

MIRIAN NAKAMURA GOUVEA

**Análise comparativa dos transcritomas
do córtex adrenal normal e
adenocarcinoma do córtex adrenal**

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

Área de concentração: Patologia
Orientador: Prof. Dr. Chin Jia Lin

São Paulo

2007

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

Ao Flávio, à Natália e à Luiza

A meus pais

Esta dissertação ou 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, iniciando uma nova linha no Departamento de Patologia, me confiou este projeto. Nossas discussões me ensinaram a abordar todo e qualquer tema de forma mais ampla e completa, o que espero conseguir aplicar daqui em diante. Seu rigor pela precisão dos conceitos chamou-me a atenção para como podemos ser negligentes neste aspecto. Obrigada pela paciência com minhas limitações.

Ao Dr. Antonio Marcondes Lerario, pelas idéias que nortearam e enriqueceram este trabalho. Ao colega Antonio, que me guiou pelos meandros da informática, na obtenção e análise dos dados. E ao amigo Antonio, pela participação nos experimentos e pela companhia até altas horas e finais de semana no laboratório.

À Dra. Angela Silva Barbosa, queridíssima Angela, que me abriu as portas para este Doutorado e me acompanhou desde a primeira PCR à última leitura do manuscrito. Obrigada por tantas horas dedicadas a me ajudar, pelas sugestões, pelo ombro consolador, pelo otimismo constante e, acima de tudo, pela amizade de tantos anos.

À Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça, por permitir a execução deste trabalho no LIM 42, pelo apoio ao projeto e pelo interesse permanente no andamento desta tese.

À Dra. Emília Modolo Pinto e à Dra. Ana Elisa Correia Billerbeck, pelos seqüenciamentos, pelas discussões frutíferas que tanto contribuíram para a solução das minhas dúvidas e, acima de tudo, pelo contínuo apoio. Emília, obrigada pelos estímulos e sugestões nos momentos de dificuldade e pela energia positiva. Ana, obrigada pelo incentivo.

À Dra. Regina Matsunaga Martin, que sempre encontra mais tempo do que dispõe para ajudar os colegas, incluindo a mim. Obrigada pelo estímulo, pela amizade e pelos esclarecimentos nos assuntos médicos. Seu esmero para

com os pacientes é um exemplo e um lembrete para que eu não caia na rotina e procure fazer sempre o melhor.

À Helena e Mirian, pela amizade, companhia e auxílio ao longo desses anos.

A Maria Aparecida, Francisca, Nilda e Ana Lúcia, pela presteza em prover muito do que foi necessário neste trabalho.

Aos demais amigos que fiz no LIM 42, entre médicos e funcionários, pelas discussões e pelo convívio diário, especialmente às que tornaram as jornadas noturnas dos experimentos mais suaves.

Às funcionárias da secretaria do Departamento de Patologia da FMUSP, por tornar a nossa vida de estudante tão mais fácil. Liduvina, obrigada pela assessoria contínua e pela paciência com minha ansiedade.

Do Instituto Butantan, ao qual pertenço, agradeço:

A Denise e Viviane, que me incentivaram desde o início e que tantas vezes seguraram minha barra no Laboratório de Hepatite, principalmente nesta etapa final. A Carla, pelo carinho e apoio.

A Cosue Miyaki, Elizabeth Tenório e Dra. Hisako G. Higashi, por permitirem que eu realizasse esse Doutorado, num tema tão distante do meu cotidiano no Laboratório de Hepatite.

Aos funcionários da Hepatite, os que ainda estão na Seção e os que já seguiram outros rumos, cujo trabalho me deixou mais tempo para dedicar-me a esta tese. Um carinho especial a Silvana, Léia, Isabel, Edna, Marcelo, Emerson e Rafael.

De maneira especial, ao Prof. Dr. Isaias Raw, a quem devo minha carreira de pesquisadora. Agradeço por me aceitar como estagiária no Centro de Biotecnologia e por assumir a orientação do meu Mestrado, quando já o dava por perdido. A saúde deste país muito deve ao seu caráter obstinado e empreendedor. É um privilégio ter uma pequena participação nessa missão e ter sido sua aluna.

E, acima de tudo, agradeço a minha família, à qual espero poder retribuir tudo o que recebi na vida:

Ao Flávio, meu marido, pelo apoio incondicional, sem o qual nem teria iniciado esta empreitada. Obrigada por permanecer sempre na retaguarda, no cuidado do lar em minhas ausências. Obrigada por ficar sempre ao meu lado, nos bons e maus momentos. Obrigada pela compreensão nos dias de desânimo e impaciência.

À Natalia, que tantas vezes sentou-se ao meu lado para conferir a tabulação dos transcritos, além de auxiliar nas referências. À Luiza, que teve que aprender a aceitar minha ausência, obrigada pelos “abraços de energia” nos momentos certos. Queridas filhas, obrigada por todo amor e carinho.

Aos meus pais Hiroshi e Dirce, aos quais devo a minha formação, no sentido mais amplo, que torceram por mim do primeiro ao último dia e tanto ajudaram nas questões domésticas, para que eu pudesse me dedicar a este trabalho. E à minha sogra Hilda, que muito me ajudou com as meninas.

Aos professores que despertaram meu interesse pela Biologia e, mais tarde, pela Biologia Molecular. E a todos aqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

À FAPESP, pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	
LISTA DE TABELAS	
RESUMO	
ABSTRACT	
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Carcinoma do córtex da supra-renal.....	1
1.2 Achados patológicos.....	3
1.3 Evolução e prognóstico.....	5
1.4 Tumorigênese e marcadores de carcinoma do córtex da supra-renal....	7
1.5 Ploidia, instabilidade cromossômica e tumorigênese do córtex adrenal...	8
1.6 Patobiologia tumoral, genotipagem de marcador único e tumores do córtex adrenal.....	14
1.7 Análise comparativa de transcritomas.....	22
2 OBJETIVOS.....	31
3 MÉTODOS.....	32
3.1 Linhagem celular, espécime tumoral e controle de adrenal normal humanos.....	32
3.1.1 Células da linhagem NCI-H295A.....	32
3.1.2 Espécimes tumorais.....	33
3.1.3 RNA controle de supra-renal humana.....	35
3.2 Obtenção do RNA das amostras.....	36
3.2.1 Extração de RNA total a partir das células NCI-H295A.....	37
3.2.2 Extração de RNA total de supra-renais normais.....	38
3.2.3 Extração de RNA dos espécimes tumorais.....	38
3.2.4 Tratamento do RNA com DNase I.....	39
3.3 Differential Display - DDRT-PCR.....	43
3.4 Expressão dos genes BCSC-1 e FUT11 em tumores adrenocorticais...	49

4	RESULTADOS.....	51
4.1	Obtenção de transcritos diferencialmente expressos nas amostras tumorais por “Differential Display” (DDRT-PCR).....	51
4.1.1	Perfil transcricional comparativo.....	51
4.1.2	Identificação e classificação dos transcritos.....	53
4.2	Distribuição dos transcritos nos cromossomos.....	55
4.3	Significado funcional dos genes diferencialmente expressos.....	70
4.4	Genes com participação potencial na tumorigênese da adrenal.....	73
4.5	Expressão dos genes BCSC-1 e FUT11 em tumores adrenocorticais...	74
5	DISCUSSÃO.....	77
6	CONCLUSÕES.....	97
7	REFERÊNCIAS.....	98

