	NM_001101	ACTB	Actin, beta	
127	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	
128	SA_00007	BAS2C	Biotinylated Artificial Sequence 2 Complementary sequence	

3.2.4.3 Síntese das seqüências-alvo de cRNA marcadas com biotina

As seqüências-alvo de cRNA marcadas com biotina foram sintetizadas a partir de 4 µg de RNA total extraídos das amostras tumorais e do “pool” comercial de supra-renais descrito anteriormente. O procedimento de síntese das seqüências-alvo é descrito resumidamente a seguir e na Figura 3. Inicialmente é feita uma transcrição reversa a partir de 4 µg de RNA total de cada amostra. A reação ocorre a 42 °C, por 60 minutos (em termocicladora), com a transcritase reversa de vírus de leucemia murídea de Moloney e iniciadores (*primers*) oligo-dT que alberga um promotor que utiliza a T7 RNA polimerase em sua extremidade 5'. A presença do promotor T7 permite que o cDNA seja usado como molde para a síntese do cRNA, o que resulta em uma amplificação linear, guardando uma proporção direta o número final de cópias e a quantidade inicial de cada cDNA (131). A síntese de cRNA (também chamada de “transcrição in-vitro”) ocorre a 37°C overnight, na presença de UTP marcado com biotina. Este é incorporado nas moléculas de cRNA durante o processo de síntese. A marcação com biotina posteriormente permite a ligação da fosfatase alcalina, enzima que catalisa uma reação que leva à emissão de luminescência, como será descrito adiante. A Figura 3 é uma representação esquemática da síntese de moléculas-alvo. Todos os reagentes necessários para esta reação foram fornecidos em kit comercial específico com esta finalidade (TrueLabeling-AMP 2.0 synthesis kit - Superarray Inc., Frederick, MD, USA), exceto o reagente biotin-11-UTP (NEL543001EA, PerkinElmer, Waltham, MA). Após a

etapa de síntese, as seqüências-alvo marcadas com biotina foram purificadas em colunas de sílica (cRNA purification kit, Superarray Inc., Frederick, MD, USA), de acordo com as instruções do fabricante, e quantificadas em espectrofotômetro.

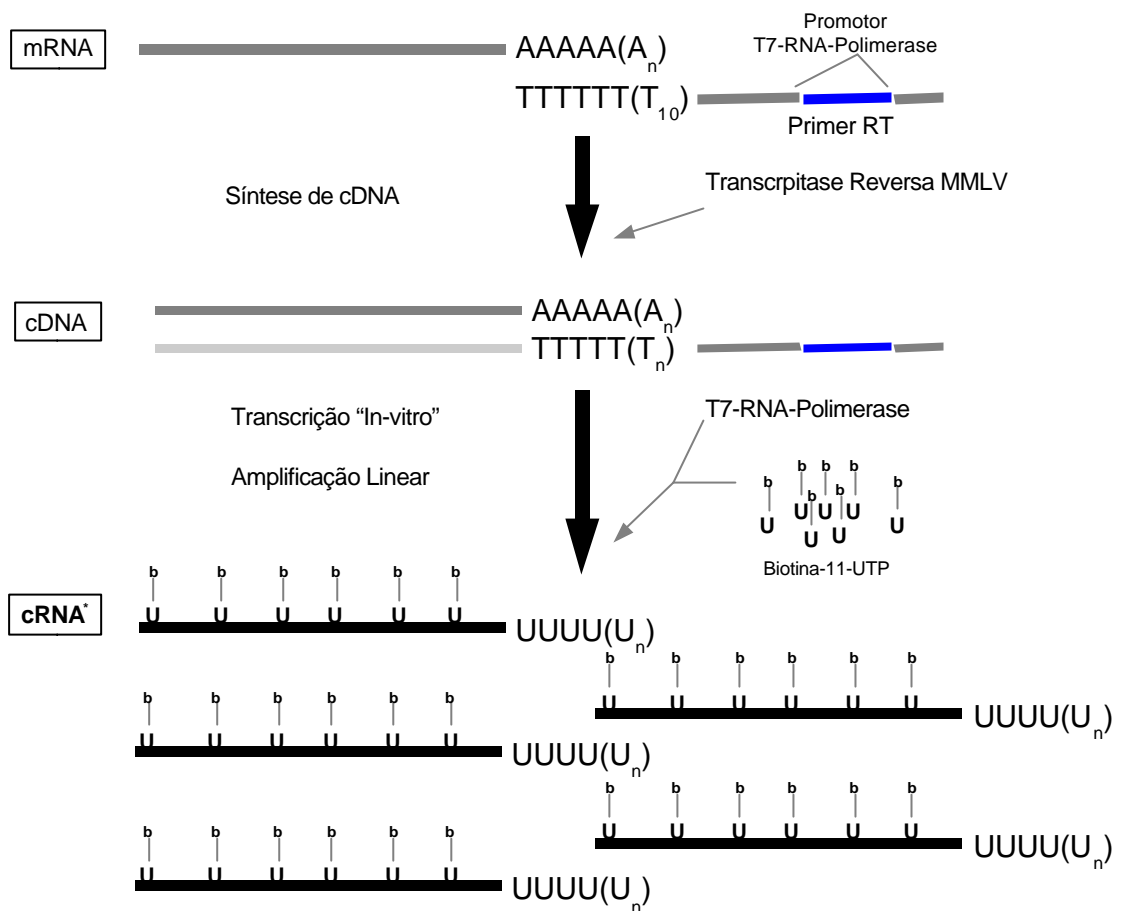


Figura 3: Representação esquemática da síntese das moléculas-alvo: Utiliza-se um primer oligo-dT com um sítio T7 na extremidade 5'. Na primeira etapa, o mRNA é convertido em cDNA. Este serve de molde para a enzima T7 RNA polimerase sintetizar as moléculas-alvo de cRNA (transcrição "in-vitro"). A reação acontece na presença de UTP marcado com biotina, que é incorporado nas moléculas de cRNA. Ocorre uma amplificação da ordem de 10^6 vezes da quantidade inicial de cDNA.

3.2.4.4 Pré-Hibridização e Hibridização

Em seguida, procede-se a pré-hibridização das membranas, a fim de se reduzir a possibilidade de ligações inespecíficas com as seqüências-alvo. Esta etapa ocorre a 60°C por 3 horas, em forno de hibridização com cilindros rotativos (a 5 rpm). A solução de pré-hibridização é fornecida pelo fabricante das membranas (H-01, SuperArray, Frederick, MD). Após esta etapa, é feita a hibridização. As seqüências-alvo são colocadas em contato com as membranas (dentro dos cilindros plásticos que as acompanham), juntamente com 0,75 mL da solução de pré-hibridização. Esta etapa é feita no forno de hibridização a 60°C “overnight”, a 5 rpm.

3.2.4.5 Lavagem das Membranas e Ligação da streptavidina-fosfatase alcalina

Após a hibridização, as membranas são lavadas duas vezes (com 2x SSC/1% SDS e 0.1x SSC/0.5% SDS a 60 °C por 5 minutos a 25 rpm) para remoção das moléculas-alvo não ligadas. Logo em seguida as membranas são incubadas em solução 1:8000 de streptavidina conjugada à fosfatase alcalina (por 10 minutos em temperatura ambiente, a 25 rpm). A streptavidina apresenta alta afinidade pela biotina (que está ligada às uracilas das moléculas-alvo). Isto faz com que o complexo streptavidina-fosfatase alcalina ligue-se às moléculas-alvo que se encontram hibridizadas na membrana. Os reagentes necessários para esta reação são fornecidos pelo fabricante das membranas (Chemiluminescent detection kit – D-01 – Superarray, Frederick, MD).

3.2.4.6 Incubação com substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina (CDPStar)

As membranas são incubadas por 5 minutos com uma solução que contém um substrato quimioluminescente da fosfatase alcalina (CDPStar). A degradação desse substrato pela fosfatase alcalina produz luminescência, que pode ser detectada por vários métodos. Optou-se pela detecção em filme radiográfico (Agfa Inc). O tempo ótimo de exposição foi entre 1-10 minutos.

3.2.4.7 Digitalização das imagens e captura dos dados brutos de expressão

Depois de revelados, os filmes radiográficos são digitalizados com uma câmera digital (Pentax K100) acoplada a um negatoscópio. A imagem resultante foi convertida no formato TIFF 8 bits. Posteriormente, através do programa UnScan-it Gel digitizing software version 6.1 (Silk Scientific, Inc., Orem, Utah) é feita a aquisição do sinal e transformação dos dados referentes a expressão de cada gene em dados numéricos, exportados para uma planilha de formato Excel.

3.2.4.8 Análise dos dados do array de expressão

3.2.4.8.1 Normalização dos dados

Os dados brutos derivados de experimentos de arrays de membrana estão sujeitos a interferências metodológicas de diversas naturezas que podem afetar as intensidades de sinal medidas, sem corresponder a

diferenças reais na expressão gênica. Possíveis fontes de interferência são: eficiências diferentes no processo de síntese de moléculas-alvo, na marcação ou na aquisição do sinal entre os experimentos. Para corrigir estas distorções, recorre-se ao processo de normalização. Este processo tem como objetivo ajustar os valores de expressão de todos os genes dos experimentos de tal forma que genes que não são diferencialmente expressos apresentem valores semelhantes de expressão. Na literatura existem algumas técnicas descritas para tal finalidade e sua escolha depende principalmente da plataforma em questão. Podemos citar os métodos lineares e métodos baseados em intensidade. Nos métodos lineares, aplica-se o mesmo fator de correção para todos os genes da membrana. Este fator de correção pode ser definido através de genes constitutivos, ou pela mediana da expressão de todos os genes de uma determinada membrana (neste caso, assumimos que a maior parte dos genes não são diferencialmente expressos entre as membranas e portanto a mediana da expressão é a mesma; isso pode ser verdadeiro no caso de arrays ditos “genômicos”, nos quais estão presentes milhares de genes sem nenhuma seleção prévia. Caso contrário, essa premissa não pode ser assumida. As desvantagens desta técnica é que mesmo os genes constitutivos (“*housekeeping*”) podem sofrer variações biológicas significativas em diversas situações (132). Em tumores de córtex de supra-renal, por exemplo, o gene da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH), que é considerado gene constitutivo, é hiperexpresso em carcinomas (19). Além disso, foi demonstrado que o sinal não se comporta

de maneira linear em todo o espectro de intensidades. Portanto, a aplicação de um mesmo fator de correção para todas as intensidades poderia causar outros tipos de distorções, sobretudo nas intensidades mais baixas. Outros métodos de normalização, como a regressão linear dos sinais de expressão do *array*-experimento no *array*-controle (ou sinal do canal vermelho no canal verde, se o *array* for de dois canais), o Lowess e a normalização quantílica são amplamente utilizados em experimentos de *microarray*. Todos estes métodos partem do pressuposto de que a maior parte dos genes dos experimentos não são diferencialmente expressos e que o número de genes que são hiperregulados numa célula (ou tecido) é praticamente igual ao número de genes que são hiporregulados. Em experimentos em que estas condições são provavelmente satisfeitas, a normalização quantílica transforma a distribuição de sinal de cada *array* de tal modo que todos eles terão os mesmos valores de quantis. A normalização Lowess, por sua vez, considera as possíveis não linealidades do sinal de expressão (por exemplo, dependente da intensidade de cada ponto ou devido a não homogeneidade do bico de impressão de *array*). Novamente, as suposições citadas acima são só válidas quando consideramos as plataformas “genômicas”, nas quais estão presentes milhares de genes. No caso da plataforma deste estudo, que contém genes pré-selecionados que fazem parte de vias específicas, é altamente provável que haja uma divergência considerável na expressão de genes detectados por este tipo de *microarray*. Portanto, esses métodos não seriam aplicáveis.

Um método de normalização que não pressupõe que a mediana de expressão dos *arrays* é a mesma e não é baseado em correção linear foi selecionado (133). Este método é baseado na lei de Zipf que estabelece que a magnitude de uma medida de intensidade (γ) é inversamente proporcional ao posto (Y) daquele ponto de dado no conjunto de dados considerado. Dessa maneira, poder-se-ia representar essa relação da seguinte maneira:

$$\gamma \propto Y^c$$

onde c é um coeficiente próximo de -1 e, no nosso caso (análise de perfil de expressão genômico), γ seria a medida da intensidade de expressão gênica e Y o posto desta medida dentro de todas as medidas consideradas no perfil (133). Esta é uma lei empírica, derivada da lingüística que pode ser aplicada em diversos fenômenos naturais. A sua aplicabilidade à análise de dados genômicos já foi demonstrada utilizando os dados de perfil de expressão disponíveis em bancos de dados públicos (134). Como a aplicabilidade da lei de Zipf pode ser, aparentemente generalizada, utilizamos este método para normalização interarray dos nossos dados.

Após a extração do sinal, o valor numérico correspondente à intensidade de expressão de cada um dos genes representados no microarray foi processado para remover o sinal de fundo (*background*). Para isso cada *array* foi dividido em 2 partes (superior ou inferior) que contêm números iguais de pontos que representam os genes. Com exceção do paciente AB252, a intensidade média dos pontos que estão entre os 10% menos intensos de cada porção (superior ou inferior) do *array* foi adotada como *background*. Visto que o o experimento referente ao paciente AB252

apresentou um sinal de fundo bem mais intenso e irregular do que outros *arrays*, foram utilizados para determinação de sinal de fundo os pontos que não tinham sinal detectável pela inspeção visual ou que deveriam ter sinal nulo pela lista dos genes fornecida pelo fabricante. Após subtrair a intensidade de fundo do dado bruto, os valores eram conferidos manualmente pela comparação com as imagens dos *arrays*. Como a normalização por lei de Zipf envolve transformação logarítmica os pontos que tem intensidade zero de expressão (seja após ajuste de intensidade de fundo ou pela inspeção visual) receberam arbitrariamente o valor numérico 10. Esse valor é pequeno o suficiente para não ser confundido com pontos considerados de expressão positiva e previne a presença de números negativos na normalização após a transformação logarítmica.

Uma modificação de normalização Zipf (133) foi adotada no presente trabalho. Esta adaptação, específica para os *microarrays* “*boutiques*” (desenhados para estudar vias específicas, como é o caso da nossa plataforma experimental), consiste em definir primeiro os genes que podem ser considerados “*housekeeping*” e usá-los na normalização dos sinais da expressão gênica. Como, na nossa situação experimental, não é possível estabelecer *a priori* uma lista de genes *housekeeping* adotamos a variabilidade do posto de um gene em cada *array* individual como métrica para identificar genes *housekeeping*. Para isso os postos de cada gene relativos a todos outros foram computados em cada *array* individual. Depois disso, os postos de cada gene foram comparados ao seu posto cognato no *array* hibridado com RNA-referência. Aqueles genes cujos postos (obtidos

em *arrays*-experimento) variar menos do que 6 posições em relação a seu posto cognato no *array* controle são considerados “*housekeeping*”.

Uma vez obtida a lista de genes “*housekeeping*” do nosso estudo uma curva de referência é gerada utilizando a mediana das intensidades (γ_{med}) de expressão de cada gene “*housekeeping*” sobre todos os *arrays* e a mediana (Y_{med}) de seus postos (obtidos considerando a posição de todos os genes representados no *array*). Abaixo, a equação desta curva referência

$$\ln(\gamma_{med}^{\wedge}) = a_{med} + b_{med} \ln(Y_{med})$$

Depois disso, este mesmo modelo de regressão foi aplicado a cada um dos *arrays* individualmente utilizando os mesmos postos (Y_{med}) considerados para obtenção da curva-referência:

$$\ln(\gamma_k^{\wedge}) = a_k + b_k \ln(Y_{med})$$

O termo γ_k^{\wedge} na equação acima corresponde ao valor esperado da intensidade do gene no k-ésimo *array*.