**LISTAS DE
FIGURAS E TABELAS**

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Experimento representativo da análise de contaminação das amostras de RNA por DNA genômico.....	42
Figura 2 - Representação esquemática do “Differential Display” (DDRT-PCR).....	44
Figura 3 - Autorradiograma típico de um experimento de DDRT-PCR.....	52
Figura 4 - Produtos de re-amplificação de bandas selecionadas do gel de DDRT-PCR.....	54
Figura 5 - Resultados típicos de consulta de seqüências obtidas a banco público de seqüências depositadas.....	54
Figura 6 - Distribuição dos transcritos nos cromossomos.....	68
Figura 7 - Distribuição dos transcritos nos cromossomos.....	69
Figura 8 - Grupos funcionais - genes hiper-expressos.....	71
Figura 9 - Grupos funcionais - genes hipo-expressos.....	72
Figura 10 - Expressão dos genes BCSC-1 e FUT11 em tumores adrenocorticais.....	76
Figura 11 - Esquema representativo da via Wnt/ β -catenina.....	84
Figura 12 - Esquema representativo da via do mevalonato.....	86
Figura 13 - Esquema da via de ubiquitina-proteassoma de proteólise.....	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação das aberrações genéticas mais comuns em diferentes populações de carcinomas do córtex da supra-renal	12
Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes com tumores adrenocorticais.....	34
Tabela 3 - “Primers” utilizados em PCRs.....	41
Tabela 4 - “Primers” de ancoragem (3´) e arbitrários (5´) utilizados no DDRT-PCR, para obtenção dos perfis de transcrição das amostras tumorais (células NCI-H295A e tumor da paciente) e do controle de adrenal normal.....	41
Tabela 5 - Transcritos obtidos nos experimentos de DDRT-PCR: células NCI- H295A ou tumor da paciente comparados com o controle de adrenal normal.....	56
Tabela 6 - Genes nas células NCI-H295A.....	57
Tabela 7 - Genes hiper-expressos no espécime tumoral.....	58
Tabela 8 - Genes hipo-expressos nas células NCI-H295A.....	59
Tabela 9 - Genes hipo-expressos no espécime tumoral.....	60
Tabela 10 - Genes hiper-expressos nas células NCI-H295A.....	61
Tabela 11 - Genes hiper-expressos no espécime tumoral.....	62
Tabela 12 - Genes hipo-expressos nas células NCI-H295A.....	63
Tabela 13 - Genes hipo-expressos no espécime tumoral.....	64
Tabela 14 - Transcritos intrônicos diferencialmente regulados (células NCI-H295A).....	65
Tabela 15 - Transcritos intrônicos diferencialmente regulados no espécime tumoral.....	66

RESUMO/ABSTRACT

RESUMO

Gouvea MN. *Análise comparativa dos transcritomas do córtex adrenal normal e adenocarcinoma do córtex adrenal* [tese] São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2007. 115 p.

A carcinogênese do córtex da supra-renal é um processo complexo que envolve alterações genéticas múltiplas e seqüenciais. Embora algumas dessas alterações já tenham sido caracterizadas, de modo geral estes mecanismos permanecem pouco compreendidos. Um conhecimento mais aprofundado dos mesmos não só levaria à descoberta de novos marcadores de prognóstico como também a alvos terapêuticos em potencial. A fim de melhor caracterizarmos os mecanismos envolvidos na progressão maligna do tumor e selecionarmos genes candidatos a serem marcadores de malignidade e alvos terapêuticos, nós estudamos os RNAs de uma linhagem celular derivada de um tumor adrenocortical maligno (NCI-H295A) e um espécime de tumor do córtex da supra-renal por “Differential Display” (DDRT-PCR).

Foi selecionado um total de 317 transcritos únicos diferencialmente expressos, com base na análise densitométrica digital dos géis de DDRT-PCR. A anotação funcional dos genes hiper-expressos mostrou relação com motilidade celular e proliferação. Entre os hipo-expressos foram identificados genes envolvidos na regulação de transcrição, síntese e processamento de RNA e remodelamento da cromatina. A expressão de dois genes entre os transcritos selecionados foi verificada por RT-PCR semi-quantitativa em 19 tumores adrenocorticais adultos e pediátricos, metastáticos e não metastáticos. Os genes da fucosiltransferase-11 e do supressor tumoral BCSC-1 (hiper- e hipo-regulado, respectivamente) encontraram-se diferencialmente expressos nos subgrupos específicos das 19 amostras tumorais.

Em suma, o DDRT-PCR revelou-se uma ferramenta valiosa para uma análise global dos transcritomas do córtex da supra-renal e para selecionar genes com possível envolvimento na tumorigênese adrenocortical. Novos aspectos da biologia, progressão e possíveis alvos terapêuticos moleculares puderam ser vislumbrados.

ABSTRACT

Gouvea MN. *Comparative analysis of normal adrenal cortice and adrenocortical carcinoma transcriptomes* [thesis]. Faculty of Medicine, University of São Paulo, SP (Brazil); 2007. 115 p.

The adrenocortical carcinogenesis is a complex process that involves multiple and sequential genetic alterations. Although some of these changes have been characterized, in general these mechanisms remain poorly understood. A better knowledge of such mechanisms would not only lead to the discovery of new prognostic markers but also to potential therapeutic targets. In order to better characterize the mechanisms involved in tumor progression toward a malignant phenotype and select genes that are candidate markers for malignancy and therapeutic targets, we studied the RNAs from a malignant tumor-derived adrenocortical cell line (NCI-H295A cells) and a metastatic adrenocortical tumor specimen by DD-PCR.

Differentially expressed transcripts were selected based on densitometric digital analysis of the DD-gel. A total of 317 unique transcripts were found to be differentially expressed. The functional annotations of the up-regulated genes were found to be related to cell motility and proliferation. Among the down-regulated genes, those involved in regulation of transcription, RNA synthesis and processing and chromatin remodeling were identified. The expression levels of two of the selected transcripts were assessed in 19 pediatric and adult metastatic and non-metastatic adrenocortical tumors by semi-quantitative RT-PCR. The fucosyltransferase-11 and the BCSC-1 tumor suppressor genes (up and down regulated, respectively) were found to be differentially expressed in specific subsets of the 19 adrenocortical samples.

In conclusion, the DD-PCR is a valuable tool for a global analysis of the adrenocortical transcriptomes and for selecting candidate genes involved in adrenocortical tumorigenesis. Novel aspects of biology, progression and possible molecular therapeutic targets were pointed out.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma do córtex da supra-renal

As massas adrenais são relativamente comuns. Sua prevalência, estimada a partir de estudos de autópsias, varia de 1,4% a 2,9%. Em indivíduos de meia-idade a prevalência de massa adrenal incidental é de 3% e chega até 10% em idosos^[1]. Estas massas, na sua maioria, se originam das células do córtex ou da medula da supra-renal^[2] mas podem ter outras origens teciduais^[3].

A grande maioria dos tumores do córtex adrenal é benigna. Em contraste, a neoplasia maligna do córtex de supra-renal é bem mais rara. A incidência estimada deste carcinoma é de 0,5 a 2×10^6 pacientes por ano^[4], [5], [6], [7], [8], respondendo por 0,02% a 0,2% de todas as mortes relacionadas por câncer^[3]. A distribuição etária do carcinoma de córtex adrenal segue um padrão bimodal e os picos de incidência ocorrem na primeira e na quinta décadas de vida^{[9], [10]}.

Em relação às características clínicas e à capacidade de síntese hormonal, o carcinoma adrenocortical pode ser funcionante ou não funcionante. A proporção de cada uma dessas categorias varia de acordo com o critério adotado (presença de manifestações clínicas de hipersecreção hormonal ou documentação laboratorial de hiperprodução). Quando esses dois critérios são combinados, 62% dos carcinomas do córtex

adrenal são funcionantes e 38% são não funcionantes^[11]. Há uma diferença entre os pacientes adultos e pediátricos quanto ao tipo mais prevalente de produção hormonal excessiva. Nas crianças a virilização é a síndrome hormonal mais comum (72%)^[12], contrastando com a freqüência de síndrome virilizante pura de apenas 3 a 5% no grupo de pacientes adultos^[13].^[14] Quando as casuísticas de adultos e crianças portadores de carcinoma de córtex supra-renal são analisadas conjuntamente, a síndrome de hiperprodução hormonal mais comum (39,5%) é a do excesso de cortisol (síndrome de Cushing), seguida da combinação de síndrome de Cushing e virilização (24%)^[11]. A virilização pura ocorre em 20% dos pacientes^[11]. Feminização ocorre raramente (6%), assim como a hiperprodução de aldosterona (2,5%)^[11]. Dessa maneira, as manifestações clínicas mais comuns do carcinoma de córtex da supra-renal são aquelas relacionadas ao hipercortisolismo: ganho de peso ou obesidade centrípeta, perda da massa muscular, hipertensão. Oligomenorréia, hirsutismo, acne, aumento da massa muscular, engrossamento de voz, calvície temporal, aumento da libido e clitoromegalia podem ocorrer como manifestações da virilização em mulheres adultas. Em meninas a virilização pode se manifestar como puberdade precoce heterossexual. Um fato a ser lembrado é a possibilidade de um tumor do córtex adrenal não ter manifestações patentes de hipersecreção hormonal por produzir em excesso um esteróide concordante com o sexo do paciente.

1.2 Achados patológicos

Ao exame macroscópico, os carcinomas do córtex da supra-renal são tumores encapsulados, lobulados e volumosos^[15]. A superfície de corte possui coloração rosada variegada, marrom ou amarela^[15]. São freqüentes os achados como necrose, hemorragia e alterações císticas^[15]. Na microscopia, este tipo de tumor consiste de células empobrecidas de lípidos com citoplasma granular, bem como núcleos e nucléolos grandes e múltiplos.

A utilização de critérios morfológicos na distinção entre o carcinoma e o adenoma do córtex da supra-renal não é trivial. Um tumor de córtex adrenal é inequivocamente maligno se apresentar invasão local/regional ou se apresentar metástase^[16]. Para as lesões puramente localizadas vários critérios morfológicos são utilizados na definição da malignidade. Peso tumoral maior do que 500 g, superfície de corte grosseiramente lobulada, áreas de necrose e áreas de calcificações ou hemorragias são critérios que indicam possível lesão maligna^[5].

Os critérios microscópicos mais utilizados para o diagnóstico de carcinoma de córtex adrenal são aqueles propostos por Weiss^[17] e incluem: grau nuclear III ou IV, índice mitótico maior do que 5 em 50 campos de grande aumento, mitoses atípicas, células claras ocupando 25% ou menos do tumor, arquitetura difusa, necrose, invasão de estruturas venosas, invasão de sinusóide e invasão de cápsula tumoral^[17]. No trabalho inicial de Weiss, nenhum dos 24 tumores que apresentavam 2 ou menos desses

critérios desenvolveu metástase ou recorrência. Em contrapartida, 18 dos 19 tumores que apresentavam 4 ou mais critérios recorreram ou desenvolveram metástases^[17]. Em um estudo posterior, este mesmo autor e seus colaboradores passaram a considerar a presença de 3 ou mais critérios histológicos como diagnóstico de carcinoma de córtex adrenal^[18]. O índice mitótico foi o critério que apresentou a mais forte correlação (negativa) com a sobrevida. Os pacientes cujos tumores apresentavam mais que 20 figuras de mitose em 50 campos de grande aumento tiveram a sobrevida média de 14 meses ao passo que os pacientes com tumores contendo até 20 figuras de mitose tiveram sobrevida média de 58 meses^[18]. Além do índice mitótico, a presença de mitose atípica, invasão capsular, peso tumoral maior do que 250 g e diâmetro maior do que 10 cm também se correlacionaram negativamente com o prognóstico^[18]. Nenhum critério morfológico, incluindo o índice mitótico, apresentou alguma associação com intervalo livre de doenças^[18]. Em um estudo que envolveu 49 pacientes adultos (24 portadores de carcinoma e 25 portadores de adenoma de córtex adrenal) a presença de 3 ou mais critérios histopatológicos de Weiss foi capaz de estabelecer o diagnóstico com especificidade de 96% e sensibilidade de 100%^[19]. Os autores deste estudo também verificaram que a especificidade e a sensibilidade de peso tumoral (≥ 50 g), diâmetro tumoral ($\geq 6,5$ cm) e índice mitótico foram respectivamente de 90,9% e 100%, 91,7% e 100% e 100% e 96%^[19].

Apesar de ser amplamente utilizado no diagnóstico de carcinoma de córtex adrenal, o sistema de Weiss apresenta algumas restrições. São

necessários patologistas experientes para examinar as amostras de tecido e identificar os critérios presentes - condição nem sempre preenchida para carcinoma de córtex adrenal em se tratando de uma doença extremamente rara^[19]. Em segundo lugar, alguns critérios (invasão sinusoidal e venosa, grau nuclear e arquitetura difusa) são difíceis de se avaliar, apresentando baixa confiabilidade e pouca concordância entre observadores^[19]. Terceiro, os critérios de Weiss são inadequados para identificar carcinoma de córtex adrenal e prever o prognóstico entre os pacientes pediátricos^[12]. Finalmente, dada a raridade do carcinoma adrenocortical, o emprego dos critérios de Weiss não será capaz de eliminar a incerteza diagnóstica em uma boa parcela dos tumores avaliados. Utilizando-se, por exemplo, a sensibilidade (100%) e a especificidade (96%) apresentadas por Aubert et al.^[19] e assumindo que o carcinoma de córtex esteja presente em 5% dos tumores incidentais de adrenal^[20], a presença de três ou mais critérios de Weiss positivos terá um valor preditivo positivo de 56,82%. Mesmo adotando uma prevalência bem mais alta (19,18%), observada nos tumores do subgrupo de pacientes que foram tratados cirurgicamente no estudo de Mantero et al.^[2], ainda teríamos um taxa significativa de falso positivos - neste caso o valor preditivo positivo dos critérios de Weiss seria de 85,45%.

1.3 Evolução e Prognóstico

O prognóstico de adultos portadores de carcinoma de córtex da supra-renal é geralmente sombrio. Os pacientes pediátricos apresentam um

prognóstico melhor^[12]. Os pacientes sobrevivem em média 18 meses^[11] e a sobrevida global de 5 anos dos pacientes portadores de carcinoma de córtex adrenal é de 15% a 47%^[11]. Em um estudo retrospectivo (pacientes de 17 a 79 anos de idade), não se observou influência da idade ou sexo do paciente, tamanho, funcionalidade ou lateralidade do tumor na sobrevida^[21]. A extensão da doença, no entanto, parece ser um fator importante. O sistema atualmente utilizado para classificar a extensão do tumor do córtex adrenal foi proposto por Macfarlane^[22]. Neste sistema, os tumores adrenocorticais que não apresentam infiltração de tecido vizinho ou invasão linfonodal são classificados como estágio I (diâmetro tumoral ≤ 5 cm) ou estágio II (diâmetro > 5 cm). Os tumores avançados são aqueles que apresentam infiltração local ou invasão de linfonodos (estágio III) ou invasão de órgãos adjacentes, de linfonodos ou disseminação metastática (estágio IV)^{[22], [23]}. Na apresentação, 20% e 39% dos paciente se encontram nos estágios III e IV, respectivamente^[11]. Portanto, a maioria dos pacientes já chega aos cuidados médicos com doença avançada. Os pacientes com melhor sobrevida são aqueles que apresentam doença significativamente menos extensa, ao contrário dos que morrem precocemente^[21]. De fato, a sobrevida aproximada dos pacientes de cada estágio é de: 30% a 45% (estágio I), 12,5% a 57% (estágio II), 5% a 18% (estágio III) e 0% (estágio IV)^[11].

Os principais locais de disseminação metastática do carcinoma de supra-renal são fígado (48%), pulmão (45%), linfonodo (29%) e osso (13%)^[11]. Há também relatos de metástase em pâncreas, sistema nervoso central, diafragma, intestino delgado e tireóide^[11]. Os locais mais comumente

envolvidos por infiltração local de carcinoma adrencortical são os rins (26%) e veia cava inferior (9% a 19%)^[11]. A ressecção cirúrgica do tumor é o único tratamento que prolonga significativamente a sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma de córtex da supra-renal. A sobrevida média de pacientes com tumor irresseccável é de 3 a 9 meses ao passo que a sobrevida média após a ressecção completa é de 13 a 28 meses^[11]. Em casos de recorrência tumoral a ressecção cirúrgica parece também ser benéfica^[21]. Quando a cirurgia não é bem sucedida ou suficiente, mitotane (o,p`-DDD) - um agente adrenolítico - apresenta um resultado apenas modesto^[21]. A quimioterapia citotóxica tem sido testada em grupos pequenos de pacientes^[24] e não traz benefício no tratamento do carcinoma do córtex de supra-renal. Os regimes com resultados mais promissores são a combinação de etoposide, doxorubicina cisplatina e mitotane ou a combinação de estreptozotocina com mitotane^{[25], [26]}. Está em andamento, atualmente, o primeiro estudo clínico fase III que compara estes dois regimes^[27].

1.4 Tumorigênese e marcadores de carcinoma do córtex da supra-renal

Embora seja amplamente adotado no diagnóstico de carcinoma de córtex adrenal, o sistema de pontuação de Weiss apresenta algumas importantes limitações, já apresentadas anteriormente (item “1.2 Achados patológicos”). Além disso, alguns dos critérios de Weiss (ex. porcentagem de células claras e invasão capsular) impõem a necessidade de se representar

de maneira abrangente regiões diferentes do tumor e impossibilita a realização do diagnóstico do carcinoma de córtex adrenal com análise de poucos fragmentos pequenos de tecidos tumorais. Por causa destas restrições tem havido uma busca por marcadores de mais fácil detecção e que permitam identificar com segurança o tecido tumoral maligno do córtex da supra-renal.