Finalmente, aplica-se a diferença entre a intensidade esperada da expressão gênica no k-ésimo *array* e a aquela obtida na curva-referência como fator de normalizador de acordo com a equação exponencial apresentada abaixo:

$$\gamma'_k = \exp(\ln(\gamma_k) (\ln(\gamma_{med}^{\wedge}) / \ln(\gamma_k^{\wedge})))$$

3.2.4.8.2 Análise estatística

A normalidade da distribuição das medidas de intensidade de expressão gênica foi verificada pelo teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A expressão entre os grupos de estudo dos genes que apresentam distribuição normal foi feita utilizando o teste t de Student. O teste de Wilcoxon foi utilizado nas comparações em que o teste de Shapiro-Wilk não suporta a hipótese da normalidade de distribuição das intensidades expressão do gene analisado. O controle do erro das múltiplas comparações foi feito controlando a taxa de falso descobrimento (FDR) visto que é um ajuste menos conservador do que os procedimentos de controle de taxas de erro. Para isso adotamos o procedimento de Benjamini e Hochberg (135) para selecionar o nível de significância mais apropriado. A FDR escolhida foi 0,2.

Além da inferência comparativa dos dados de expressão gênica foram realizados também estudos de descobrimento de classes e de predição de classe. Os métodos de descobrimento de classes são procedimentos exploratórios que têm como objetivo visualizar a estrutura presente nos dados em questão (perfil de expressão do conjunto de genes em cada amostra ou o comportamento das amostras quando cada um dos genes é considerado) permitindo ao pesquisador verificar a partição destes dados (o número e a composição das classes que estão presentes). Utilizamos a análise de agrupamento (*cluster analysis*) e a análise de componente principal (*principal component analysis*, PCA) para identificar as partições dos nossos dados. A expressão de todos os genes representados no *array* foi utilizada na análise de agrupamento. O algoritmo de agrupamento escolhido foi o

hierárquico (*hierarchical clustering*). A distância entre os grupamentos considerada pelo algoritmo de agrupamento foi a distância média (*average linkage*). Na nossa experiência, a distância média produz grupamentos consistentes, compactos e permite boa separação entre os grupamentos.

A análise de componente principal é um procedimento estatístico que visa reduzir a dimensionalidade de um conjunto de dados no qual existe um grande número de variáveis correlatas, enquanto se retém o máximo possível da variação presente nestes dados³. Em outras palavras, esta técnica tenta representar em poucas dimensões (de visualização bem mais fácil) um conjunto de dado que é multidimensional por natureza (e de difícil visualização e análise). Esta redução da dimensionalidade facilita inspecção da estrutura de dados e descobrimento das classes neles embutidas. Nesta etapa utilizamos tanto genes quanto amostras para realização da PCA. Os genes utilizados na PCA são aqueles considerados diferencialmente expressos nos testes de comparação de grupos (teste t de Student e teste de Wilcoxon) e foi realizada utilizando como base a matriz de covariância e um algoritmo que realiza a decomposição de valor singular da matriz.

A predição de classe diz respeito a técnicas utilizadas para selecionar marcadores que servem para categorizar as amostras de interesse. É, portanto, uma maneira de desenvolver critérios objetivos de diagnóstico (detecção de pacientes que evoluirão com invasão e metástase, no nosso caso). Os genes considerados diferencialmente expressos foram utilizados

³ Simon R Design and Analysis of DNA Microarray Investigations Springer 2003; Deshmukh & Purohit Microarray Data: Statistical Analysis Using R Alpha Science International Ltd 2007

no ajuste de modelos de regressão logística nos quais o desfecho da evolução do paciente (presença ou não de invasão ou metástase) foi considerado como variável dependente (ou variável resposta) ao passo que os genes (intensidade de sua expressão nas diversas amostras) são variáveis explanatórias. O valor 1 foi atribuída à variável dependente (evolução do paciente) se o paciente não apresentou recorrência ou metástase durante o seguimento. Caso contrário, recebeu valor 0. A capacidade de discriminação de cada gene foi definida como proporção de “diagnósticos” corretos feitos pelo modelo (valor ajustado da variável dependente maior ou igual a 0,5 no grupo de boa evolução e menor do que 0,5 no grupo que apresentou recorrência e/ou invasão).

A análise de agrupamento foi feita usando o aplicativo gratuito BRB-Array tools⁴ que é um aplicativo escrito em FORTRAN e que utiliza a capacidade de cálculo do ambiente estatístico livre R⁵ e a interface gráfica do bem conhecido aplicativo de planilha de cálculos Excel da Microsoft. Todas outras análises foram realizadas utilizando o ambiente estatístico R.

3.2.5 Análise de LOH da região 22q12.3

Para avaliar LOH da região 22q12.3 (que contém o supressor tumoral TIMP3), foram selecionados como marcadores os microssatélites D22S280 e D22S283. A amplificação por PCR foi feita em termocicladora, em condições padronizadas previamente. A análise semiquantitativa dos produtos de PCR foi realizada no aparelho 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City CA). O produto de amplificação de cada alelo foi analisado através do

⁴ <http://linus.nci.nih.gov/BRB-ArrayTools.html>

⁵ <http://cran.r-project.org/>

software GeneScan (Applied Biosystems, Foster City, CA). A amplificação pode ser visualizada graficamente como um pico de altura correspondente à intensidade da amplificação (fluorescência). Apenas indivíduos heterozigotos para estes microssatélites (aqueles que mostraram dois picos correspondentes a alelos distintos no DNA extraído do sangue periférico) foram considerados informativos. Considerando a altura dos picos, é possível estabelecer uma razão entre o grau de amplificação dos 2 alelos presentes no DNA do sangue periférico e tecido tumoral. Diz-se que ocorreu LOH quando a razão de amplificação dos alelos no tumor dividida pela razão de amplificação dos alelos no sangue indicar diferenças maiores que 50% (ou seja, valores maiores que 2 ou menores que 0,5).

3.2.6 Análise da expressão da *MMP2*

Por se tratar de uma metaloprotease que se encontra hiperexpressa em diversos carcinomas humanos e que estudos prévios demonstraram hiperexpressão em carcinoma de adrenal, foi estudada por RT-PCR o perfil de expressão da *MMP2* em tumores adrenocorticais metastáticos e não-metastáticos. Para eliminação de eventuais traços de DNA genômico presentes nas amostras de RNA extraídos dos tumores, foi feita uma precipitação com acetato de amônio 0,3M, pH 4,5. Nessas condições, DNA e proteínas permanecem solubilizados, enquanto o RNA é precipitado preferencialmente e recuperado por centrifugação⁶.

⁶ http://www.epibio.com/f1_2/f1_2rna.asp

3.2.6.1 Transcrição Reversa

Um micrograma e meio de RNA total de cada amostra foi submetido à transcrição reversa a 42 °C por uma hora, com 200 U da transcriptase reversa Superscript II (Invitrogen, Carlsbad, CA), 0,5 µg de primer oligo(*dT*)₁₂₋₁₈ (Invitrogen, Carlsbad, CA). e 30 U de um inibidor de RNase (RNasin, Promega Corp., Madison, WI), conforme instruções do fabricante.

3.2.6.2 PCR

Um décimo dos produtos de RT foi amplificado em uma reação de 50 µl, contendo 20 pmol de cada primer específico, 0.2 mM de dNTP, 50 mM de KCl e 10 mM Tris-HCl (pH 9.3), 1.5 mM de MgCl₂ e 5 U da enzima Taq polimerase (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ). Os primers e condições de amplificação encontram-se descritos na tabela 3. Os primers foram desenhados de tal maneira que os *amplicons* contivessem seqüências referentes a mais de um exon dos respectivos genes. Dessa forma, evita-se a amplificação de produtos provenientes de eventual contaminação por DNA genômico. As seqüências dos *amplicons* de 153 e 259 pares de base referentes à MMP2 e ciclofilina, respectivamente, foram confirmadas por seqüenciamento automático. Foi feita eletroforese dos produtos em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio, com posterior visualização em transiluminador UV e digitalização da imagem através de um dispositivo CCD.

Tabela 3: Primers e condições de ciclagem para a PCR dos genes *MMP2* e *ciclofilina*

Primer	Seqüência	Condições da PCR
MMP2-F	5'-TTGACGGTAAGGACGGACTC-3'	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C 3 min 2. 95 °C 30 seg, 52 °C 30 sec, 72 °C 30 seg (x40) 3. 72 °C 7 min
MMP2-R	5'-TTGACGGTAAGGACGGACTC-3'	
CYC-F	5'-TTTCACAGAAATTATTCCAGGGTTT-3'	<ol style="list-style-type: none"> 1. 95 °C 3 min 2. 95 °C 30 seg, 56 °C 30 sec, 72 °C 30 seg (x30) 3. 72 °C 7 min
CYC-R	5'-CAATATTCATGCCTTCTTCACTT-3'	

3.2.6.3 Aquisição do sinal e análise densitométrica

A aquisição do sinal e análise densitométrica da imagem digitalizada foram feitas utilizando-se o programa UnScan-it Gel digitizing software versão 6.1 (Silk Scientific, Inc., Orem, Utah). Os níveis de expressão da *MMP2* foram corrigidos em função da expressão da *ciclofilina* e anotados em unidades arbitrárias. Para análise estatística, os grupos foram divididos em tumores invasivos/metastáticos e não invasivos/metastáticos. Foi aplicado o teste de Mann-Whitney para avaliar expressão diferencial entre estes dois grupos. Para avaliar correlação entre tamanho tumoral, score de Weiss e expressão de Gelatinase A, foi feito um teste de correlação de Spearman.

3.2.7 Análise da expressão dos genes TIMP3 e FN1 por PCR em tempo-real

Com a finalidade de validar alguns achados de expressão gênica obtidos nos arrays e também determinar a diferença de expressão de maneira mais precisa, foram feitos estudos de expressão através de real-time RT-PCR dos genes TIMP3 e FN1. Para estes estudos, a transcrição reversa foi feita com o kit high-capacity da Applied Biosystems (Applied Biosystems, Foster City CA). Como calibrador, foi utilizado o pool de adrenal normal descrito anteriormente. As amplificações foram feitas em triplicatas. O gene *housekeeping* escolhido foi a beta-actina. As eficiências de amplificação foram maior que 90% para todos os ensaios. A quantificação relativa foi feita através do método threshold cycle (C_t), normalizado pela expressão da beta-actina em cada amostra estudada. A expressão relativa dos genes em cada amostra pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (136).

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Análise global da expressão

Após amplificação linear e incorporação da UTP marcada com biotina os cRNAs sintetizados a partir das amostras de RNA de 27 pacientes (15 adultos e 12 crianças), bem como da amostra-referência, foram colocados para hibridar com as seqüências imobilizadas nas membranas. Todas as amostras de tumor dos pacientes produziram sinais luminescentes semelhantes àquele apresentado na Figura 4.

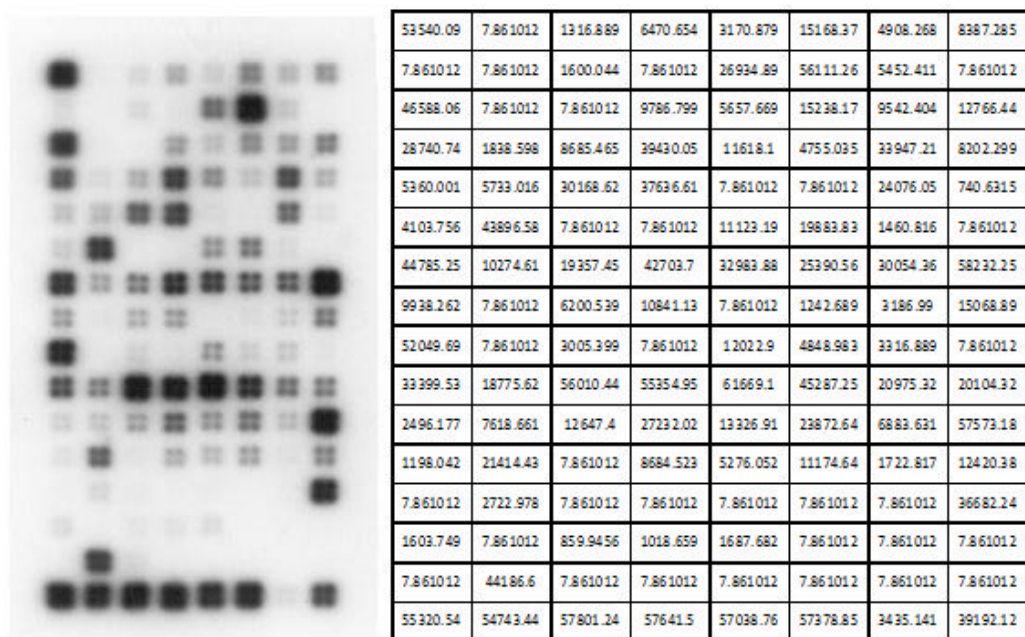


Figura 4: Resultado típico de um experimento de microarray utilizado no presente trabalho. Oligonucleotídeos correspondendo a cada um dos genes estudados estão imobilizados em um quarteto de pontos na membrana. Após hibridação e lavagem, sinal correspondente à expressão de cada um dos genes foi revelado por quimioluminescência e as emissões luminosas capturadas em filme de radiografia. A imagem produzida (à esquerda) foi então digitalizada e as intensidades dos pontos extraídas para avaliação da expressão gênica. A Tabela (à direita) contém valores referentes à expressão de cada gene.

Os valores de expressão foram extraídos das imagens digitalizadas e normalizados. Após a normalização o coeficiente de concordância entre os arrays variou de 0,6343 a 0,9536. O fato de os nossos *arrays* apresentarem valores relativamente altos de coeficiente de concordância é um fato surpreendente. Pois, sendo um *array* específico para as vias de metástase e invasão tumoral, esperar-se-ia que a concordância entre membranas hibridadas com RNAs provenientes de espécimes de comportamentos biológicos opostos fosse baixa. Esta observação sugere que, em relação às vias que regulam a disseminação e invasão neoplásicas, as lesões malignas de córtex adrenal diferem das benignas em apenas alguns poucos componentes. Esta noção se reforça ainda mais quando consideramos dois dados adicionais: 1- Todas as amostras (sejam adultas ou de crianças, de qualquer comportamento biológico) são altamente concordantes com a amostra referência. 2- Quando a relação entre a expressão gênica das amostras e a expressão gênica do pool referência é apresentada graficamente (Figuras 5 e 6) salta à vista a semelhança no padrão de dispersão dos pontos. Como pode ser notado em todos os gráficos (Figura 5 e 6) a grande maioria dos pontos se concentram próximo à linha diagonal. Além disso, em todos os gráficos, é possível observar que há um grupo de genes que são expressos no pool referência mas não nas amostras tumorais (malignas ou não, Figura 5 e 6). Apesar da semelhança nos padrões de dispersão, é possível discriminar alguns subgrupos. A dispersão apresentada pelos *arrays* dos tumores metastáticos de adultos, de maneira geral, é maior do que seus equivalentes de boa evolução (Figura 5).

Ademais, neste grupo (os metastáticos de adultos) observam-se a presença de genes que são nele expressos mas não são expressos no pool referência. Esta diferença de padrão de dispersão não é observada nas neoplasias de crianças. Tanto as lesões de boa evolução quanto aquelas de evolução agressiva apresentaram um padrão de dispersão semelhante àquele apresentado pelas neoplasias malignas de adultos (Figura 6).