É possível reunir os marcadores celulares e moleculares de malignidade do córtex da supra-renal em algumas grandes categorias. Os genes que ocupam posições chaves na regulação do crescimento e da proliferação celulares são utilizados como marcadores de malignidade de vários tecidos, por causa da sua importância tanto na gênese como no estabelecimento do comportamento biológico de neoplasias, não sendo diferentes para a neoplasia do córtex da supra-renal. Da mesma maneira, moléculas que participam da transdução de estímulos proliferativos das células do córtex da supra-renal e genes envolvidos nas síndromes familiares de hiperplasia e neoplasias endócrinas deste tecido também têm sido testados como marcadores. Finalmente, alterações citogenéticas e das características funcionais das células do córtex adrenal também têm sido propostas como possíveis marcadores de comportamento maligno.

1.5 Ploidia, instabilidade cromossômica e tumorigênese do córtex adrenal

A economia normal das células de um organismo é mantida graças ao controle rígido de crescimento, proliferação e eliminação das células dos

diferentes tecidos. Em decorrência de necessidades específicas (ex. estágios específicos do desenvolvimento orgânico) ou em resposta a estímulos fisiológicos e/ou patológicos (reações de adaptação ou de reparo) as células do organismo alteram a velocidade de crescimento e proliferação ou têm modificada sua taxa de remoção. O resultado das alterações destes parâmetros é o ajuste da população celular em função das necessidades do momento. A multiplicação das células de um tecido, a despeito das restrições impostas por mecanismos de controle, ou o acúmulo das células como resultado do escape dos mecanismos da sua eliminação são os eventos básicos que levam à formação de neoplasias^[28].

As doenças neoplásicas, mesmo as esporádicas, podem ser consideradas doenças genéticas pois, em última análise, danos genéticos (mutações) não letais são a base dos mecanismos de violação do controle do crescimento e da proliferação das células tumorais bem como da resistência das células neoplásicas ao processo de eliminação celular. Visto que nenhuma mutação sozinha é capaz de conferir todas as alterações fenotípicas apresentadas pelas células neoplásicas malignas pode-se inferir que essas células apresentarão cada vez mais características que compõem o comportamento biológico maligno à medida que mutações em genes críticos sejam acumuladas, num processo conhecido como “carcinogênese de múltiplas etapas” (“multi-step cacinogenesis”)^[29]. Em consonância com esta inferência, análises de clonalidade das lesões do córtex da supra-renal mostram que as hiperplasias são de natureza policlonal. Em comparação, os adenomas de córtex adrenal podem ser policlonais ou monoclonais ao passo

que os carcinomas são monoclonais^{[30], [31]}. Os adenomas monoclonais são maiores e apresentam maior prevalência de pleomorfismo nuclear do que os adenomas policlonais^[30]. Estes achados sustentam a noção de que, no córtex da supra-renal, o acúmulo de mutações confere vantagem adaptativa e maior potencial de crescimento à célula tumoral.

Um suporte adicional ao modelo de carcinogênese em várias etapas do córtex adrenal vem de estudos citogenéticos. A hibridação genômica comparativa (“Comparative Genomic Hybridization” - CGH) é um método de análise citogenética capaz analisar o genoma inteiro em busca de alterações como ganhos e perdas cromossômicos. Consiste na co-hibridação de DNA genômico tumoral e DNA referência a sondas (cromossomos metafásicos intactos ou fragmentos cromossômicos menores propagados em “bacterial artificial chromosome” - BAC) imobilizadas em uma superfície. Os DNAs referência e do tumor competem pelas sondas durante a hibridação e, como são previamente marcados com fluorocromos diferentes, o sinal resultante capturado em cada segmento da sonda indicará se a região do cromossomo correspondente manteve-se intacta ou se sofreu ganho ou perda durante a tumorigênese. Em todos os estudos envolvendo CGH e tumores de córtex adrenal foram utilizados cromossomos metafásicos como sondas. Por meio desta técnica, constatou-se que, em adultos, o número de alterações cromossômicas dos adenomas é menor do que as alterações cromossômicas apresentadas pelos carcinomas de córtex supra-renal^{[32], [33], [34], [35]} e que o número de alterações cromossômicas se correlaciona com o tamanho do tumor^{[32], [33], [34], [35]}. Um desses trabalhos também analisou o

conteúdo de DNA das células tumorais e demonstrou que os adenomas apresentam padrão diplóide ao passo que os carcinomas são aneuplóides^[32]. Já os tumores de córtex adrenal pediátricos diferem dos tumores de adultos em relação às alterações cromossômicas. O único estudo que examinou os tumores do córtex da supra-renal de crianças^[36], em uma casuística pequena (6 carcinomas e 3 adenomas), não demonstrou diferença no número de aberrações cromossômicas entre adenomas e carcinomas. Não há também variação da quantidade de aberrações cromossômicas quanto à idade ou sexo dos pacientes nem em relação ao tamanho ou estágio tumoral^[36].

Embora seja patente a diferença na ocorrência de alterações cromossômicas entre os adenomas e os carcinomas do córtex adrenal, nenhuma dessas alterações detectadas pelo CGH é exclusiva de carcinomas, nem está amplamente distribuída entre estas lesões, para que a mesma possa ser usada na previsão de comportamento biológico dos tumores adrenocorticais. Isso decorre provavelmente tanto da limitação da resolução do método analítico utilizado ($\geq 10\text{Mb}$), como do pequeno número de pacientes avaliados (em virtude da raridade deste tipo de neoplasia), da heterogeneidade das características clínicas e da composição étnica das casuísticas estudadas. Apesar disso, foi possível identificar as regiões que mais freqüentemente apresentam aberrações em tumores do córtex da supra-renal (Tabela 1). O ganho de cromossomos 5p^{[34], [32], [35]}, 5q^{[32], [34], [35]} e 12q^{[34], [33], [35]} e perda de cromossomos 1p^{[35], [33]}, 11q^{[32], [33], [35]} e 17p^{[35], [32]}

Tabela 1 - Comparação das aberrações genéticas mais comuns em diferentes populações de carcinomas do córtex da supra-renal detectadas por CGH

<i>Locus</i> da alteração genética	Sidhu ^[35] (n = 13)	Kjellman ^[32] (n=8)	Zhao ^[33] (n=12)	Dohna ^[34] (n=14)
1p-	8 (62%)	1 (13%)	8 (67%)	2 (13%)
2q-	4 (31%)	3 (38%)	5 (42%)	0
4p+	4 (31%)	3 (38%)	3 (25%)	3 (21%)
4q+	4 (31%)	4 (50%)	0	1 (7%)
5p+	6 (46%)	4 (50%)	3 (25%)	8 (50%)
5q+	5 (38%)	4 (50%)	5 (42%)	7 (47%)
7p+	3 (23%)	2 (26%)	3 (25%)	8 (50%)
7q+	2 (15%)	2 (26%)	4 (33%)	7 (47%)
9q+	2 (15%)	1 (13%)	5 (42%)	8 (50%)
11q-	4 (31%)	4 (50%)	5 (42%)	0
12p+	5 (38%)	3 (38%)	2 (17%)	6 (40%)
12q+	5 (38%)	3 (38%)	6 (50%)	12 (80%)
14q+	2 (15%)	2 (26%)	0	7 (47%)
16q+	0	3 (38%)	3 (25%)	9 (60%)
17p-	7 (54%)	4 (50%)	1 (8%)	0
20q+	0	2 (26%)	5 (42%)	7 (47%)

são as aberrações mais comumente relatadas. Estas regiões cromossômicas aberrantes detectadas em estudos de CGH podem fornecer pistas a respeito de genes relevantes na formação da neoplasia maligna. Enquanto as regiões de ganho cromossômico são possíveis *loci* de genes envolvidos na promoção de crescimento e proliferação celular, as regiões de perda podem abrigar genes que suprimem o crescimento tumoral. Esse conceito é sustentado em duas linhagens de células derivadas de carcinoma de supra-renal (SW13 e NCI-H295) nas quais foram detectadas ampliações das regiões 3q28-qter e de 13q34, respectivamente^[34]. Nestes segmentos encontram-se os *loci* dos fatores de crescimento de fibroblasto (FGF) 12 e 14, respectivamente^[34]. As células SW13 produzem autocrinamente FGFs que conferem o crescimento independente de ancoragem (capacidade de proliferar, formar colônias em ágar)^[37]. Especula-se que a amplificação do 3q28-qter seja responsável pela produção autócrina do FGF12 por essas células e, conseqüentemente, pelo crescimento independente de ancoragem^[34]. Analogamente, a amplificação do 13q34 nas células da linhagem NCI-H295 poderia ter um impacto semelhante^[34]. Um outro exemplo é o gene TP53 cujo produto - p53 - exerce um importante papel na manutenção da integridade do genoma. O TP53 está localizado no 17p, uma das regiões mais freqüentemente perdidas em carcinoma de supra-renal. Dessa maneira, à medida que a anotação das seqüências dos genes da nossa espécie progride, com os avanços da genômica e da bioinformática, novos candidatos poderão ser apontados,

cuja participação na gênese de tumores de supra-renal precisa ser confirmada ou descartada.

1.6 Patobiologia tumoral, genotipagem de marcador único e tumores do córtex adrenal

Em contraste à varredura ampla, porém de baixo limite de resolução, da CGH, outras estratégias genéticas vem sendo aplicadas para identificar marcadores de malignidade e elucidar as vias bioquímicas envolvidas na transformação de células do córtex adrenal. O refinamento do mapeamento de deleções (obtido por CGH ou outros estudos) com análise de perda de heterozigose (“Loss of Heterozygosity” - LOH), assim como a exclusão de genes candidatos, arrolados por dedução a partir de vias de sinalização celular conhecidas ou por envolvimento confirmado em neoplasias (do córtex adrenal ou de outros tecidos), tem possibilitado o acúmulo de informações bastante específicas sobre a formação de tumores nas supra-renais.

O gene supressor tumoral *MEN1*, responsável pela neoplasia endócrina múltipla tipo 1, foi submetido a escrutínio para averiguar sua participação na tumorigênese adrenal por causa do acometimento de supra-renal em portadores desta síndrome (cerca de 40%)^[38], bem como pela freqüente perda do cromossomo 11q, que alberga o gene *MEN1* (11q13)^[32]. Verificou-se uma freqüente LOH do 11q13 em carcinomas esporádicos de córtex adrenal, bem mais prevalente entre os carcinomas do que entre os adenomas^{[39], [40], [41]}. Entretanto, mutação na região codificadora do *MEN1*

ocorre muito raramente em tumores esporádicos de córtex adrenal^{[39], [40], [41]} e não foi observada variação do acúmulo de RNA mensageiro (mRNA) ou de proteína do *MEN1* que possa ser correlacionada com o comportamento biológico do tumor^{[42], [43]}.

O exemplo acima ilustra como estudo das síndromes familiares as quais estão associadas a hiperplasias ou tumores adrenocorticais pode fornecer candidatos potenciais (nem sempre bem sucedidos) para uso na previsão do comportamento biológico das neoplasias do córtex adrenal. De fato, esta estratégia é a abordagem mais bem sucedida para identificar genes relacionados a câncer em geral^[44]. Duas síndromes, nas quais o carcinoma de córtex supra-renal é uma manifestação relativamente comum, merecem menção: a síndrome de Li-Fraumeni (OMIM #151623)^[45] e a síndrome de Beckwith-Wiedman (OMIM #130650)^[46].

A síndrome de Li-Fraumeni (“Li-Fraumeni syndrome” - LFS) é uma doença de herança autossômica dominante que confere propensão a cânceres, sendo caracterizada pelo início precoce e multiplicidade de tumores. Os tumores mais comuns são sarcomas de partes moles e osteosarcomas, tumores encefálicos, câncer de mama, leucemia e carcinoma de córtex adrenal^[45]. A definição formal de LFS e a síndrome semelhante a Li-Fraumeni (“Li-Fraumeni-Like syndrome” - LFL) requer que pelo menos três indivíduos portadores de câncer sejam identificados na família afetada^[45]. Na LFS clássica a família apresenta um indivíduo índice que desenvolve sarcoma antes da idade de 45 anos, um parente de primeiro grau que apresenta qualquer câncer antes dos 45 anos e um outro parente

da mesma linhagem (primeiro ou segundo grau) portador de qualquer câncer antes dos 45 anos ou de sarcoma em qualquer idade^[45]. A LFL, por sua vez, é definida pela presença do paciente índice que desenvolveu qualquer câncer infantil ou sarcoma, tumor de sistema nervoso central ou tumor adrenocortical antes dos 45 anos, de um parente da mesma linhagem (primeiro ou segundo grau) que apresenta(ou) um tumor típico da LFS em qualquer idade e um outro parente da mesma linhagem (primeiro ou segundo grau) que desenvolve(eu) qualquer câncer antes dos 60 anos^[45]. Foram encontradas mutações germinativas no gene do p53 (*TP53*, *locus* 17p13.1) em 70% dos portadores de LFS e 40% dos LFL^[45]. Em 9 indivíduos de um grupo de 14 crianças portadoras de tumores de córtex da supra-renal (12 carcinomas e 2 adenomas), sem história familiar típica de LFS ou de LFL, mutações germinativas do *TP53* estavam presentes^[47]. Além disso, em regiões Sul e Sudeste do Brasil, onde a incidência de carcinoma de córtex adrenal é 10 vezes mais alta do que no resto do mundo, uma única mutação (R337H) foi identificada na imensa maioria das crianças estudadas^[48], ^[49]. Estes achados sugerem que, ao menos no grupo pediátrico, tumores de córtex adrenal possam ser uma das faces mais visíveis de mutações herdadas do *TP53*.

Mutações do *TP53* são encontradas em 20% a 67% dos carcinomas de córtex adrenal^[50], ^[51], ^[49], ^[52], ^[53], ^[54], ^[55], ^[56], ^[57], ^[58], ^[59], ^[60], ^[61], ^[47], ^[62]. Esta frequência de mutações não é suficiente para que a genotipagem de *TP53* seja utilizada no diagnóstico diferencial entre adenoma e carcinoma de córtex adrenal. Em comparação, a perda alélica (LOH) no 17p13 (*locus* do

TP53) é muito mais capaz de prever a agressividade da evolução do tumor de córtex da supra-renal. Em 76 pacientes portadores desses tumores e cujos alelos do cromossomo 17p13 são informativos, a LOH do 17p13 (documentada por hibridação “Southern” e por “reação em cadeia da polimerase” (PCR) do polimorfismo de sítio *AccII* do exon 4 do *TP53*) prediz fortemente a recorrência tumoral e diminuição da sobrevida após completa remoção cirúrgica do tumor^[16]. Mas, apesar da forte correlação com evolução agressiva, o desempenho da LOH do 17p13 como marcador genético foi semelhante ao marcador histológico (sistema de Weiss)^[16]. Em 30 amostras de tumor de córtex adrenal obtidas de 29 pacientes brasileiros (15 crianças e 14 adultos) a deleção completa do cromossomo 17 foi detectada em 18 delas (10 adenomas e 8 carcinomas) ao passo que nos 12 tumores restantes (8 adenomas e 4 carcinomas) foi documentada apenas a perda de um único *locus* do cromossomo 17^[56]. Dos 17 pacientes com perda do cromossomo 17 nos tumores, 13 apresentavam a mutação R337H do *TP53*^[56]. Pelos dados apresentados a deleção do cromossomo 17 (abrangendo o *TP53*) confere um aumento de risco de malignidade (OR: 2,5) não alcançando, contudo, sensibilidade e especificidade suficientes para diagnóstico de malignidade do córtex adrenal neste grupo de pacientes brasileiros.

As características cardinais da síndrome de Beckwith-Wiedman são exonfalia, macroglossia e gigantismo em neonato^[46]. Além de macrossomia os pacientes portadores de BWS apresentam frequência aumentada de carcinoma de supra-renal, nefroblastoma e rhabdomyosarcoma^[46]. Esta

síndrome é causada por vários defeitos genéticos e epigenéticos que podem ocorrer no *locus* 11p15^[63]. Esta região cromossômica abriga genes como *CDKN1C* (também conhecido como *P57* ou *KIP2*, que codifica o inibidor 1C da quinase dependente da ciclina), *KCNQ10T1* e *H19*^[64]. Em indivíduos normais, o gene do fator semelhante à insulina (“insulin like growth factor”) - *IGF2* - localizado nesse mesmo *locus*, sofre “imprinting” materno^[64]. Por causa deste controle epigenético, apenas o alelo paterno do *IGF2* é expresso. Os diversos defeitos genéticos e epigenéticos deste *locus* resultam na perda do “imprinting” e hiper-expressão do *IGF2*. Os receptores do IGF1 e do IGF2 são expressos no córtex adrenal^[65], fornecendo a conexão fisiopatológica entre o efeito mitogênico do *IGF2* hiper-expresso e a gênese de tumor nesta síndrome.