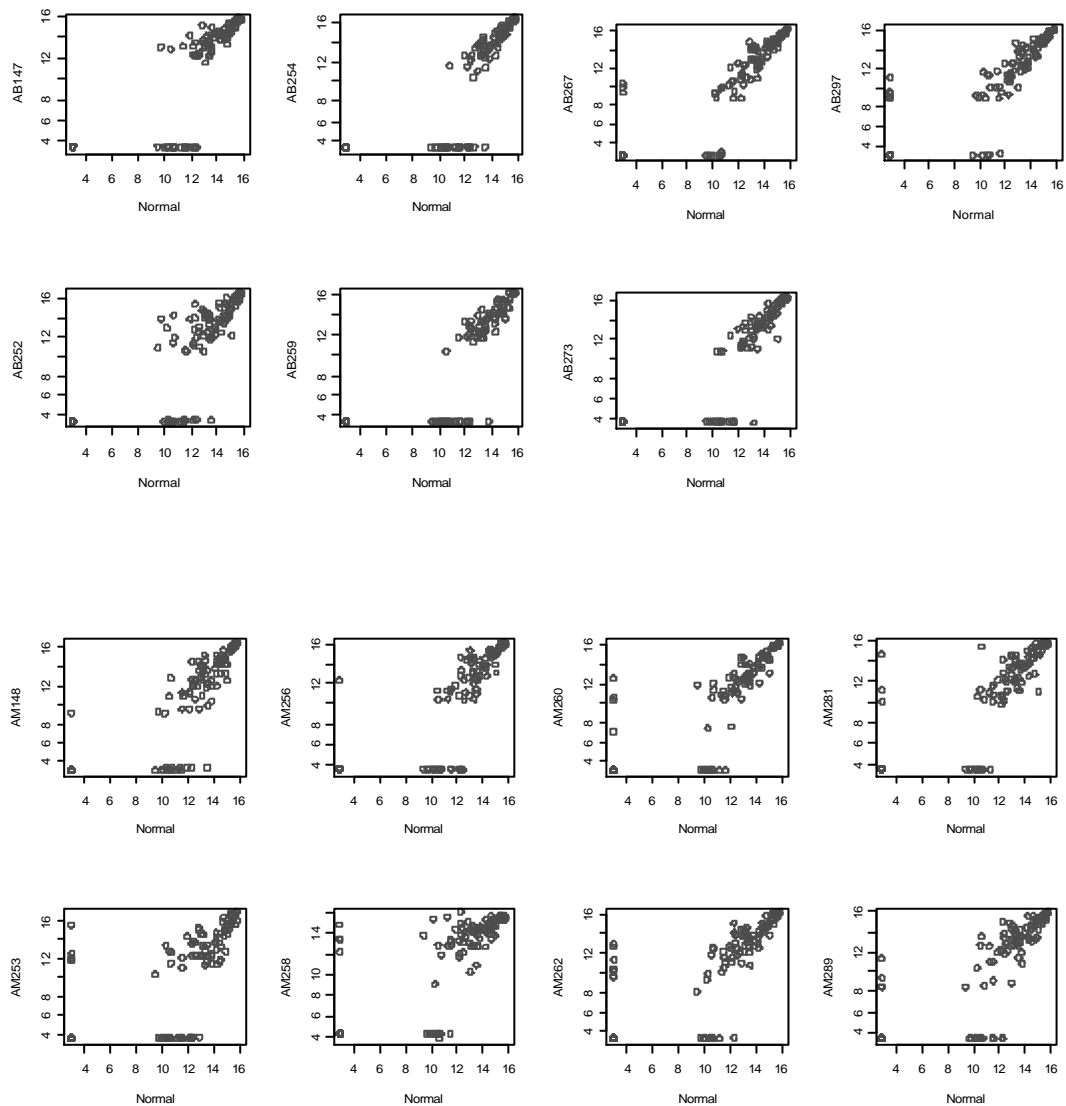


Figura 5: Dispersão dos dados de cada uma das amostras em comparação à amostra-referência (normal). No painéis superior e inferior estão os adenomas e os carcinomas (definidos de acordo com o escore de Weiss), respectivamente. Observar a maior dispersão dos dados nos carcinomas e a presença de genes expressos apenas na amostra referência mas não nas amostras tumorais.

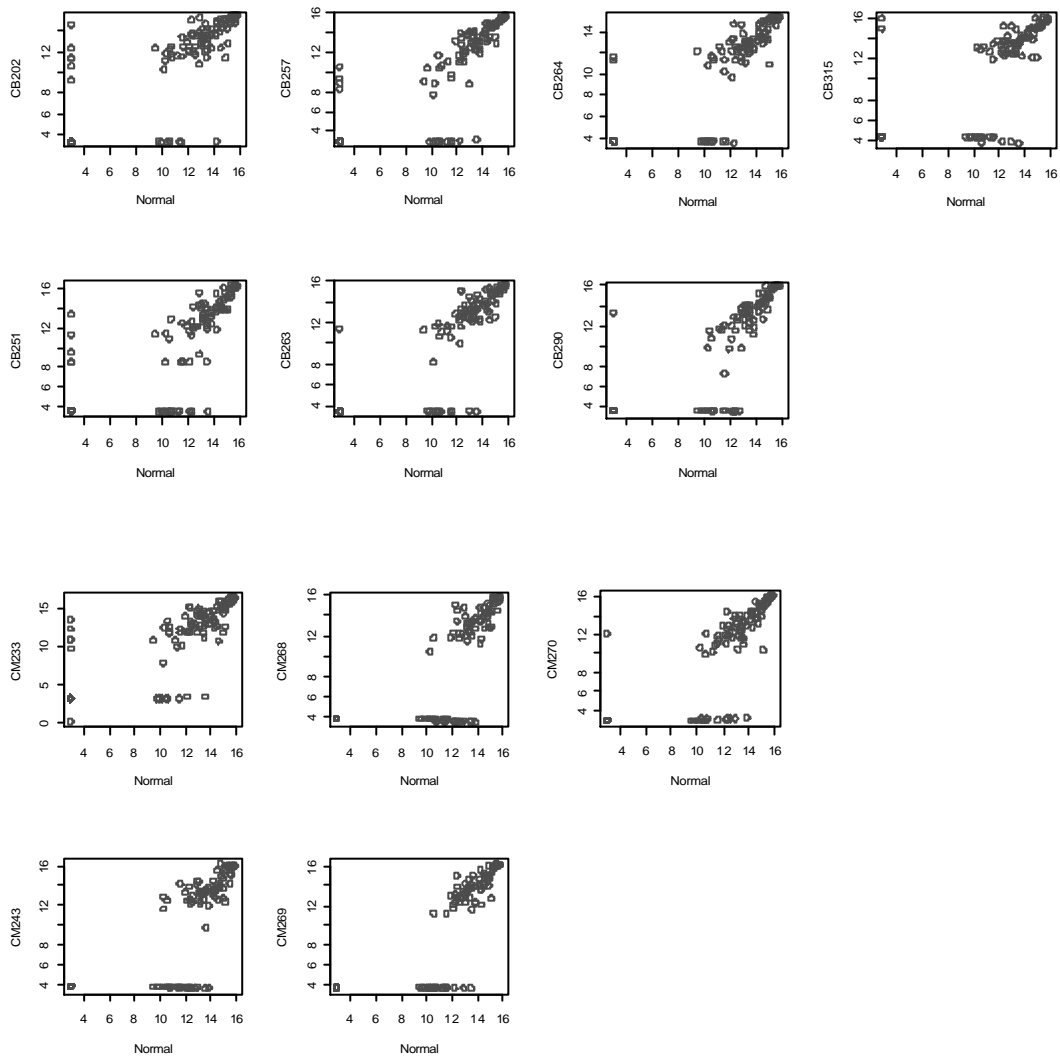


Figura 6: Dispersão dos dados de cada uma das amostras em comparação à amostra-referência (Normal) nos casos pediátricos. Nos painéis superior e inferior estão os tumores não-metastáticos e metastáticos respectivamente. Da mesma maneira como ocorre com espécimes de pacientes adultos, É nítida a presença de genes expressos apenas na referência e não nas amostras tumorais. Entretanto, o padrão de dispersão dos pontos das lesões de boa evolução é semelhante àquele apresentado pelas lesões de evolução agressiva.

4.2 Análise de Grupamentos

Nesta análise, verificamos se os grupos definidos a partir de dados clínicos e histopatológicos coincidem com uma classificação unicamente molecular. Para isso recorreremos à análise de grupamento. Nesta análise utilizamos dados de expressão de todos os genes representados no *array* e os algoritmos adotados permitem que os grupamentos das amostras sejam definidos de acordo com a distância estatística das espécimes (sem que haja qualquer intervenção humana no processo de agrupamento). Quando todos os experimentos foram incluídos nesta análise, observamos duas grandes partições. Uma partição (Figura 7A, grupamento da esquerda) foi formada por todos os adenomas e três carcinomas de pacientes adultos (definidos de acordo com os critérios de Weiss), além do RNA-referência de supra-renais normais (AD201). Dois destes (AM256 e AM258) apresentaram uma boa evolução após a cirurgia, apesar do grande tamanho. O carcinoma AM260 apresentou uma evolução agressiva e seria possivelmente uma classificação incorreta. Na segunda partição (Figura 7A, grupamento da direita) foram reunidos todos os tumores pediátricos e os demais carcinomas dos adultos. A composição desta segunda partição lembra em grande parte os gráficos de dispersão das expressões gênicas apresentadas anteriormente (Figuras 5 e 6). Portanto, a expressão de genes envolvidos na invasão e disseminação tumoral pelas neoplasias pediátricas de córtex supra-renal lembra aquela dos carcinomas de adultos e não guarda relação com evolução de pacientes pediátricos (Figura 7A).

Quando os tumores dos pacientes adultos foram analisados separadamente, houve uma nítida separação entre os adenomas e carcinomas em duas grandes subdivisões (Figura 7B). Todos os adenomas e carcinomas foram corretamente classificados, exceto o paciente AB252. Este caso, apesar de ter sido classificado como adenoma pela histologia, exibia algumas características clínicas de carcinoma, como grande tamanho tumoral, produção mista e altos níveis de DHEA-S. Além disso, dados do nosso grupo indicam que este tumor produzia níveis elevados de *IGF2*, característica dos carcinomas. Na estrutura do agrupamento, este caso foi agrupado juntamente com o paciente AB256, que apesar da histologia sugestiva de malignidade e uma grande massa tumoral, o paciente evoluiu bem após a cirurgia. Mais uma vez, a amostra-referência (AD201) foi classificada no grupo dos adenomas (figura 7C).

A análise dos casos pediátricos separados dos adultos também dividiu estes pacientes em dois grupos (figura 7C). Entretanto, não foi observado nenhum grupo em que as espécimes de má evolução fossem reunidos e nenhum padrão específico foi obtido através dessa análise (figura 7C). Isso pode sugerir que os perfis de expressão dos tumores pediátricos são mais homogêneos ou indica que os genes representados neste *array* específico para vias de disseminação e invasão tumoral não são capazes de discriminar as espécimes quanto à evolução da neoplasia.

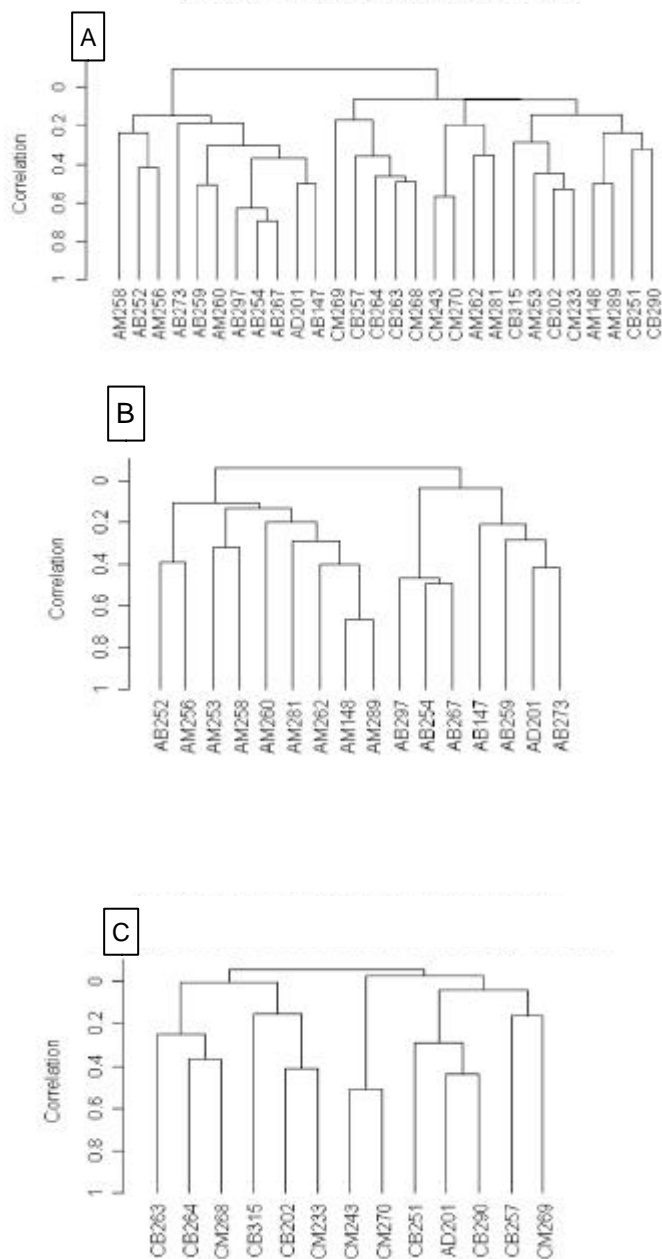


Figura 7: Dendrogramas referentes às análises de agrupamento de todos os casos (A), apenas dos adultos (B) e casos pediátricos (C). A distância (coeficiente de correlação) entre espécimes ou grupos são mostradas pela barra que une as folhas ou os ramos que formam os grupos. As figuras A e B mostram uma tendência em se agrupar os adenomas dos adultos no mesmo subgrupo. Entre as crianças não há distinção entre tumores metastáticos e não-metastáticos (C).

4.3 Inferência Comparativa das Expressões Gênicas

Interrogamos os genes representados nos arrays em busca daqueles que estão diferencialmente expressos entre os grupos de pacientes estudados. Esta comparação pode nos levar a uma melhor compreensão das diferenças biológicas entre os grupos analisados. Em virtude das diferenças apresentadas pelas amostras de pacientes pediátricos nos gráficos de dispersão de dados a análise comparativa da expressão de genes foi feita separando esta faixa etária dos pacientes adultos. Como pode ser visto nas Tabelas 4A e 4B, 13 genes foram apontados como sendo diferencialmente expressos entre carcinomas e adenomas dos pacientes adultos (classificados conforme a pontuação de Weiss) adotando um p não ajustado $\leq 0,05$. Quando a proporção de falsa descoberta (FDR) de 20% é aplicada apenas 2 genes (MMP11, DENR) puderam ser identificados utilizando o procedimento de Benjamini e Hochberg (135). A grande maioria dos genes identificados como diferencialmente expressos entre os adenomas e carcinomas de córtex adrenal de adultos estão envolvidos com a regulação da adesão celular e interação da célula com a matriz extracelular (MMP11, FN1, MMP7, APC, CDH11, EZR, MCAM e TPBG, Tabelas 4A e 4B) indicando a importância destes processos no estabelecimento do fenótipo maligno em carcinoma de córtex adrenal de adultos. Além desses, foram identificados também os genes envolvidos em sinalização trófica e regulação de progressão do ciclo celular (DENR, FGFR4, CDKN2A, APC, NME1).