A relação entre o rearranjo do 11p15 e a conseqüente hiper-expressão de *IGF2* com carcinomas esporádicos do córtex da supra-renal está bem estabelecida na literatura. As células NCI-H295R produzem abundantemente tanto mRNA quanto peptídeo de IGF2^[66]. Além disso, em um grupo pequeno de amostras, foi detectada a expressão elevada de *IGF2* em carcinomas hormonalmente ativos de córtex adrenal^[67], em correlação negativa com a expressão de *H19*^{[68], [69]}. Ficou também demonstrado que o promotor do *H19* está hipermetilado em carcinoma mas não em adenoma de córtex adrenal ou adrenal normal^[70]. Perda do alelo materno acompanhado de duplicação do alelo paterno (dissomia uniparental) do 11p15 é um evento que ocorre freqüentemente em carcinomas, mas não em adenomas, de córtex da supra-renal^{[71], [72]}. Em lesões neoplásicas adrenocorticais

localizadas a ocorrência de LOH de 11p15 ou a hiper-expressão de *IGF2* também se correlacionam com maior risco de recorrência e uma recorrência mais precoce^[16].

Citamos acima os principais marcadores selecionados com base em informações genéticas para distinção de carcinoma das demais lesões do córtex adrenal. Outros marcadores, selecionados por outros critérios, também têm sido testados. Por exemplo, o antígeno reconhecido pelo anticorpo monoclonal Ki-67 é detectável apenas em núcleos de células que estão em proliferação ativa, sendo considerado um marcador de proliferação celular^[73]. Por causa do seu aparecimento seletivo em células proliferantes o valor do Ki-67 na previsão prognóstica de neoplasias tem sido investigado. Alto índice de coloração por Ki-67 e baixa imunorreatividade do inibidor da quinase dependente de ciclinas p27KIP1 ocorrem com maior frequência em grupos de pior prognóstico de carcinoma de tireóide (carcinomas papilares e foliculares com características desfavoráveis ou carcinomas anaplásicos)^[74]. Os carcinomas do córtex da supra-renal apresentam índice de coloração bem mais alto do que o apresentado pelos adenomas e pelo tecido normal ($185,8 \pm 60,3$ núcleos/1000 células, $11,3 \pm 16,0$ núcleos/1000 células e $2,0 \pm 1,2$ núcleos/1000 células, respectivamente)^[75]. Pelo menos um grupo confirmou o achado de que a imunorreatividade ao Ki-67 em carcinoma de supra-renal é mais alta do que em adenomas deste tecido^[19]. Não está claro se a frequência de núcleos imunorreativos a Ki-67 se correlaciona ao índice mitótico definido para pontuação de Weiss (o critério do sistema de Weiss que apresentou mais forte correlação negativa com sobrevida). A utilidade

da imunorreatividade do Ki-67 no diagnóstico de carcinoma de córtex adrenal e seu desempenho frente a outros marcadores ainda requerem validação em estudos prospectivos com casuísticas maiores do que os já apresentados.

A família de fatores de transcrição GATA é formada por proteínas “dedo de zinco” (“zinc finger proteins”) que se ligam à seqüência regulatória (A/T)GATA(A/C). Existem seis membros conhecidos desta família, que podem ser divididos nos grupos hematopoiético e cardíaco. Os fatores GATA de 1 a 3 pertencem ao primeiro grupo e são expressos principalmente nas células tronco do sistema hematopoiético. Do segundo grupo participam os GATAs de 4 a 6 que são expressos no coração, pulmão, epitélio intestinal, fígado, endoderme de saco vitelino, gônadas, córtex adrenal, hipotálamo e pituitária^{[76], [77]}. Os fatores GATA exercem um papel essencial no controle do destino das células no desenvolvimento, proliferação e diferenciação celular, morfogênese orgânica e expressão tecido-específica de genes^{[78], [79]}. Em ovários humanos e de camundongos, o aumento de expressão do GATA-4 promove a proliferação de células da granulosa^[80] e a atresia folicular por apoptose ocorre em decorrência da redução da expressão do GATA-4^[80]. Expressão aumentada de GATA-4 foi associada a neoplasias como tumores de células da teca e da granulosa^[77], tumor do seio endodérmico^[81], adenocarcinoma esofágico e gástrico^[82], tumores de células de Sertoli e Leydig^[83]. O córtex adrenal normal de camundongo expressa normalmente apenas o GATA-6 e não o GATA-4. Em um modelo de tumorigênese utilizando camundongo que recebeu o transgene formado

por promotor de inibina α e Tag do SV40^[84] foi demonstrado que ocorria uma inversão desse padrão de expressão dos fatores GATA^[84]. Em um estudo envolvendo supra-renal humana, o mRNA do GATA-6 foi detectado tanto em adenomas como em carcinomas, embora o acúmulo do GATA-6 fosse menos intenso no segundo grupo^[85]. A expressão do GATA-4, por sua vez, era maior nos carcinomas do que nos adenomas e se correlacionava com agressividade biológica. Uma expressão relativa de GATA-4 maior do que 1,77 (normalizada pela expressão de ciclofilina) associou-se a mau prognóstico (OR 4,25)^[85]. Não foi possível utilizar a expressão de GATA-6 na previsão de prognóstico de tumores adrenocorticais^[85]. O receptor de LH, que medeia a hiper-regulação do GATA-4 em células gonadais^{[86], [80]}, também foi examinado neste mesmo trabalho e verificou-se que a hipop-expressão relativa do mesmo também se correlacionava com evolução agressiva (OR 5,33)^[85].

As extremidades teloméricas dos cromossomos de células eucarióticas sofrem encurtamento a cada ciclo replicativo. Este encurtamento, em última análise, contribui para o estabelecimento de um limite para a replicação celular e da entrada das células em senescência em vista da importância fundamental dos telômeros na estabilidade dos cromossomos^[87]. A telomerase (cuja expressão está presente em células germinativas e em algumas formas de câncer mas não na maioria das células somáticas adultas) alonga as extremidades dos cromossomos, evitando o encurtamento crítico de telômero e perda da viabilidade celular^[87]. Foi observado que a atividade da telomerase pode ser encontrada tanto em

carcinoma (2/2 amostras estudadas) quanto em adenoma (4/45 amostras analisadas) de córtex adrenal, mas não no córtex normal adjacente aos tumores^[88]. A atividade da telomerase detectada em carcinomas de suprarrenal (7 amostras) era maior do que aquela encontrada em adenomas (11 amostras) e não há sobreposição na atividade desses dois grupos^[89]. Em carcinomas, mas não em adenomas, a atividade da telomerase se correlacionava com o diâmetro tumoral^[89].

Virtualmente todas as células do organismo se comunicam com seus vizinhos através de poros que provêm comunicação direta citoplasma-a-citoplasma - “gap junctions”^[90]. As “gap junctions” são formadas pela associação de proteínas conhecidas como conexinas. Há evidências de que sinais inibitórios de crescimento sejam transmitidos através dos “gap junctions” durante a regulação da homeostase celular^[91]. Por isso as conexinas são consideradas como genes supressores tumorais^[90]. Apenas a $\alpha 1$ conexina 43 é detectada em córtex adrenal, seja ele tumoral ou normal^[92]. A zona fasciculata apresenta a mais alta expressão de $\alpha 1$ conexina e os tumores malignos do córtex adrenal a mais baixa^[92]. A expressão da $\alpha 1$ conexina nos adenomas é intermediária entre aquela encontrada no córtex normal e nos carcinomas^[92].

1.7 Análise comparativa de transcritomas

Os exemplos de marcadores moleculares acima citados resultam de análises focadas em um ou poucos candidatos e ilustram claramente a

limitação das estratégias pontuais. Embora estes estudos tenham aprofundado o conhecimento sobre a biologia destas lesões neoplásicas eles representam uma abordagem concentrada em “detalhes” da biologia tumoral e não fornecem um quadro completo do comportamento dos tumores. Uma vez que a transformação maligna resulta do acúmulo de múltiplas alterações genéticas, faz-se necessária a adoção de estratégias que permitam detectar de forma mais abrangente as alterações moleculares presentes nas lesões malignas adrenocorticais.

Nos últimos 25 anos diversas técnicas que permitem analisar simultaneamente a expressão de centenas a milhares de genes foram desenvolvidas o que possibilitou a comparação do conjunto de transcritos (transcritomas) de duas ou mais amostras. Em última análise, o objetivo final destas técnicas é a detecção de genes diferencialmente expressos na condição estudada e a aplicação das mesmas revolucionou várias áreas de Biologia, incluindo a carcinogênese. Entre as técnicas deste grupo podemos citar “Comparative Expressed Sequence Tag”, “Subtractive Hybridization” (SH), “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE), cDNA “microarrays” e “Differential Display”^[93]. Todas estas técnicas apresentam vantagens e desvantagens quanto à quantidade inicial de RNA necessária para realização do experimento, qualidade da informação fornecida, capacidade de quantificação relativa dos transcritos estudados e investimentos necessários em infra-estrutura, mão de obra e tempo para obtenção de resultado desejado.