A comparação dos carcinomas e adenomas do grupo pediátrico (considerando, respectivamente, a presença e a ausência de metástase e/ou invasão) identificou bem menos genes diferencialmente expressos que as amostras oriundas de pacientes adultos. Apenas, 6 genes foram considerados diferencialmente expressos quando o p não ajustado $\leq 0,05$ foi adotado como critério de corte (Tabelas 5A e 5B). Nenhum gene foi considerado diferencialmente expresso quando a FDR de 20%. Além de ser em número muito menor a identidade dos genes identificados nos pacientes pediátricos também difere substancialmente o que indica que neoplasia de córtex adrenal de adultos e de crianças são biologicamente distintas.

A

ID	Gene	t	Mediana AB	Mediana AM	p	FDR
27	DENR	-4.53	13131,44	22534,74	0.000823008	0.001666667
35	FN1	-3.12	22026,30	42751,01	0.008659656	0.003333333
15	CDKN2A	-2.67	4067,39	8466,16	0.020239917	0.005
76	NME1	2.30	71711,18	51048,45	0.038854039	0.006666667

B

ID	Gene	Wilcoxon	Mediana CB	Mediana CM	p	FDR
63	MMP11	1	10,27	2619,87	0.000621601	0.001851852
33	FGFR4	4	4866,31	23226,29	0.003729604	0.003703704
37	GNRH1	7	9.94	1227.25	0.013986014	0.005555556
2	APC	9	9.96	1227,85	0.028904429	0.007407407
9	CDH11	9	9.96	5221.12	0.028904429	0.009259259
114	EZR	47	50397.53	30405,00	0.028904429	0.011111111
5	CAV1	10	12,10	1285,81	0.04009324	0.012962963
57	MCAM	10	6344,43	16307,93	0.04009324	0.014814815
109	TPBG	10	10,37	4705,48	0.04009324	0.016666667

Tabelas 4A e 4B: relação de genes diferencialmente expressos entre adenoma e carcinoma de córtex adrenal de adultos. A normalidade da distribuição das expressões foram avaliadas primeiro com teste de Shapiro-Wilk. O teste t de Student foi aplicado naqueles genes cujos valores de expressão seguem distribuição normal (a). O teste de Wilcoxon foi aplicado naqueles genes cuja normalidade da distribuição foi rejeitada pelo teste (b). O valor do p apresentado é o univariado não ajustado. O controle da taxa de falsa detecção foi feita para corrigir as múltiplas comparações realizadas. Consideram-se os genes diferencialmente expressos aqueles cujo p não ajustado é menor do que o valor do p ajustado pelo FDR.

A

ID	Gene	t	Mediana CB	Mediana CM	p	FDR
51	ITGA7	-3.18	17286,65	22396.13	0.01157852	0.001666667
52	ITGB3	-2.91	37126,51	48239,69	0.01634542	0.003333333
24	CXCL12	3.18	9353,26	2876,66	0.01751832	0.005
14	CDK4	-2.37	47021.77	58896,74	0.04017923	0.006666667
42	HDAC1	-2.34	41579,07	59573,67	0.04383998	0.008333333

B

ID	Gene	Wilcoxon	Mediana CB	Mediana CM	p	FDRi
114	EZR	1	28116,52	44891,17	0.005050505	0.001851852

Tabelas 5A e 5B: relação de genes diferencialmente expressos entre tumores metastatizante e não metastatizante de córtex adrenal pediátricos. O teste t de Student foi aplicado naqueles genes cujos valores de expressão seguem distribuição normal (a). O teste de Wilcoxon foi aplicado naqueles genes cuja normalidade da distribuição foi rejeitada (b). O valor do p apresentado é o univariado não ajustado. O controle da taxa de falsa detecção foi feita para corrigir as múltiplas comparações realizadas. Consideram-se os genes diferencialmente expressos aqueles cujo p não ajustado é menor do que o valor do p ajustado pelo FDR.

4.4 Análise de Componente Principal (PCA)

Uma segunda análise de descobrimento das classes – a análise de componente principal (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) foi realizada com o intuito de complementar a análise de agrupamento e de verificar se o uso de apenas genes diferencialmente expressos (utilizando o p não ajustado) entre amostras de tumores agressivos e de evolução benigna é capaz de melhorar a discriminação entre os grupos. Tanto genes como espécimes foram utilizadas como variáveis classificatórias nesta análise. Em vista da diferença apresentada da lista de genes diferencialmente expressos os grupos adulto e pediátricos foram analisados separadamente.

Os resultados da PCA podem ser apreciados em gráficos conhecidos como biplots em que as variáveis são representadas como vetores e as amostras são representadas como pontos. O módulo de cada vetor é a variância da variável que ele representa e os ângulos formados pelos vetores é a distância que existe entre as variáveis. A distância de cada ponto no biplot, por sua vez, é a representação gráfica da distância existente entre as amostras analisadas. Na análise dos tumores de adultos utilizando os genes como variáveis, 74% da variabilidade é explicada pelos dois primeiros componentes principais. Isso indica que estes dois componentes retêm

informação suficiente a respeito da variação dos dados. No biplot observa-se a formação nítida de dois grupos de tumores ocupando cantos diagonalmente opostos do gráfico (Figura 8a). Um desses grupos é constituído predominantemente de adenomas e outro, de carcinomas. Este resultado indica que este tipo de partição nas neoplasias adrenocorticais de adultos é robusta e que os genes incluídos na PCA são suficientes para esta separação. Na PCA utilizando espécimes de adultos como variáveis 87% da variabilidade é explicada pelos dois primeiros componentes principais. Observou-se que os genes são também reunidos em dois grupos distintos (Figura 8b). Um grupo formado por 7 genes próximos entre si e um outro bem mais disperso (Figura 8b).

A PCA das espécimes pediátricas revelou que, de fato, a distinção entre tumores adrenocorticais agressivos e de boa evolução é bem mais sutil do que a diferença existente nos tumores adultos (Figuras 9a e 9b). Os dois primeiros componentes principais explicavam 90,7% e 98,4% da variabilidade observada quando, respectivamente, os genes e as espécimes eram utilizadas como variáveis na PCA. Pode-se observar que, embora seja possível identificar visualmente dois grupos de neoplasias pelo *biplot*, a distância entre as amostras consideradas de boa evolução não era menor do que a distância destas amostras àsquelas consideradas de má evolução (Figura 9a). A separação, mesmo que imperfeita, das amostras pediátricas utilizando os genes diferencialmente expressos sugerem que estes genes possuem um papel relevante na definição da biologia do tumor adrenocortical pediátrico.

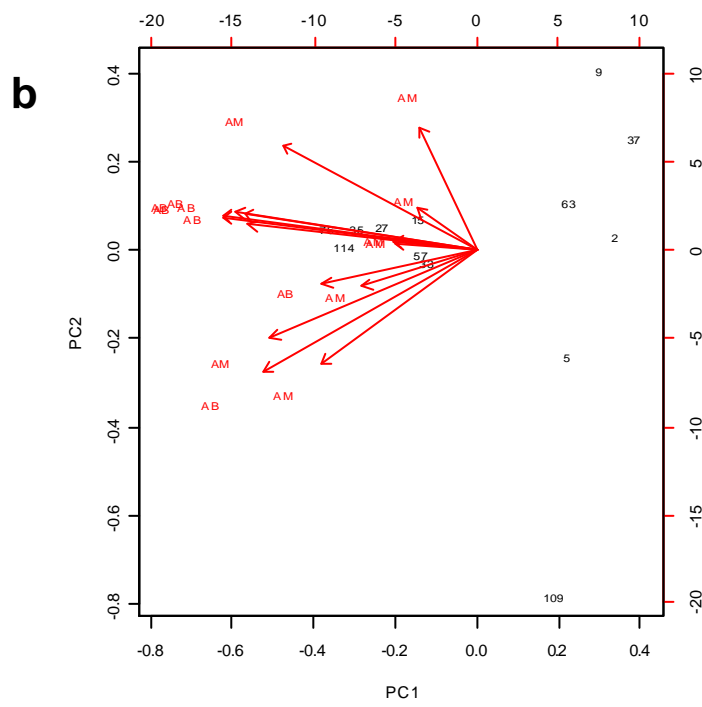
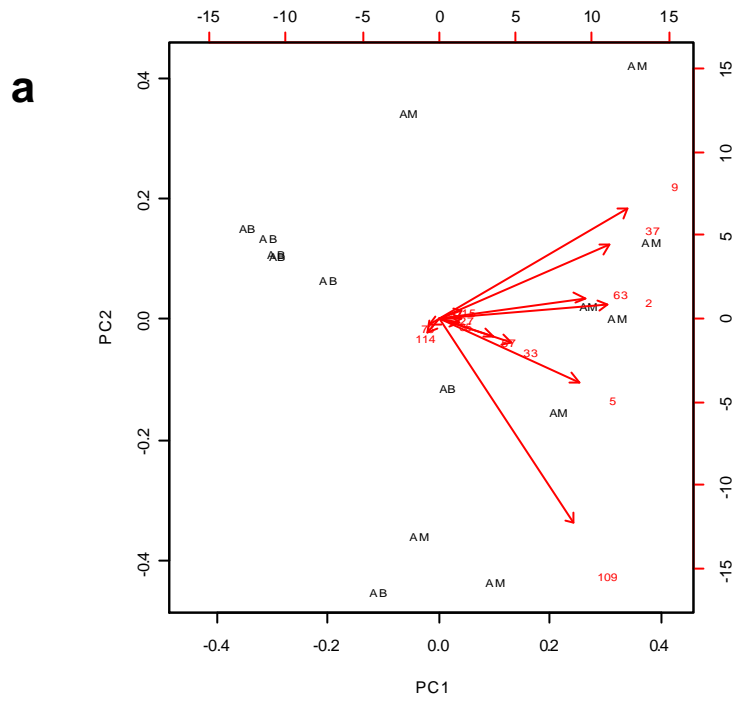


Figura 8: Ver legenda na próxima página

Figura 8 (página anterior): relação existente entre os tumores de córtex adrenal de adultos e os genes diferencialmente expressos entre adenomas e carcinomas. Os dados multivariados (espécimes ou genes) foram submetidos à análise de componente principal considerando como variáveis genes (a) ou espécimes (b). As variáveis são representadas no gráfico como setas e os casos, pontos identificados no plano. O ângulo entre as setas representa a correlação entre as variáveis e o tamanho das setas reflete a variância de cada variável. Notar a existência de dois grupos de espécimes (a).

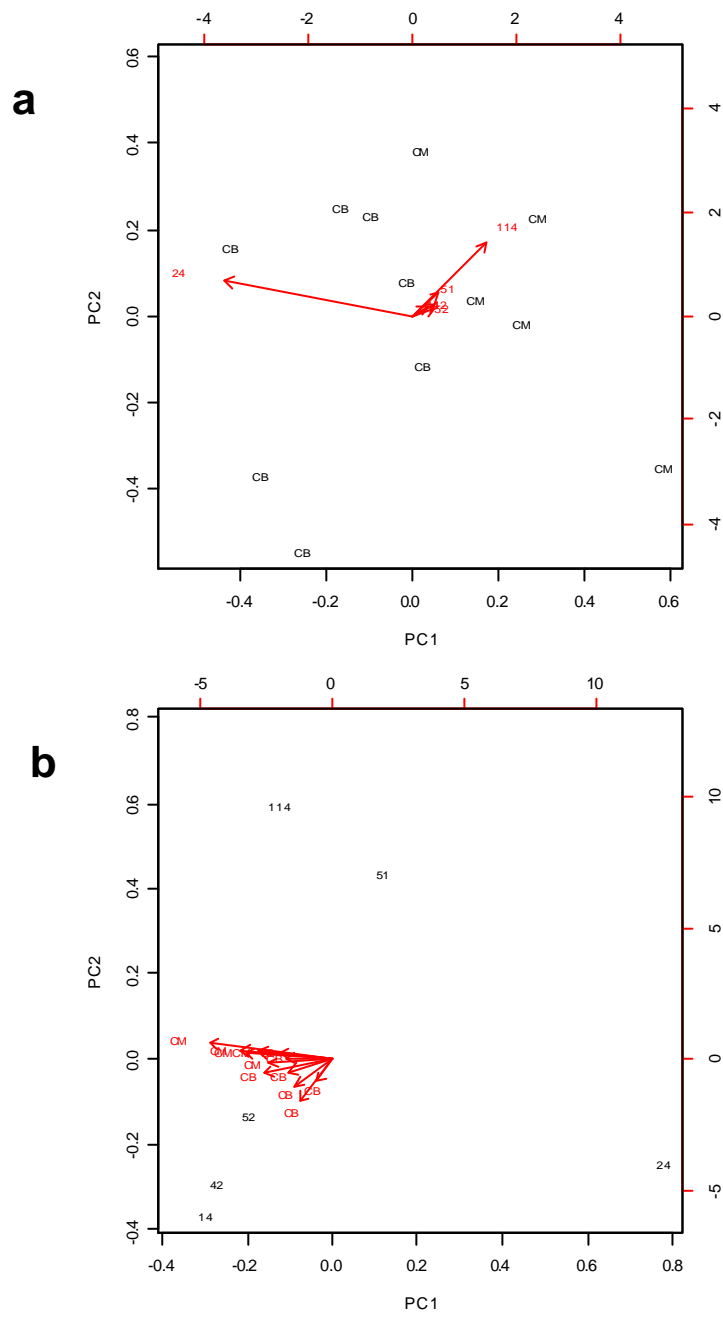


Figura 9: Ver légenda na próxima página

Figura 9 (página anterior): resultado da análise de componente principal mostrando a relação existente entre os tumores de córtex adrenal pediátricos e os genes diferencialmente expressos entre neoplasias metastatizantes e não metastatizantes pediátricos. As análises foram feitas utilizando como variáveis genes (a) ou espécimes (b). As variáveis são representadas no gráfico como setas e os casos, pontos identificados no plano. O ângulo entre as setas representa a correlação entre as variáveis e o tamanho das setas reflete a variância de cada variável.

4.5 Validação dos dados de *array*: Avaliação da expressão de *TIMP3* e *FN1* por PCR em tempo real

Tem sido advogada por alguns pesquisadores a necessidade de validação, por outra técnica, dos dados expressão obtidos em experimentos de *microarray*. Contribui para isso, além da necessidade de confirmação de achados com um procedimentos de outra natureza técnica, o fato de a informação a respeito de expressão gênica ser proveniente de hibridação reversa em fase sólida, o que adiciona interferentes nem sempre controláveis pelo experimentador. Além disso, a quantificação em *microarray* é comparativa e altamente dependente de métodos de normalização. Por isso decidimos verificar a validade dos dados de expressão obtidos por nossos *arrays* verificando a expressão dos genes inibidor de metalopeptidase 3 (*TIMP3*) e fibronectina 1 (*FN1*) pela PCR em tempo real. O *TIMP3* pertence a família de inibidores de metaloproteinases de matrix – um grupo de peptidases que degradam a matriz extracelular e que são fundamentais para fenômeno de invasão e disseminação tumoral (137). Os TIMPs participam da regulação de funções importantes para o comportamento biológico de neoplasias como crescimento tumoral, angiogênese e apoptose (138). Dos TIMPs avaliados por nosso *array* (*TIMP2*, *TIMP3* e *TIMP4*) apenas *TIMP3* está expresso em espécimes de tecidos adrenal (neoplásico ou não). Finalmente, o silenciamento da expressão do *TIMP3* por metilação está associado a carcinoma ductal de mama de grau mais elevado e que apresenta mais freqüente

comprometimento linfonodal. A *FN1*, por sua vez, é uma proteína da matriz extracelular que medeia a adesão da célula à matriz extracelular. No córtex da supra-renal humana a *FN1* apresenta um gradiente de distribuição centro-periferia e modula as características funcionais das células adrenocorticais (139). Finalmente, em tecido tumoral, a *FN1* pode promover invasão intercelular (140). Pelas razões expostas escolhemos *TIMP3* e *FN1* para validação dos dados de expressão apesar de nenhum dos dois ter sido identificado como diferencialmente expresso pela análise estatística.