Na “Comparative Expressed Sequence Tag” a comparação de transcrito é feita pela seleção de clones aleatórios de cDNAs (fita de DNA complementar) de duas bibliotecas, em geral, que representam o conjunto de RNAs mensageiros obtidos de células/tecidos em diferentes estados. As extremidades 5’ e 3’ de cada clone de cDNA são seqüenciadas parcialmente de modo a gerar etiquetas (“tags”) de seqüências expressas (“Expressed Sequence Tag” - EST) e a diferença dos transcritomas é detectada pela comparação dos resultados de seqüenciamento. Este método tem a vantagem de prover informação sobre a complexidade dos transcritomas (ver próximo parágrafo) estudados, bem como os clones diferencialmente expressos já isolados para experimentos adicionais de caracterização. No entanto, é um procedimento que consome bastante tempo e mão de obra e necessita de grandes quantidades de RNA de alta qualidade para a construção das bibliotecas de cDNA.

O número total de espécies diferentes de RNA mensageiro apresentado por células de mamíferos se situa na ordem de 10^4 por célula. Estes RNAs podem ser classificados em altamente abundantes (10 espécies distintas que apresentam 10.000 cópias/célula cada), moderadamente abundantes (500 - 1000 RNAs únicas a 100 - 400 cópias/célula cada) e raros (8000 - 10.000 espécies únicas a 5 - 10 cópias/célula cada)^[94]. Esta distribuição relativa da quantidade de espécies únicas de RNAs mensageiros é conhecida como complexidade do transcrito. Visto que a complexidade de transcrito é reproduzida nos clones de cDNA durante a construção das bibliotecas poder-se-ia prever a redundância na detecção dos clones

altamente representados (isto é, espécies muito e moderadamente abundantes), preço que se paga para o isolamento daqueles realmente interessantes do ponto de vista funcional, o que reduz a sensibilidade do procedimento. Para contornar este problema existem as estratégias baseadas em hibridação subtrativa (“Subtractive Hybridization” - SH)^[95] que visam construir bibliotecas enriquecidas com espécies diferencialmente expressas de RNA. Nesta estratégia, mRNAs derivados de uma das amostras de um par de tecidos a ser comparado é usado como molde na produção de cDNAs de fita simples, por meio de transcrição reversa. Os cDNAs produzidos são submetidos à hibridação em solução com os mRNAs da segunda amostra do mesmo par. Nesta etapa as espécies de RNA que existem em comum nas duas amostras comparadas produzirão híbridos RNA/cDNA e poderão ser removidas (subtraídas). As espécies que não formarem híbridos são aquelas diferencialmente expressas. Embora esta estratégia aumente a sensibilidade de detecção dos genes que expliquem as particularidades fenotípicas das amostras estudadas ela também é uma técnica que requer uma quantidade inicial grande de RNA dos espécimes estudados e investimento maciço em mão de obra.

A expressão diferencial de genes não é um fenômeno de tudo ou nada: variações no acúmulo do transcrito de um gene como resultado de alterações fisiológicas ou patológicas são informações importantes. Por esta razão foram desenvolvidas estratégias de análise de genomas funcionais que fornecem dados quantitativos (absolutos ou relativos) para contornar esta limitação das técnicas de caracterização de EST e de SH.

A técnica “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE)^{[96], [97]} consiste na geração de fragmentos pequenos (“tags” de cDNAs, em geral de 12 pares de bases), representando a extremidade 3’ dos mRNAs, que são posteriormente concatenados. Os fragmentos resultantes são então amplificados por PCR, inseridos em vetor de clonagem e seqüenciados. As seqüências obtidas servem para identificar as espécies de transcritos expressos no tecido estudado: a freqüência relativa de cada espécie de transcrito é a medida da intensidade de expressão de cada um deles no tecido de interesse. Além de informação quantitativa, o SAGE tem como vantagem adicional o fato de não precisar de nenhuma informação *a priori* do transcrito estudado. Por outro lado, a construção das bibliotecas de etiquetas de SAGE consome uma quantidade considerável de tempo e usa intensivamente mão de obra, inviabilizando desta forma a comparação de múltiplos transcritomas.

O “microarray”^{[98], [99]} é uma técnica de análise de transcritomas baseadas na hibridação reversa em fase sólida. Nesta técnica cada um dos fragmentos de ácido nucléico (cDNA ou oligonucleítido) que representa uma espécie única de RNA mensageiro é imobilizado em uma superfície sólida (“array”). Os transcritos do material biológico estudado são marcados (com radioatividade, nucleotídeos quimicamente modificados ou fluorocromos) e colocados para hibridar com cDNAs ou oligonucleotídeos presentes na superfície sólida. Dessa maneira, é possível associar à identidade de uma espécie de transcrito informações relativas à intensidade da sua expressão (proporcional ao sinal de hibridação). Uma das principais

vantagens do “microarray” é a velocidade com que os dados de expressão gênica são produzidos, o que possibilita a comparação de múltiplas amostras. Esta última característica gerou um novo paradigma - análise da Biologia do Sistema - aos estudos de problemas biológicos, pois a multiplicidade de amostras cuja expressão do conjunto de seus genes é passível de estudo num único experimento permite derivar conclusões mais gerais a respeito do comportamento de células/tecidos e observar como distúrbios em uma via perturba o comportamento de outras.

A análise de expressão gênica por “microarrays” foi aplicada a alguns estudos de carcinomas do córtex adrenal^{[100], [101], [102], [103]}. Estes confirmaram aspectos moleculares já conhecidos da tumorigênese de tecidos adrenocorticais e reforçam o potencial de algumas moléculas previamente pouco apreciadas como marcadores de prognóstico. Em um grupo pequeno de amostras de córtex adrenal - tecido normal, adenomas e carcinomas - estudados com “microarray” de oligonucleotídeo, foi possível separar os carcinomas dos demais tecidos utilizando um conjunto de genes selecionados, sem fazer referência ao diagnóstico histopatológico^[100]. Verificou-se também que a expressão de IGF2 nos carcinomas, acompanhada pela expressão de outros genes ligados à promoção da proliferação celular, estava consideravelmente aumentada em comparação aos outros tecidos adrenocorticais^[100]. Adicionalmente também foi relatado o aumento da expressão da osteopontina e da quinase de serina e treonina 15 (“serin threonin kinase” - STK 15), fato até então não observado em carcinoma de supra-renal^[100].

Dois grupamentos (“cluster”) de genes, detectados pela análise supervisionada do perfil de expressão de 230 genes em 57 tumores de córtex adrenal (33 adenomas e 24 carcinomas, de acordo com critérios de Weiss), mostraram-se capazes de distinguir os adenomas dos carcinomas^[101]. O primeiro “cluster” - IGF2 - formado por 8 genes, incluía fatores de crescimento, receptores de fatores de crescimento, o gene *KCNQ1OT1* (localizado no 11p15, assim como o *IGF2*) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*), um gene cuja expressão era normalmente considerada constitutiva (“housekeeping gene”) ^[101]. O segundo “cluster” - esteroidogênese - era composto de 14 genes, seis dos quais diretamente envolvidos em vias de biossíntese de esteróides. Além desses, este “cluster” também continha genes para fosfatase de proteínas 1A, cadeia β da proteína ligadora de cálcio S100 (“S100 calcium-binding protein, β -chain”), glipican 3, cadeia α da inibina, modulador de elemento de resposta a AMP cíclico (“cAMP response element modulator”), retinoblastoma 1, proteína não metastática 23 (“nonmetastatic protein 23”) e receptor tipo 3 do TGF β ^[101]. A expressão alta do “cluster” de IGF2 correlacionava-se com malignidade. Em contraste, a baixa expressão do “cluster” de esteroidogênese estava envolvida com o fenótipo maligno dos tumores^[101]. O valor preditivo positivo dos “clusters” (IGF2 e esteroidogênese) foi de 75% e 81%, respectivamente^[101]. Além desses 2 “clusters” foram identificados 14 genes não associados a nenhum grupamento específico, que permitem separar os tumores recorrentes dos não recorrentes^[101].

Um achado que tem sido consistentemente reproduzido nos estudos de tumores adrenocorticais por “microarrays” é a hiper-expressão de *IGF2*. Além dos estudos citados acima dois outros trabalhos publicados que utilizaram “microarray” demonstraram a associação do aumento do acúmulo de *IGF2* com o carcinoma de córtex adrenal^{[103], [102]}. Outros genes como o do ligante 10 de quimiocina (“chemokine ligand 10”) e da caderina 2, tipo 1, ambos hipo-expressos em carcinoma de adrenal^[102], e o da cromogranina B (“chromogranin B” - CgB)^[103] também foram correlacionados com carcinomas de adrenal.