A expressão dos genes obtida pela PCR em tempo real concorda de forma geral com o mesmo dado obtido pelo *array* (Figuras 10A e 10B). Tanto lesões agressivas quanto lesões de boa evolução (de adultos e de crianças) apresentaram expressão de *TIMP3* menor do que a amostra referência (Figura 10A). Na maioria das vezes a expressão do *TIMP3* pelo *array* foi menor do o valor fornecido pela PCR em tempo real. A *FN1* apresentou um padrão inverso daquele apresentado pelo *TIMP3*: a expressão deste gene nos tumores (de adultos ou pediátricos) foi maior do que a amostra referência em quase todas as amostras (Figura 10B). A expressão da *FN1* dada pela PCR em tempo real foi também maior do que o valor obtido pelo *array*.

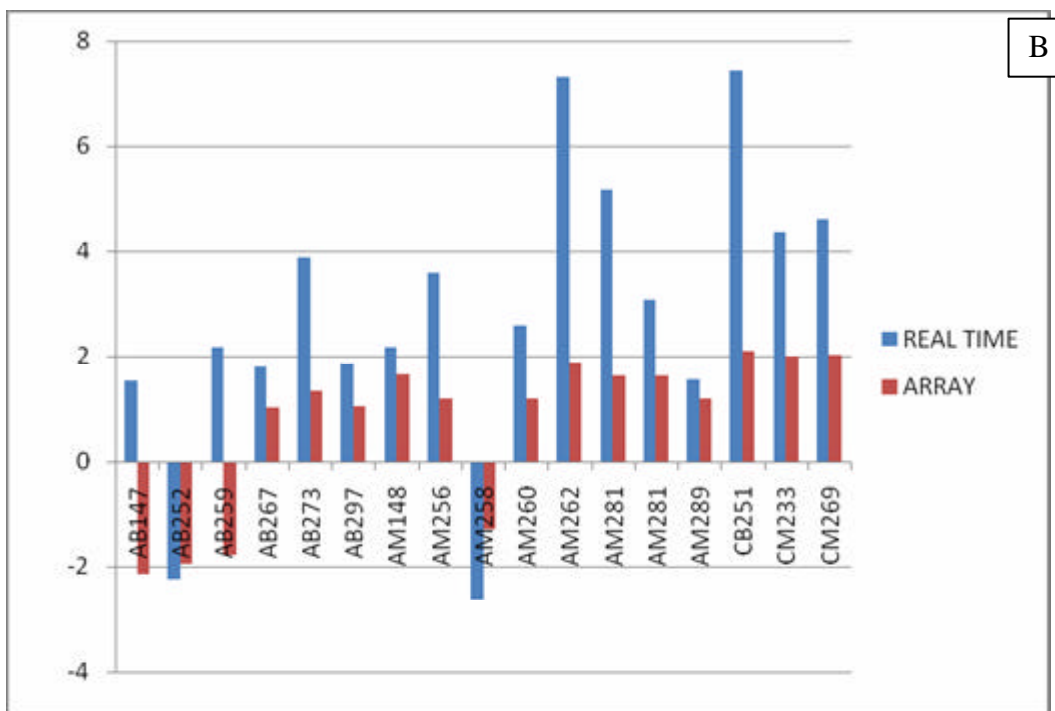
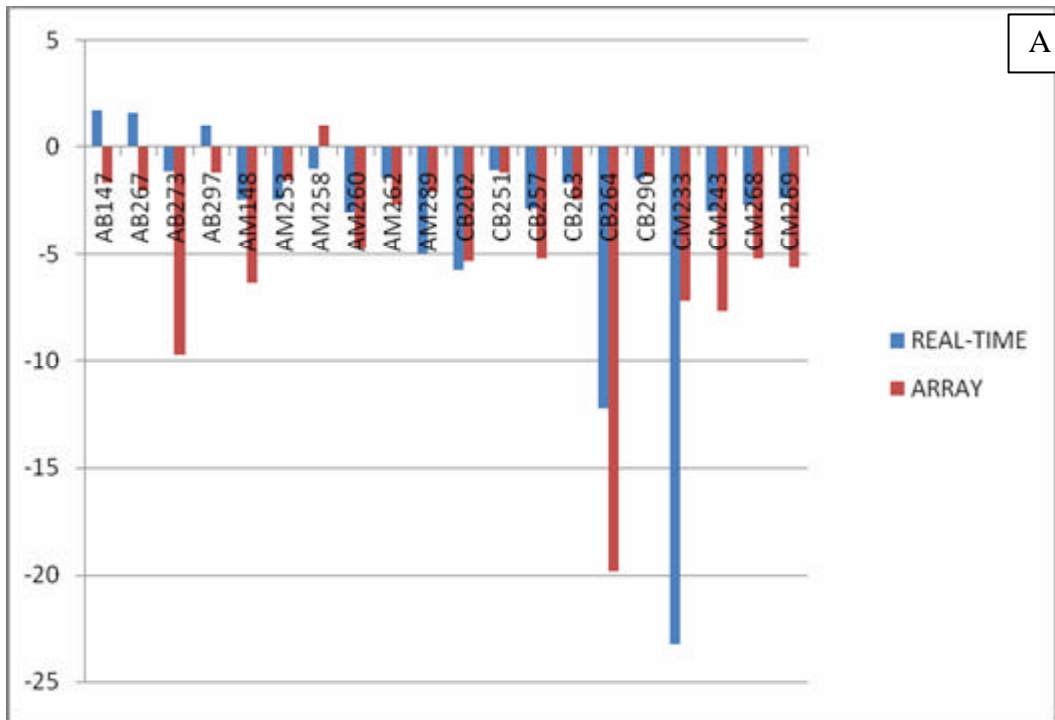


Figura 10: Expressão dos genes *TIMP3* (A) e *FN1* (B) avaliadas por PCR em tempo-real e pelos arrays de expressão (número de vezes em relação à amostra-referência).

4.6 Expressão da Gelatinase A

Pelo exposto na introdução, a gelatinase A (*MMP2*) foi uma das poucas metaloproteinases de matrix cujo papel na evolução da neoplasia de córtex da supra-renal foi investigada até agora (126, 127). Decidimos verificar se poderíamos obter observações semelhantes àquelas publicadas na literatura. Para isso utilizamos a RT-PCR semi-quantitativa em 19 pacientes da nossa casuística. A intensidade da banda de amplificação da gelatinase A foi normalizada pela intensidade da banda de amplificação da ciclofilina, utilizadas como controle interno. Em 8 de 10 casos de tumores não-metastáticos/invasivos a expressão da gelatinase A foi considerada positiva. Esta frequência de positividade não é menor do que a frequência nos tumores metastáticos/invasivos nos quais 6 dessas 9 amostras foram consideradas positivas (Figura 11). Não foi observada diferença na intensidade de expressão da gelatinase A entre os dois grupos (figura 12). Não foi observada correlação entre níveis de expressão de gelatinase A e tamanho tumoral ou pontuação de Weiss (figuras 13A e 13B).

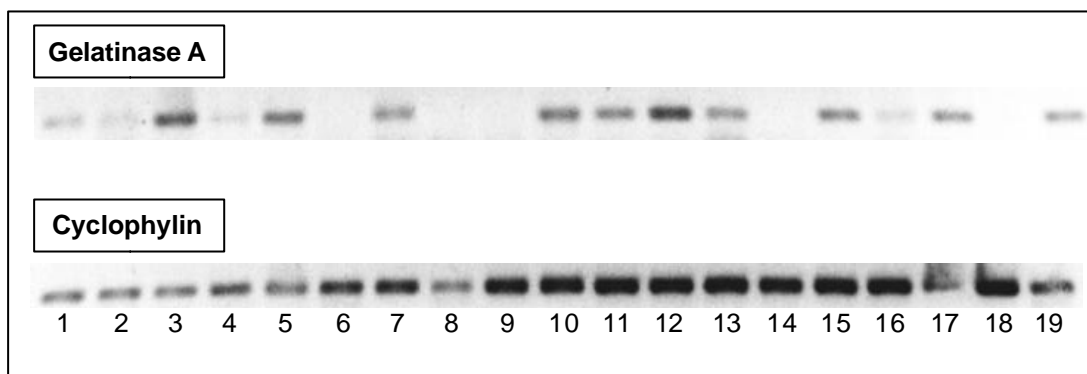


Figura 11: Expressão de Gelatinase A avaliada por RT-PCR semiquantitativa em 19 tumores metastáticos e não metastáticos do córtex da supra-renal de adultos e crianças. A expressão da Gelatinase A foi positiva em 8 de 10 casos não-invasivos/metastáticos (amostras 1, 4, 8, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17) e em 6 de 9 (amostras 2, 3, 5, 6, 7, 9, 11, 18 e 19) casos invasivos/metastáticos.

posição	paciente	posição	paciente	posição	paciente	posição	paciente
1	BC257	6	CM268	11	AM148	16	CB315
2	AM260	7	AM258	12	TA002	17	CB202
3	AM262	8	TP002	13	TP003	18	AM289
4	TP001	9	AM253	14	AB267	19	CM269
5	CM233	10	TA001	15	AB297		

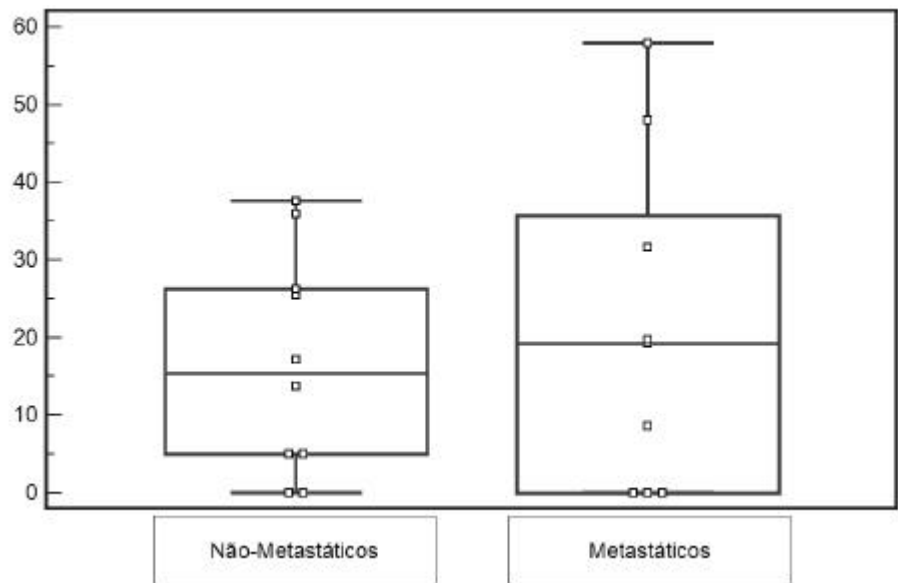


Figura 12: Níveis de expressão da Gelatinase A (normalizada pela expressão da ciclofilina) em tumores do córtex adrenal metastáticos e não-metastáticos. Não foi observada diferença de expressão entre os dois grupos (medianas=15,5 e 19,2 para não metastáticos e metastáticos respectivamente; $p=0,91$, teste de Mann-Whithney). Valores de expressão em unidades arbitrárias.

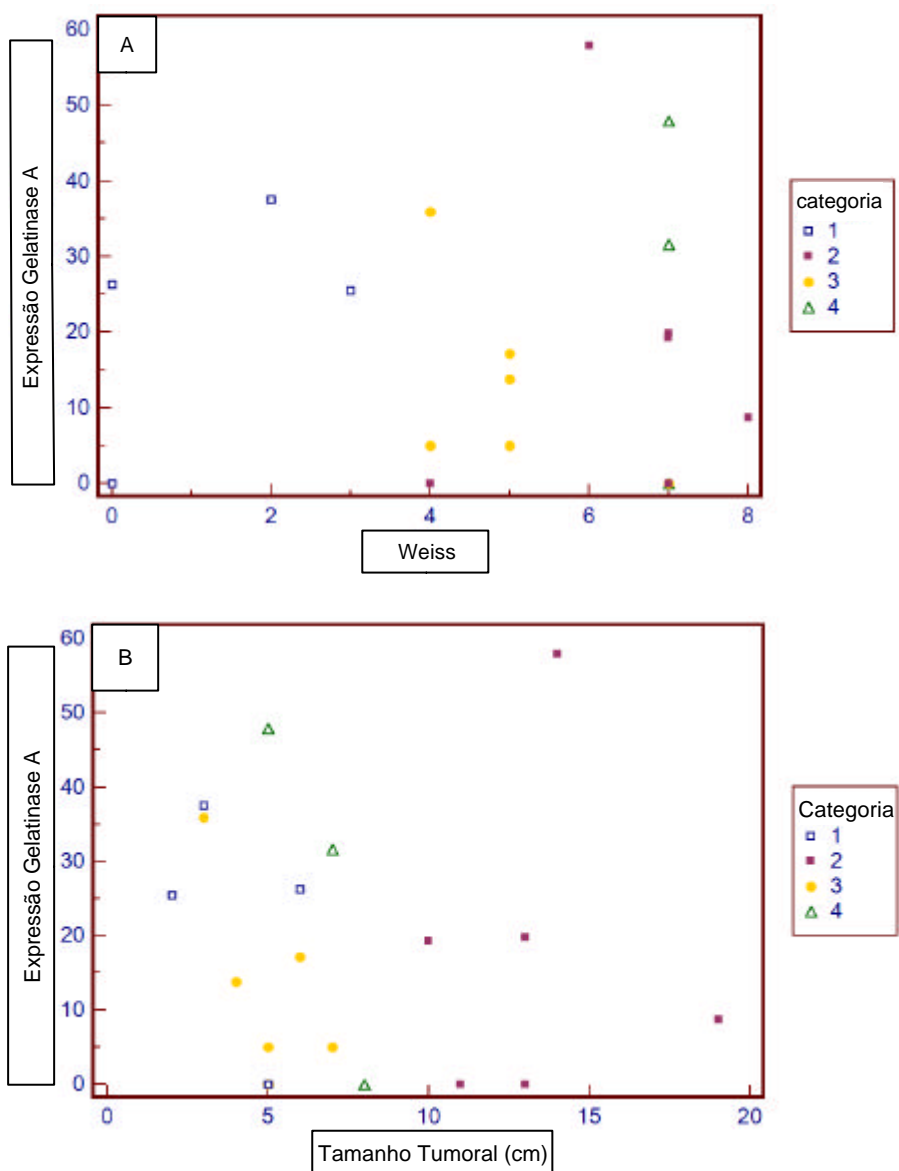


Figura 13: Relação entre escore de Weiss (A) e tamanho tumoral em cm (B) e níveis de expressão de Gelatinase A. Coeficientes de correlação $r=-0,1$, $p=0,6$ e $r=-0,01$, $p=0,9$ (Spearman). Categorias: 1= adultos não-metastáticos, 2= adultos metastáticos, 3= crianças não-metastáticos, 4=crianças metastáticos

4.7 Análise de LOH da região 22q12.3

Tanto dados de nosso *array* quanto os resultados de PCR em tempo real indicam que o *TIMP3* está menos expresso em tumores de córtex adrenal do que na amostra referência (Figura 10A). Quando comparamos as lesões agressivas com lesões de evolução mais branda (sejam de adultos ou pediátricos) a mediana do sinal de *TIMP3* pelo *array* foi menor nas neoplasias agressivas (tumores de adultos: 10884,45 x 18413,34, carcinoma e adenoma, respectivamente; tumores pediátricos: 5093,69 x 15101,19, metastatizante e não metastatizante, respectivamente). Por essa razão investigamos se a instabilidade do locus do *TIMP3* poderia ser o mecanismo subjacente à redução da expressão deste inibidor de metaloproteases nas neoplasias do córtex adrenal. O estado dos marcadores D22S280 e D22S283 (presença ou não da perda da heterozigose, LOH) e a abundância do RNA do *TIMP3* estão apresentados na Tabela 6. Não foi possível associar a presença da LOH à baixa abundância de RNA do *TIMP3* em tumores de córtex adrenal. Observamos amostras que apresentam níveis de expressão reduzidos e que apresentam LOH dos marcadores estudados. Porém, alguns casos apresentam níveis de expressão reduzidos na ausência de LOH dos marcadores, indicando que alterações epigenéticas podem estar envolvidas, uma vez que metilação do promotor do gene *TIMP3* é freqüentemente descrita em outros tumores.

	D22S280	D22S283	Expressão*
AM148	NR	-	-2,44
AM253	+	+	-2,46
AB297	-	-	1,05
CB202	+	+	-5,71
CB264	-	-	-12,19
CB290	NI	-	-1,48
CM233	+	+	-23,2
CM269	-	-	-2,39

*Níveis de expressão do gene *TIMP3* avaliados por PCR em tempo real

“+”: Presença de LOH; “-“: Ausência de LOH

NR: não realizado; NI: não informativo

Tabela 6: Estado dos marcadores D22S280 e D22S283 e níveis de expressão do gene *TIMP3*

4.8 Marcadores moleculares e classificação das lesões

A pergunta natural num estudo de neoplasia utilizando microarray é se os genes identificados como diferencialmente expressos poderiam ser utilizados para prever o fenótipo clínico de novas espécimes. Após a identificação dos genes diferencialmente expressos e a demonstração de que estes genes descrevem a diferença biológica existente entre os diferentes grupos tumorais (ver resultados do PCA em seções prévias) testamos quais genes, entre os diferencialmente expressos, melhor discrimina os diferentes grupos tumorais. Visto que demonstramos que existe concordância entre os dados de PCR real-time e os dados de expressão esta análise é o primeiro passo para desenvolvermos um sistema de diagnóstico de neoplasia de córtex adrenal baseado marcadores moleculares.

A capacidade de cada um dos genes de prever o fenótipo clínico das espécimes foi avaliada utilizando modelos de regressão logística. Este tipo de abordagem visa encontrar modelos que melhor descreve a relação entre variáveis dependentes (ou de resposta) binárias e um conjunto de variáveis independentes. Utilizamos como variáveis independentes a intensidade de expressão de genes tal como foi detectada pelo experimento de microarray e a variável dependente foi a ausência (1) ou presença (0) de agressividade (seja pelo diagnóstico histológico ou pela evolução clínica do paciente). Todos os genes identificados como diferencialmente expressos pelo p univariado não ajustado foram incluídos na análise.

Oito dos 13 genes utilizados na construção de modelos de regressão logística foram capazes de categorizar com acertos de 80% ou mais as amostras de tecido tumoral de pacientes adultos (Tabela 7A). Dois desses genes tiveram um desempenho ainda melhores. Um deles – proteína regulada por densidade, DENR – categorizou de maneira correta todas as lesões obtidas em pacientes adultos (dados não apresentados). O segundo gene, metaloprotease de matriz 11 (*MMP11*) identificou corretamente todos os carcinomas de adultos mas classificou erroneamente um dos adenomas (AB267) como carcinoma (dados não apresentados) o que representa um acerto de 93,3%. Portanto, estes dois genes podem potencialmente ser utilizados como marcadores novos de malignidade de córtex adrenal em adultos. Os 6 genes restantes erram pelo menos duas classificações (dados não apresentados).

Os genes diferencialmente expressos em neoplasias do grupo pediátrico não tiveram um desempenho tão impressionante quanto o seu equivalente de adulto (Tabela 7B). Dos 6 genes utilizados na modelagem 4 foram capazes de classificar corretamente 83,3% das amostras. Todos eles erraram na classificação de uma lesão de evolução agressiva e outra de evolução benigna. O gene cujo modelo melhor se ajustou foi o gene da vilina ou ezrina (*EZR*).

A

Neoplasias adrenocorticais de adultos

Gene	k	$2 \times \log L$	AIC	Predições corretas
DENR	2	0	4	1
MMP11	2	5.9838	9.9838	0.9333333
FGFR4	2	10.3975	14.3975	0.8666667
GNRH1	2	11.9849	15.9849	0.8
EZR	2	12.5917	16.5917	0.6666667
FN1	2	12.6676	16.6676	0.8
APC	2	13.6197	17.6197	0.8
CDKN2A	2	14.2685	18.2685	0.8
CDH11	2	14.3369	18.3369	0.8
NME1	2	15.9322	19.9322	0.6666667
MCAM	2	15.9776	19.9776	0.6666667
CAV1	2	16.0953	20.0953	0.7333333
TPBG	2	17.2137	21.2137	0.7333333

B

Neoplasias adrenocorticais pediátricos

Gene	k	$2 \times \log L$	AIC	Predições corretas
EZR	2	5.5946	9.5946	0.8333333
CXCL12	2	6.3207	10.3207	0.8333333
ITGA7	2	9.1764	13.1764	0.8333333
ITGB3	2	9.2663	13.2663	0.8333333
CDK4	2	11.4219	15.4219	0.75
HDAC1	2	11.4884	15.4884	0.5833333

Tabelas 7A e 7B: detecção de genes que mais discriminam adenomas de carcinomas (adultos - A) ou tumores não metastatizantes de metastatizantes (pediátricos - B). Genes diferencialmente expressos foram submetidos a ajustes de modelos de regressão logística e os valores ajustados da variável dependente foram utilizados no cálculo de previsões corretas.

k: número de classes do modelo.

$2 \times \log L$: estimativa do desvio do modelo em relação ao modelo saturado.

AIC: Akaike information criterion ($2 \times \log L + 2k$)

Predições corretas: número de predições corretas/tamanho da amostra

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

O *microarray* tem sido explorado como uma ferramenta para se examinar o perfil transcricional de diferentes tecidos, e com isso, estabelecer padrões de expressão gênica associados a diversas situações fisiológicas e patológicas (141). Em oncologia, dados extraídos a partir de perfis de expressão têm contribuído de maneira significativa para classificação de tumores, previsão de prognóstico, descoberta de genes e caracterização de suas vias de sinalização, bem como previsão de resposta terapêutica (142-144). Sistemas de classificação de tumores baseadas em perfis transcricionais têm-se mostrado mais eficazes que classificações baseadas em critérios histopatológicos. Diversas “assinaturas” – padrões de expressão de um determinado grupo de genes - têm sido relacionadas ao prognóstico de alguns subgrupos de tumores. Um dos melhores exemplos é o câncer de mama. Os tumores em estágio I têm uma chance de desenvolver doença metastática de cerca de 20%, baseado em critérios histológicos. Isso faz com que até 80% das pacientes portadoras de neoplasias de mama em estádios iniciais recebam quimioterapia profilática “desnecessariamente”. Recentemente, um estudo com *microarray* encontrou um perfil de expressão capaz de estratificar de maneira mais precisa quais pacientes apresentarão maior chance de recidiva (145, 146), permitindo uma orientação terapêutica com uma melhor relação custo-benefício. O processo de disseminação de uma neoplasia é complexo e envolve uma ação coordenada temporalmente

e espacialmente de um grande número de genes e respectivas vias de sinalização. Estas vias, que participam de processos fisiológicos do organismo tais como inflamação e reparo, organogênese e embriogênese e migração celular, são ativadas de maneira anômala no processo de invasão e metástases. Portanto, neoplasias malignas de diversas origens compartilham um grande repertório de mecanismos efetores conhecidos. Este fato foi muito bem demonstrado em um estudo envolvendo neoplasias epiteliais de diversas origens. De acordo com este estudo, uma “assinatura” comum a todas essas neoplasias conferia um pior prognóstico, independente do tecido de origem (147). Além disso, algumas características morfológicas e histológicas que sabidamente estão associadas a um pior prognóstico, apresentam uma “assinatura” comum a diversas neoplasias. É sabido que as neoplasias nas quais se pode identificar a presença de fibroblastos ativados apresentam um pior prognóstico (148). Um estudo recente definiu a partir de um modelo *in-vitro* uma assinatura de ativação de fibroblastos e mostrou que diversas neoplasias que apresentavam um padrão de expressão semelhante a essa assinatura, apresentavam um pior prognóstico (149). O processo de disseminação metastática, portanto, é precedido por alterações da expressão gênica de vias moleculares conhecidas nos tumores primários, que por sua vez podem ser detectadas e caracterizadas por experimentos de expressão gênica global, como os *microarrays*. Nas neoplasias do córtex da supra-renal, o conhecimento das vias de sinalização envolvidas especificamente no processo de disseminação metastática ainda é muito limitado. Os estudos de *microarray* disponíveis no momento apontaram

algumas diferenças biológicas importantes entre os carcinomas e os adenomas, mas nenhum destaque foi dado às vias de disseminação metastática.

Na presente tese foi estudada a expressão de genes envolvidos especificamente em processos de invasão e metástases. O uso de um array *boutique*, uma plataforma simplificada com genes pré-selecionados fundamentais para diversas etapas do processo de disseminação, justifica-se por sua simplicidade, por facilitar o processo analítico, pelo baixo custo e por não exigir equipamentos sofisticados, ainda pouco acessíveis em nosso meio. Todas as etapas do procedimento podem ser executadas em um laboratório com infra-estrutura básica em biologia molecular. Porém, apesar do número reduzido de genes em comparação às plataformas “genômicas”, as principais vias participantes do processo de disseminação metastática encontram-se representadas.

A análise de agrupamentos revelou que os adenomas dos indivíduos adultos formam um grupo distinto dos demais tumores (carcinomas de adultos e tumores pediátricos), e apresentam um perfil de expressão mais próximo ao perfil de expressão da supra-renal normal. Os carcinomas de adultos, por sua vez, foram agrupados juntamente com os tumores pediátricos quando todos os tumores foram analisados em conjunto. Quando os tumores de pacientes adultos foram analisados separadamente os adenomas foram agrupados em um subgrupo separado dos carcinomas (exceto pelo adenoma AB252, incluído no grupo de carcinoma). Já os

tumores pediátricos não apresentaram segregação entre os tumores metastáticos e não-metastáticos. É interessante examinar a situação de alguns casos com características atípicas (os carcinomas AM256 e AM258 e o adenoma AB252). Apesar de características clínicas, laboratoriais e de imagem sugestivas de agressividade, eles apresentaram uma boa evolução clínica. Do ponto de vista de expressão gênica, a característica mais marcante dos três casos é a expressão aumentada do gene SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) (média geométrica dos três casos 25321 contra 54 dos demais carcinomas). O gene SLPI (*secretory leucocyte protease inhibitor*) é uma proteína de cadeia única, não glicosilada, produzida por diversos tipos celulares, como células epiteliais pulmonares, células secretoras das glândulas salivares e várias células inflamatórias e do sistema imune, como os macrófagos, neutrófilos e linfócitos B. Foi inicialmente caracterizada como um inibidor de serina-protease, com atividade contra a elastase dos neutrófilos, catepsina G, tripsina e quimiotripsina. Sua principal função é proteger os tecidos de lesões inflamatórias decorrentes da atividade destas enzimas. Os mecanismos de atuação desta proteína não foram totalmente elucidados, mas parece que é via inibição da ativação do NF- κ B, que leva à redução da produção de TNF- α , atenuando a resposta inflamatória a vários estímulos. Um estudo recente mostrou que a hiperexpressão desta enzima reduz a capacidade de uma linhagem celular derivada de câncer de pulmão em estabelecer metástases hepáticas, provavelmente por interferir na resposta de citocinas inflamatórias e interação entre as células tumorais e células do sistema imunológico, de

maneira a atenuar o processo inflamatório local (150). Este fato sugere que mecanismos imunológicos/inflamatórios podem desempenhar um papel importante no processo de disseminação metastática das neoplasias da supra-renal, além de sugerir que drogas imuno-moduladoras poderiam ser incluídas em esquemas terapêuticos. De fato, um relato de caso recente mostrou regressão de doença metastática refratária à quimioterapia convencional em uma paciente portadora de doença metastática, com o uso da talidomida, uma droga imunomoduladora (151).

Comparando os dados obtidos nas análises de grupamentos com outros trabalhos da literatura, algumas semelhanças podem ser apontadas. A análise de grupamento realizada em um estudo envolvendo 11 casos de carcinomas do córtex adrenal (9 primários e duas metástases), 4 adenomas, 3 glândulas normais e uma hiperplasia foi capaz de separar os carcinomas das demais amostras (exceto por um carcinoma de “baixo grau”, que foi agrupado juntamente com os adenomas) (70). Em um estudo envolvendo 24 tumores do córtex adrenal pediátricos, a análise de grupamentos não foi capaz de distinguir os tumores classificados como adenomas dos carcinomas (65). Portanto, o nosso estudo recapitula essa dificuldade de distinção entre tumores metastáticos e não metastáticos de crianças do ponto de vista de expressão gênica. Este fato não é surpreendente, considerando que, entre os tumores pediátricos, os “adenomas” e os “carcinomas” apresentam defeitos genéticos semelhantes. Por exemplo, mutações germinativas do *TP53* ocorrem tanto nos “adenomas” quanto nos “carcinomas” pediátricos. Além disso, os estudos de CGH mostram o mesmo

espectro de alterações em ambos os subgrupos. Estas semelhanças refletem a dificuldade no diagnóstico diferencial destes tumores, tanto do ponto de vista clínico, quando de imagem e histológico, conforme citado anteriormente. É possível que do ponto de vista biológico os tumores metastáticos e não metastáticos pediátricos representem extremos de um espectro evolutivo de uma mesma entidade. Ao passo que, no caso dos adultos, os adenomas e os carcinomas parecem ser entidades biologicamente distintas. Os dados apresentados nesta tese são os primeiros que fazem uma comparação direta na mesma plataforma entre perfis de expressão de tumores adultos e pediátricos.

Do ponto de vista de expressão gênica, notam-se similaridades entre os carcinomas adultos e pediátricos o que seriam possivelmente reminiscências de algumas semelhanças na patobiologia molecular das duas entidades, como a hiperexpressão do *IGF2* e o envolvimento do supressor tumoral *TP53*. Um estudo recente comparou os perfis de expressão de tumores pediátricos e carcinomas de adultos com a supra-renal fetal e diversas semelhanças foram encontradas. As principais semelhanças são redução da expressão da *3bHSD* e do gene *CDKN1C* e hiperexpressão do *IGF2* e do receptor do tipo 4 para o fator de crescimento de fibroblastos (*FGFR4*), um receptor do tipo tirosina-quinase (64, 65). O papel do *FGFR4* na tumorigênese adrenal ainda não foi estabelecido. Estudos prévios detectaram expressão aumentada deste receptor em carcinomas de adultos e tumores pediátricos (19, 65). Os dados encontrados no presente estudo (hiperexpressão do *FGFR4* pelos carcinomas dos adultos e tumores

pediátricos em geral) são semelhantes aos reportados na literatura. Sabe-se que o fator de crescimento para fibroblastos do tipo 2 (bFGF), que é capaz de ligar-se ao FGFR4, é um potente mitógeno e fator angiogênico para a adrenal fetal (62). Especula-se se seus efeitos tróficos são mediados parcialmente pela ligação com o *FGFR4*. É possível que o bloqueio farmacológico do *FGFR4* através de um bloqueador específico poderia constituir uma opção terapêutica para os casos não curáveis cirurgicamente. Além do *FGFR4*, foram identificados também outros genes envolvidos em sinalização trófica e regulação de progressão do ciclo celular (*DENR*, *CDKN2A*, *APC*, e *NME1*).

Entre os genes diferencialmente expressos entre os adenomas e os carcinomas do córtex adrenal de adultos, um número expressivo está envolvido na interação entre a célula, matriz extracelular e elementos do estroma. Dentre estes, destacam-se as metaloproteases. Os níveis de expressão de duas metaloproteases (a *MMP7* e *MMP11*) foram significativamente maiores nos carcinomas, o que é compatível com outros trabalhos da literatura que demonstram invariavelmente níveis elevados destas enzimas em tumores invasivos (152-156). Poucos dados estão disponíveis sobre o papel das metaloproteases na disseminação e metástases das neoplasias do córtex da supra-renal. Dois estudos prévios sugerem que a hiperexpressão da *MMP2* é uma característica quase exclusiva dos carcinomas, sendo que a expressão imuno-histoquímica poderia até mesmo auxiliar no diagnóstico diferencial com os adenomas (126, 127). Por outro lado, apesar destes resultados tão contundentes,

estudos de *microarray* não identificaram a *MMP2* como um gene diferencialmente expresso pelos carcinomas (65, 70). Os dados apresentados nesta tese mostram que a expressão da *MMP2* avaliada por RT-PCR ou pelos próprios *arrays* de expressão, não difere entre os carcinomas e os adenomas, resultados semelhantes aos dos estudos de *microarray* reportados na literatura. Uma das possíveis explicações para estas discrepâncias leva em conta os mecanismos que regulam a expressão da *MMP2*. Esta enzima, especificamente, apresenta níveis de expressão “constitutivos” em praticamente todos os tecidos do organismo. Como a maioria nas metaloproteases, normalmente é secretada na forma de pró-enzima e sua ativação ocorre somente em situações patológicas (157). Em neoplasias agressivas pode apresentar um padrão de hiperexpressão e ativação focais não-homogêneos, com focos de hiperexpressão restritos a algumas áreas do tumor (chamadas de frentes de invasão), na interface entre as células tumorais e as células do estroma. Um estudo recente envolvendo a expressão imuno-histoquímica de *MMP2* em tumores de endométrio demonstrou este fenômeno. Através do *tissue-microarray* (TMA), a expressão da *MMP2* foi estudada em fragmentos centrais e periféricos de dois tipos histológicos diferentes de tumores endometriais. No subtipo seroso, que clinicamente é mais agressivo, foi vista uma maior expressão nos cortes periféricos dos tumores (158). Portanto, a avaliação da expressão por diferentes metodologias pode levar a resultados diversos dependendo de características intrínsecas aos mecanismos regulatórios da expressão do gene em questão. Os estudos que demonstraram a hiperexpressão da

MMP2 pelos carcinomas do córtex da supra-renal foram feitos com metodologias que permitem a localização e caracterização de eventuais focos de hiperexpressão (hibridização *in-situ* e imuno-histoquímica), enquanto os estudos de microarray e de RT-PCR são feitos a partir de RNA total extraídos de fragmentos não selecionados dos tumores. Outro componente da via das metaloproteases que apresentou expressão alterada é o *TIMP3*, um inibidor natural da ação destas enzimas com atividades antiproliferativa e antiangiogênica (138). Este gene localiza-se no cromossomo 22 e têm redução de sua expressão tem sido descrita em diversos tipos de câncer, associadas à metilação do promotor ou a LOH do locus. Dados prévios da literatura derivados de estudos de CGH sugerem perdas freqüentes no cromossomo 22 nos carcinomas do córtex da supra-renal. Os dados apresentados neste estudo mostraram que alguns tumores apresentaram níveis de expressão bastante reduzidos deste inibidor, o que favoreceria uma ação das metaloproteases. Foi demonstrada a presença de LOH em alguns tumores, mas há casos em que a perda não foi detectada, sugerindo também que fenômenos epigenéticos poderiam estar envolvidos nos mecanismos fisiopatológicos responsáveis pela baixa expressão do *TIMP3*. Portanto, dados da literatura e os aqui apresentados sugerem que diversas metaloproteases e outros componentes da via apresentam alterações da expressão em casos de carcinoma do córtex da supra-renal e que estas alterações parecem ser importantes para o processo de disseminação tumoral. A inibição das metaloproteases constitui um possível alvo terapêutico e uma atual linha de pesquisa para novos tratamentos.

Alguns elementos da matriz extracelular e moléculas de adesão podem estimular a migração das células neoplásicas e favorecer um fenótipo metastático. Foi demonstrada hiperexpressão da caderina mesenquimal CDH11. Esta molécula de adesão é hiperexpressa durante processos de migração celular no período da embriogênese e favorece a interação entre células epiteliais e mesenquimais. Foi demonstrada sua hiperexpressão em linhagens e espécimes tumorais de cânceres de mama agressivos, sarcomas e tumores de Wilms (159-161). No caso dos tumores epiteliais, sua expressão está associada com o fenômeno de transição epitélio-mesênquima, fenômeno pelo qual uma célula epitelial adquire uma característica fibroblastóide e um fenótipo de hipermotilidade, além de expressar marcadores do tecido conjuntivo como vimentina (159). Algumas proteínas da matriz extracelular, como a fibronectina, são capazes de induzir migração celular. Um estudo prévio de *microarray* identificou a fibronectina como um gene diferencialmente expresso pelos carcinomas de supra-renal (71). Os dados aqui apresentados mostram níveis de expressão de fibronectina significativamente mais altos nos carcinomas em relação aos adenomas. Nota-se também que os tumores pediátricos apresentam níveis elevados de fibronectina de maneira geral. Na supra-renal fetal, as células da zona definitiva (camada proliferativa) migram em direção ao centro de glândula, na medida em que vão se diferenciando em células esteroideogênicas da zona fetal. Esta migração centrípeta é orientada de acordo com um gradiente crescente de fibronectina, associado à expressão da integrina $\beta 3$. Esta integrina estabelece interações de baixa adesividade

com a fibronectina, favorecendo a migração celular (139). Observamos um aumento de expressão da integrina $\beta 3$ pelos tumores pediátricos metastáticos, sugerindo que esta via pode estar envolvida na disseminação neoplásica, assim como participa de processos de migração celular na glândula fetal.

Nossos dados sugerem fortemente que além de características intrínsecas da própria célula neoplásica, como a desregulação de mecanismos de controle do ciclo celular e proliferação, a disseminação das neoplasias do córtex da supra-renal conta com processos de interação anômalos entre as células tumorais e o microambiente. Até o momento, há poucos dados disponíveis em relação a alterações da composição da matriz extracelular e os dados apresentados sugerem ser este um componente fundamental. Além de alterações na composição, demonstramos que alterações nos mecanismos de remodelação e alterações nas propriedades adesivas entre as células e componentes da matriz também são peças-chave. Vale ressaltar a importância da participação de outros tipos celulares neste processo, como os fibroblastos e células inflamatórias. Os fibroblastos, além de sintetizar os componentes da matriz extracelular, também são a fonte de diversas substâncias bioativas e fatores de crescimento, além de interagir diretamente com as próprias células neoplásicas através de interações célula-célula (a hiperexpressão da CDH11 demonstrada pelos carcinomas é sugestiva desta interação). Os fibroblastos são também a principal fonte de metaloproteases, produzindo estas enzimas em resposta a estímulos induzidos pela própria célula neoplásica. Células do sistema

imunológico também parecem participar do processo, visto que a expressão da proteína SLPI, com efeitos anti-inflamatórios, esteve associada à proteção contra a disseminação neoplásica. Foi sugerida a participação do sistema imunológico na disseminação dos tumores pediátricos. Foi demonstrado que os “carcinomas” pediátricos apresentam uma expressão reduzida de componentes do sistema HLA do tipo 2, sugerindo um menor infiltração linfocitária nas neoplasias mais agressivas, o que pode ser um mecanismo de escape do sistema de vigilância imunológica do organismo (65). Nossos dados mostraram uma expressão reduzida da quimiocina CXCL12 pelos tumores metastáticos pediátricos. Outros estudos já haviam demonstrado redução na expressão desta quimiocina em tumores adultos e pediátricos (65, 70). Esta quimiocina é um fator quimiotático potente para os linfócitos T, o que suporta a suspeita de alterações nos mecanismos de vigilância imunológicos.

O presente estudo foi capaz de trazer novos conhecimentos sobre o processo de disseminação metastática das neoplasias do córtex da supra-renal. Foram identificados padrões de expressão que podem definir novas classes de tumores de forma independente do quadro histológico e novos *insights* sobre as ontologias dos principais processos responsáveis pela disseminação destas neoplasias. Além disso, o estudo confirma alguns dados que tinham sido recentemente demonstrados na literatura por outros estudos e aponta novos mecanismos e genes-candidatos, cuja expressão pode estar relacionada ao prognóstico das neoplasias da supra-renal.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

1. Foram encontradas diferenças na expressão de genes relacionados à disseminação metastática entre tumores do córtex adrenal metastáticos e não-metastáticos. Entre carcinomas e adenomas de adultos estas diferenças são bem evidentes, enquanto que em tumores pediátricos metastáticos e não-metastáticos são mais sutis.
2. Os mecanismos de disseminação metastática parecem diferir entre tumores metastáticos de adultos e pediátricos
3. Alguns dos genes diferencialmente expressos são potenciais marcadores prognósticos e alvos terapêuticos.
4. A interação entre a célula neoplásica e outros tipos celulares como fibroblastos e células do sistema imunológico, e também alterações nos componentes da matriz extracelular e propriedades adesivas das células neoplásicas parecem ser fundamentais para a disseminação das neoplasias do córtex da supra-renal.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Thompson GB, Young WF, Jr. Adrenal incidentaloma. *Curr Opin Oncol.* 2003 Jan;15(1):84-90.
2. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B. Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev.* 1995 Aug;16(4):460-84.
3. Wooten MD, King DK. Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer.* 1993 Dec 1;72(11):3145-55.
4. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer.* 2000 Feb 15;88(4):711-36.
5. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, et al. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 2001 Jul;25(7):891-7.
6. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, et al. Clinical and biological features in the prognosis of adrenocortical cancer: poor outcome of cortisol-secreting tumors in a series of 202 consecutive patients. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Jul;91(7):2650-5.
7. Pianovski MA, Maluf EM, de Carvalho DS, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, et al. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer.* 2006 Jul;47(1):56-60.
8. 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 Mar 1;22(5):838-45.
9. Sandrini R, Ribeiro RC, DeLacerda L. Childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Jul;82(7):2027-31.
10. 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 Oct;86(10):4970-3.
11. 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 Jul 31;98(16):9330-5.
12. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 May;82(5):1317-24.
13. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol.* 2003 Jan;169(1):5-11.

14. Macfarlane DA. Cancer of the adrenal cortex; the natural history, prognosis and treatment in a study of fifty-five cases. *Ann R Coll Surg Engl.* 1958 Sep;23(3):155-86.
15. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. *J Urol.* 1978 Dec;120(6):660-5.
16. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, et al. Adrenocortical carcinomas: twelve-year prospective experience. *World J Surg.* 2004 Sep;28(9):896-903.
17. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2004 Mar;60(3):273-87.
18. Bertagna C, Orth DN. Clinical and laboratory findings and results of therapy in 58 patients with adrenocortical tumors admitted to a single medical center (1951 to 1978). *Am J Med.* 1981 Nov;71(5):855-75.
19. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Mar;90(3):1819-29.
20. Beldegrun A, Hussain S, Seltzer SE, Loughlin KR, Gittes RF, Richie JP. Incidentally discovered mass of the adrenal gland. *Surg Gynecol Obstet.* 1986 Sep;163(3):203-8.
21. Young WF, Jr. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000 Mar;29(1):159-85, x.
22. Barnett CC, Jr., Varma DG, El-Naggar AK, Dackiw AP, Porter GA, Pearson AS, et al. Limitations of size as a criterion in the evaluation of adrenal tumors. *Surgery.* 2000 Dec;128(6):973-82;discussion 82-3.
23. Udelsman R, Fishman EK. Radiology of the adrenal. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 2000 Mar;29(1):27-42, viii.
24. Korobkin M, Giordano TJ, Brodeur FJ, Francis IR, Siegelman ES, Quint LE, et al. Adrenal adenomas: relationship between histologic lipid and CT and MR findings. *Radiology.* 1996 Sep;200(3):743-7.
25. Boland GW, Lee MJ, Gazelle GS, Halpern EF, McNicholas MM, Mueller PR. Characterization of adrenal masses using unenhanced CT: an analysis of the CT literature. *AJR Am J Roentgenol.* 1998 Jul;171(1):201-4.
26. Szolar DH, Kammerhuber FH. Adrenal adenomas and nonadenomas: assessment of washout at delayed contrast-enhanced CT. *Radiology.* 1998 May;207(2):369-75.
27. Sahdev A, Reznick RH. Imaging evaluation of the non-functioning indeterminate adrenal mass. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Aug;15(6):271-6.
28. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. *Am J Clin Pathol.* 1979 Sep;72(3):390-9.
29. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. *Cancer.* 1985 Feb 15;55(4):766-73.

30. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol.* 1984 Mar;8(3):163-9.
31. 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 Dec;26(12):1612-9.
32. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol.* 1989 Mar;13(3):202-6.
33. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS. Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol.* 2003 Jul;27(7):867-81.
34. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, Saldanha LB, Latronico AC, Zerbini C, et al. Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol.* 1995 Dec;154(6):2004-9.
35. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000 Jan 7;100(1):57-70.
36. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006 Nov 17;127(4):679-95.
37. Lerario AM, Mendonca BB, Lin CJ. [Molecular mechanisms involved in adrenocortical tumorigenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol.* 2005 Oct;49(5):753-68.
38. Libe R, Fratticci A, Bertherat J. Adrenocortical cancer: pathophysiology and clinical management. *Endocr Relat Cancer.* 2007 Mar;14(1):13-28.
39. Blanes A, Diaz-Cano SJ. DNA and kinetic heterogeneity during the clonal evolution of adrenocortical proliferative lesions. *Hum Pathol.* 2006 Oct;37(10):1295-303.
40. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, Louvel A, Chapuis Y, Luton JP, et al. Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf).* 1994 Apr;40(4):465-77.
41. Suzuki T, Sasano H, Nisikawa T, Rhame J, Wilkinson DS, Nagura H. Discerning malignancy in human adrenocortical neoplasms: utility of DNA flow cytometry and immunohistochemistry. *Mod Pathol.* 1992 May;5(3):224-31.
42. Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. *Curr Opin Genet Dev.* 2004 Apr;14(2):120-5.
43. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res.* 1996 Sep 15;56(18):4219-23.
44. Dohna M, Reincke M, Mincheva A, Allolio B, Solinas-Toldo S, Lichter P. Adrenocortical carcinoma is characterized by a high frequency of chromosomal gains and high-level amplifications. *Genes Chromosomes Cancer.* 2000 Jun;28(2):145-52.
45. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Philips J, Bambach CP, Campbell P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2002 Jul;87(7):3467-74.

46. Zhao J, Roth J, Bode-Lesniewska B, Pfaltz M, Heitz PU, Komminoth P. Combined comparative genomic hybridization and genomic microarray for detection of gene amplifications in pulmonary artery intimal sarcomas and adrenocortical tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2002 May;34(1):48-57.
47. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. *Br J Cancer*. 1999 Sep;81(2):300-4.
48. 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 Mar;84(3):1116-21.
49. Yano T, Linehan M, Anglard P, Lerman MI, Daniel LN, Stein CA, et al. Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. *J Natl Cancer Inst*. 1989 Apr 5;81(7):518-23.
50. Gicquel C, Le Bouc Y. Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. *Horm Res*. 1997;47(4-6):269-72.
51. Kjellman M, Roshani L, Teh BT, Kallioniemi OP, Hoog A, Gray S, et al. Genotyping of adrenocortical tumors: very frequent deletions of the MEN1 locus in 11q13 and of a 1-centimorgan region in 2p16. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Feb;84(2):730-5.
52. Caron de Fromental C, Soussi T. TP53 tumor suppressor gene: a model for investigating human mutagenesis. *Genes Chromosomes Cancer*. 1992 Jan;4(1):1-15.
53. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, et al. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol*. 2001 Aug;145(2):207-12.
54. Lin SR, Lee YJ, Tsai JH. Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Feb;78(2):483-91.
55. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer*. 1993 May 28;54(3):408-10.
56. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab*. 1994 Mar;78(3):790-4.
57. Libe R, Groussin L, Tissier F, Elie C, Rene-Corail F, Fratticci A, et al. Somatic TP53 mutations are relatively rare among adrenocortical cancers with the frequent 17p13 loss of heterozygosity. *Clin Cancer Res*. 2007 Feb 1;13(3):844-50.
58. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. *Am J Pathol*. 1997 Jan;150(1):1-13.
59. Wagner J, Portwine C, Rabin K, Leclerc JM, Narod SA, Malkin D. High frequency of germline p53 mutations in childhood adrenocortical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Nov 16;86(22):1707-10.
60. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, James LA, Margison GP, Forster G, et al. Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet*. 1999 Oct;65(4):995-1006.

61. 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 Jan;9(1):12-6.
62. Mesiano S, Jaffe RB. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. *Endocr Rev.* 1997 Jun;18(3):378-403.
63. Dai HY, Tsao N, Leung WC, Lei HY. Increase of intracellular pH in p53-dependent apoptosis of thymocytes induced by gamma radiation. *Radiat Res.* 1998 Aug;150(2):183-9.
64. Rainey WE, Carr BR, Wang ZN, Parker CR, Jr. Gene profiling of human fetal and adult adrenals. *J Endocrinol.* 2001 Nov;171(2):209-15.
65. West AN, Neale GA, Pounds S, Figueredo BC, Rodriguez Galindo C, Pianovski MA, et al. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. *Cancer Res.* 2007 Jan 15;67(2):600-8.
66. Barzon L, Pasquali C, Grigoletto C, Pedrazzoli S, Boscaro M, Fallo F. Multiple endocrine neoplasia type 1 and adrenal lesions. *J Urol.* 2001 Jul;166(1):24-7.
67. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999 Jan;84(1):216-9.
68. Martin ES, Cesari R, Pentimalli F, Yoder K, Fishel R, Himelstein AL, et al. The BCSC-1 locus at chromosome 11q23-q24 is a candidate tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Sep 30;100(20):11517-22.
69. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997 Aug;82(8):2559-65.
70. 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 Feb;162(2):521-31.
71. Slater EP, Diehl SM, Langer P, Samans B, Ramaswamy A, Zielke A, et al. Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol.* 2006 Apr;154(4):587-98.
72. Velazquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, Hoog A, Odeberg J, Kjellman M, et al. Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery.* 2005 Dec;138(6):1087-94.
73. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. *Eur J Endocrinol.* 1997 Mar;136(3):296-303.
74. Jaakkola S, Salmikangas P, Nylund S, Partanen J, Armstrong E, Pyrhonen S, et al. Amplification of fgfr4 gene in human breast and gynecological cancers. *Int J Cancer.* 1993 May 28;54(3):378-82.
75. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Sep;85(9):3476-83.

76. Molkenstin JD. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem*. 2000 Dec 15;275(50):38949-52.
77. Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, Rahman NA, Narita N, Huhtaniemi IT, et al. Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology*. 1997 Aug;138(8):3505-14.
78. Ketola I, Rahman N, Toppari J, Bielinska M, Porter-Tinge SB, Tapanainen JS, et al. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology*. 1999 Mar;140(3):1470-80.
79. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Jul;86(7):3421-9.
80. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, et al. Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. *Endocrinology*. 2002 Aug;143(8):3136-43.
81. Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, Bielinska M, Lehto VP, Huhtaniemi IT, et al. Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. *Mol Med*. 1999 Jul;5(7):490-501.
82. Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonca BB, Lin CJ. Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. *BMC Endocr Disord*. 2004 Jul 7;4(1):3.
83. Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkila P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, et al. Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. *Mol Cell Endocrinol*. 2005 Apr 15;233(1-2):47-56.
84. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Feb;90(2):615-9.
85. 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 Sep 18;1(1):8.
86. Pianovski MA, Cavalli LR, Figueiredo BC, Santos SC, Doghman M, Ribeiro RC, et al. SF-1 overexpression in childhood adrenocortical tumours. *Eur J Cancer*. 2006 May;42(8):1040-3.
87. 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 Dec;21(12):2968-87.
88. 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 Sep 15;61(18):6762-7.

89. Assie G, Antoni G, Tissier F, Caillou B, Abiven G, Gicquel C, et al. Prognostic parameters of metastatic adrenocortical carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Jan;92(1):148-54.
90. Pantel K, Brakenhoff RH. Dissecting the metastatic cascade. *Nat Rev Cancer.* 2004 Jun;4(6):448-56.
91. Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003 Jun;3(6):453-8.
92. Bartkova J, Horejsi Z, Koed K, Kramer A, Tort F, Zieger K, et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):864-70.
93. Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature.* 2005 Apr 14;434(7035):907-13.
94. Cavallaro U, Christofori G. Multitasking in tumor progression: signaling functions of cell adhesion molecules. *Ann N Y Acad Sci.* 2004 Apr;1014:58-66.
95. Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002 Sep 20;110(6):673-87.
96. Liotta LA, Kohn EC. The microenvironment of the tumour-host interface. *Nature.* 2001 May 17;411(6835):375-9.
97. Stupack DG, Cheresh DA. Get a ligand, get a life: integrins, signaling and cell survival. *J Cell Sci.* 2002 Oct 1;115(Pt 19):3729-38.
98. Johnson JP. Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. *Cancer Metastasis Rev.* 1999;18(3):345-57.
99. Hsu MY, Meier F, Herlyn M. Melanoma development and progression: a conspiracy between tumor and host. *Differentiation.* 2002 Dec;70(9-10):522-36.
100. Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion in tumor invasion and metastasis: loss of the glue is not enough. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Nov 30;1552(1):39-45.
101. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1607-20.
102. Jiang WG. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. *Br J Surg.* 1996 Apr;83(4):437-46.
103. Luo J, Lubaroff DM, Hendrix MJ. Suppression of prostate cancer invasive potential and matrix metalloproteinase activity by E-cadherin transfection. *Cancer Res.* 1999 Aug 1;59(15):3552-6.
104. Hsu MY, Meier FE, Nesbit M, Hsu JY, Van Belle P, Elder DE, et al. E-cadherin expression in melanoma cells restores keratinocyte-mediated growth control and down-regulates expression of invasion-related adhesion receptors. *Am J Pathol.* 2000 May;156(5):1515-25.
105. Li G, Herlyn M. Dynamics of intercellular communication during melanoma development. *Mol Med Today.* 2000 Apr;6(4):163-9.
106. Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer.* 2003 May;3(5):362-74.

107. Condeelis J, Segall JE. Intravital imaging of cell movement in tumours. *Nat Rev Cancer*. 2003 Dec;3(12):921-30.
108. Egeblad M, Werb Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Mar;2(3):161-74.
109. Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. *Cancer*. 1997 Oct 15;80(8 Suppl):1529-37.
110. Mehlen P, Puisieux A. Metastasis: a question of life or death. *Nat Rev Cancer*. 2006 Jun;6(6):449-58.
111. Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, et al. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature*. 2006 Jan 5;439(7072):95-9.
112. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer*. 2003 Mar;3(3):203-16.
113. Kheradmand F, Werb Z. Shedding light on sheddases: role in growth and development. *Bioessays*. 2002 Jan;24(1):8-12.
114. Blobel CP. Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. *Inflamm Res*. 2002 Feb;51(2):83-4.
115. Elenbaas B, Weinberg RA. Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):169-84.
116. Duffy MJ. Urokinase-type plasminogen activator: a potent marker of metastatic potential in human cancers. *Biochem Soc Trans*. 2002 Apr;30(2):207-10.
117. Hanahan D, Folkman J. Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*. 1996 Aug 9;86(3):353-64.
118. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer*. 2002 Aug;2(8):563-72.
119. Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*. 2004 Jun 25;117(7):927-39.
120. Nash GF, Turner LF, Scully MF, Kakkar AK. Platelets and cancer. *Lancet Oncol*. 2002 Jul;3(7):425-30.
121. Al-Mehdi AB, Tozawa K, Fisher AB, Shientag L, Lee A, Muschel RJ. Intravascular origin of metastasis from the proliferation of endothelium-attached tumor cells: a new model for metastasis. *Nat Med*. 2000 Jan;6(1):100-2.
122. Weis SM, Cheresh DA. Pathophysiological consequences of VEGF-induced vascular permeability. *Nature*. 2005 Sep 22;437(7058):497-504.
123. Luzzi KJ, MacDonald IC, Schmidt EE, Kerkvliet N, Morris VL, Chambers AF, et al. Multistep nature of metastatic inefficiency: dormancy of solitary cells after successful extravasation and limited survival of early micrometastases. *Am J Pathol*. 1998 Sep;153(3):865-73.
124. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, et al. Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res*. 2000 May 1;60(9):2541-6.

125. Fidler IJ. Seed and soil revisited: contribution of the organ microenvironment to cancer metastasis. *Surg Oncol Clin N Am.* 2001 Apr;10(2):257-69, vii-viii.
126. Kjellman M, Enberg U, Hoog A, Larsson C, Holst M, Farnebo LO, et al. Gelatinase A and membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA: expressed in adrenocortical cancers but not in adenomas. *World J Surg.* 1999 Mar;23(3):237-42.
127. Volante M, Sperone P, Bollito E, Frangipane E, Rosas R, Daffara F, et al. Matrix metalloproteinase type 2 expression in malignant adrenocortical tumors: Diagnostic and prognostic significance in a series of 50 adrenocortical carcinomas. *Mod Pathol.* 2006 Dec;19(12):1563-9.
128. de Fraipont F, El Atifi M, Gicquel C, Bertagna X, Chambaz EM, Feige JJ. Expression of the angiogenesis markers vascular endothelial growth factor-A, thrombospondin-1, and platelet-derived endothelial cell growth factor in human sporadic adrenocortical tumors: correlation with genotypic alterations. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Dec;85(12):4734-41.
129. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. *Oncogene.* 2003 Sep 29;22(42):6524-36.
130. Tissier F, Cavard C, Groussin L, Perlemoine K, Fumey G, Hagnere AM, 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.* 2005 Sep 1;65(17):7622-7.
131. Van Gelder RN, von Zastrow ME, Yool A, Dement WC, Barchas JD, Eberwine JH. Amplified RNA synthesized from limited quantities of heterogeneous cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Mar;87(5):1663-7.
132. Velculescu VE, Madden SL, Zhang L, Lash AE, Yu J, Rago C, et al. Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet.* 1999 Dec;23(4):387-8.
133. Lu T, Costello CM, Croucher PJ, Hasler R, Deuschl G, Schreiber S. Can Zipf's law be adapted to normalize microarrays? *BMC Bioinformatics.* 2005;6:37.
134. Furusawa C, Kaneko K. Zipf's law in gene expression. *Phys Rev Lett.* 2003 Feb 28;90(8):088102.
135. Benjamini YH, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society series B.* 2005;57(1):289-300.
136. 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 Dec;25(4):402-8.
137. Uria JA, Ferrando AA, Velasco G, Freije JM, Lopez-Otin C. Structure and expression in breast tumors of human TIMP-3, a new member of the metalloproteinase inhibitor family. *Cancer Res.* 1994 Apr 15;54(8):2091-4.
138. Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta.* 2000 Mar 7;1477(1-2):267-83.
139. Chamoux E, Bolduc L, Lehoux JG, Gallo-Payet N. Identification of extracellular matrix components and their integrin receptors in the human fetal adrenal gland. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001 May;86(5):2090-8.

140. Armstrong PB, Armstrong MT. Intercellular invasion and the organizational stability of tissues: a role for fibronectin. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Mar 27;1470(2):O9-20.
141. Giordano TJ, Shedden KA, Schwartz DR, Kuick R, Taylor JM, Lee N, et al. Organ-specific molecular classification of primary lung, colon, and ovarian adenocarcinomas using gene expression profiles. *Am J Pathol*. 2001 Oct;159(4):1231-8.
142. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
143. Lakhani SR, Ashworth A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? *Nat Rev Cancer*. 2001 Nov;1(2):151-7.
144. Ricci MS, el-Deiry WS. Novel strategies for therapeutic design in molecular oncology using gene expression profiles. *Curr Opin Mol Ther*. 2000 Dec;2(6):682-90.
145. van 't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
146. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
147. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003 Jan;33(1):49-54.
148. Dvorak HF. Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N Engl J Med*. 1986 Dec 25;315(26):1650-9.
149. Chang HY, Sneddon JB, Alizadeh AA, Sood R, West RB, Montgomery K, et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. *PLoS Biol*. 2004 Feb;2(2):E7.
150. Wang N, Thuraisingam T, Fallavollita L, Ding A, Radzioch D, Brodt P. The secretory leukocyte protease inhibitor is a type 1 insulin-like growth factor receptor-regulated protein that protects against liver metastasis by attenuating the host proinflammatory response. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):3062-70.
151. Chacon R, Tossen G, Loria FS, Chacon M. CASE 2. Response in a patient with metastatic adrenal cortical carcinoma with thalidomide. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 1;23(7):1579-80.
152. Gershtein ES, Korotkova EA, Shcherbakov AM, Prorokov VV, Golovkov DA, Kushlinskii NE. Matrix metalloproteinases 7 and 9 and their types 1 and 4 tissue inhibitors in tumors and plasma of patients with colorectal cancer. *Bull Exp Biol Med*. 2007 Apr;143(4):459-62.
153. Tonini G, Pantano F, Vincenzi B, Gabbrielli A, Coppola R, Santini D. Molecular prognostic factors in patients with pancreatic cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2007 Dec;11(12):1553-69.

154. Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007 Dec;58(3):384-91.
155. Stojic J, Hagemann C, Haas S, Herbold C, Kuhnel S, Gerngas S, et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-1, MMP-11 and MMP-19 is correlated with the WHO-grading of human malignant gliomas. *Neurosci Res*. 2008 Jan;60(1):40-9.
156. Vazquez-Ortiz G, Pina-Sanchez P, Vazquez K, Duenas A, Taja L, Mendoza P, et al. Overexpression of cathepsin F, matrix metalloproteinases 11 and 12 in cervical cancer. *BMC Cancer*. 2005;5(1):68.
157. Matrisian LM. Matrix metalloproteinase gene expression. *Ann N Y Acad Sci*. 1994 Sep 6;732:42-50.
158. Monaghan H, MacWhinnie N, Williams AR. The role of matrix metalloproteinases-2, -7 and -9 and beta-catenin in high grade endometrial carcinoma. *Histopathology*. 2007 Feb;50(3):348-57.
159. Pishvaian MJ, Feltes CM, Thompson P, Bussemakers MJ, Schalken JA, Byers SW. Cadherin-11 is expressed in invasive breast cancer cell lines. *Cancer Res*. 1999 Feb 15;59(4):947-52.
160. Markus MA, Reichmuth C, Atkinson MJ, Reich U, Hoffmann I, Balling R, et al. Cadherin-11 is highly expressed in rhabdomyosarcomas and during differentiation of myoblasts in vitro. *J Pathol*. 1999 Jan;187(2):164-72.
161. Schulz S, Becker KF, Braungart E, Reichmuth C, Klamt B, Becker I, et al. Molecular analysis of E-cadherin and cadherin-11 in Wilms' tumours. *J Pathol*. 2000 Jun;191(2):162-9.