Apesar da sua indiscutível contribuição ao conhecimento da biologia do carcinoma adrenocortical, a própria natureza da interrogação da expressão gênica por “microarrays” impõe uma severa limitação. Embora, talvez no futuro, possam ser representados transcritos de todos os genes do organismo em estudo, atualmente é possível avaliar apenas a expressão de genes cujos transcritos estejam representados no “array”. Este fato implica a necessidade de conhecimento prévio do transcrito que se pretende estudar - um requisito não satisfeito na maioria dos estudos de oncologia por “microarray” - o que dificulta (quando não impede) a descoberta de genes cuja participação nos processos tumorigênicos ainda seja desconhecida.

Frente ao estado atual do conhecimento a respeito do carcinoma do córtex adrenal decidimos utilizar uma abordagem global para estudar este problema. Considerando-se as limitações acima citadas, do “microarray” e de outras técnicas de comparação de transcritos, entendemos que a técnica adotada deve apresentar as seguintes características: 1) ter

capacidade de detectar tanto transcritos abundantes quanto raros;

- 2) conseguir fazer uma varredura sistemática do transcrito, tornando possível a busca por todos os genes expressos na amostra estudada;
- 3) permitir que os estudos sejam realizados com pequenas quantidades de RNA, uma vez que freqüentemente o material disponível pode ser escasso;
- 4) dispensar qualquer conhecimento prévio ou hipóteses a respeito do transcrito examinado;
- 5) oferecer possibilidade de detectar transcritos novos.

Por estas razões escolhemos o Differential Display^[104]. Em essência, o Differential Display funciona por amplificar sistematicamente a porção 3' terminal dos mRNAs eucarióticos de diferentes amostras, com a utilização de um dos "primers" oligo-dT ancorados (isto é, aqueles que têm uma base C, G ou A depois da seqüência de Ts) em combinação com um conjunto de "primers" curtos arbitrários^[93]. As intensidades das bandas obtidas podem ser utilizadas para estimar a expressão relativa dos transcritos que elas representam. Os transcritos expressos diferencialmente entre as amostras comparadas podem ser recuperados e identificados. Estão apresentados aqui os resultados da comparação de um espécime de carcinoma de córtex adrenal e de uma linhagem estabelecida de células com uma mistura de RNA de supra-renal humana normal. Estes dados vem a complementar os estudos globais do carcinoma de córtex da supra-renal e lançam luz sobre aspectos antes insuspeitos da biologia desta neoplasia.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

- 1) Identificar genes diferencialmente expressos em carcinoma do córtex da supra-renal quando comparada com córtex adrenal humano normal, utilizando uma estratégia de análise de transcritomas global e abrangente;
- 2) Selecionar, com base em anotação funcional e expressão relativa, transcritos com valor potencial para distinguir adenoma de carcinoma do córtex adrenal;
- 3) Testar e validar transcritos candidatos a marcador de malignidade tumoral em córtex da supra-renal.

MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Linhagem celular, espécime tumoral e controle de adrenal normal humanos

3.1.1 Células da linhagem NCI-H295A

As células NCI-H295A são uma subpopulação aderente das células NCI-H295^[105] - uma linhagem estabelecida a partir de implantes peritoniais de um carcinoma do córtex da supra-renal humana capaz de sintetizar várias espécies de esteróides^{[106], [107]}. Estas células foram gentilmente cedidas pelo Prof. Walter L. Miller (University of California, San Francisco). Visto que o objetivo primordial do presente estudo é comparar o transcrito representativo do carcinoma do córtex adrenal com transcrito de adrenal não neoplásico (controle) adotamos esta linhagem de células como modelo da neoplasia maligna de córtex adrenal humana. O uso de linhagens celulares derivadas de tumor em estudos de caracterização de transcritos foi validado para tumores de cólon e tumores pancreáticos^[108].

As células foram propagadas em meio RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, NY) suplementado com 2% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina, 0.25 µg/mL de anfotericina, 5 µg/mL de insulina, 5 µg/mL de transferrina e 5 ng/mL de selenita. A monocamada de células foi cultivada a 37 °C em 5% CO₂ até atingir a confluência, sendo então utilizadas na extração do RNA.

3.1.2 Espécimes tumorais

Neste estudo foram utilizados espécimes de tecidos obtidos de 20 pacientes com tumores adrenocorticais, 10 adultos e 10 crianças (≤ 16 anos de idade). Os dados referentes a características do tumor, manifestações clínicas, seguimento e evolução da doença se encontram na Tabela 2.

Uma amostra de tecido metastático de tumor adrenocortical de uma das pacientes (paciente 11, Tabela 2) foi utilizada, assim como as células NCI-H295A, na comparação com transcrito de adrenal normal. Esta paciente de 16 anos de idade^[109], que tinha sido tratada previamente com análogos de GnRH por causa de puberdade precoce dependente de gonadotrofinas, procurou atenção médica por hirsutismo (pontuação 17 na escala de Ferriman^[110]), irregularidade menstrual, agravamento da voz, sensibilidade na região lombar direita e uma massa palpável no flanco direito. Exames hormonais revelaram aumento do cortisol urinário total (560 $\mu\text{g}/24$ h) e cortisol sérico basal (16,7 $\mu\text{g}/\text{dL}$), não suprimido com 1 mg de dexametasona, testosterona sérica elevada (1.050 ng/mL), DHEA (21 ng/mL), DHEA-S (23.545 ng/mL), androstenediona (42 ng/mL) e 17 α -hidroxiprogesterona (9,6 ng/mL). Ela também apresentou gonadotrofinas basais elevadas (32,1 U/L) e sua secreção de LH respondeu significativamente após administração de 250 μg GnRH i.v., apesar dos elevados níveis de esteróides sexuais. Imagens (ressonância magnética) revelaram uma grande massa adrenal do lado direito de 17 x 14 x 13 cm, um trombo tumoral que se estendia da veia cava inferior até sua abertura no

Tabela 2 - Dados clínicos dos pacientes com tumores adrenocorticais

Paciente	Idade [⊗] (anos)	Sexo	Síndrome clínica	Tamanho (cm)	Estadio [✕]	Pontuação de Weiss ^Ω	Seguimento (anos)	Evolução
1	29	M	C	19	IV	8	0,5	Óbito
2	24	F	C/V	14	IV	6	1,3	Óbito
3	30	M	F	10	III	4	1	Óbito
4	21	F	V	13	IV	7	0,8	Óbito
5	18	F	V	13	III	8	1,3	Óbito
6	45	F	C/V	10	III	7	8,5	Sem recorrência
7	24	F	C	3	I	2	11	Sem recorrência
8	36	F	C/V	2,2	I	3	6	Sem recorrência
9	33	F	C	6	II	0	1	Sem recorrência
10	40	F	In	5,5	I	0	11	Sem recorrência
11	16	F	V	18	IV	7	2	Metástases/Óbito
12	1	F	C/V	8	II	7	4	Metástase pulmonar
13	6	F	C/V	7	III	7	2,5	Recorrência local/Óbito
14	2	F	V	5,2	II	7	4	Sem recorrência
15	2,5	M	V	2	I	5	11,5	Metástase pulmonar
16	1,5	F	V	3	I	4	9	Sem recorrência
17	2,5	M	V	6,5	II	4	13	Sem recorrência
18	1	M	V	4,5	I	5	11	Sem recorrência
19	2	M	V	6	II	5	6	Sem recorrência
20	2	F	C/V	2,5	I	5	2	Sem recorrência

Síndrome clínica: C = Síndrome de Cushing, V = Virilização, F = Feminilizante, In = Incidentaloma

⊗ Idade ao diagnóstico, ✕ Estadiamento McFarlane modificado por Sullivan^[11], Ω Critérios histopatológicos de Weiss^[17]

átrio direito, e múltiplas lesões metastáticas nos pulmões. A paciente foi submetida à remoção cirúrgica da adrenal direita, do rim direito e do trombo tumoral. Após a cirurgia ela foi tratada com 6 ciclos de um regime combinado de cisplatina, etoposide e mitotane. Durante o acompanhamento a paciente apresentou metástase no fígado e no mediastino, vindo a óbito em decorrência de complicações infecciosas.

Além do espécime tumoral desta paciente, utilizado na comparação dos transcritomas, foram também utilizados no presente estudo espécimes dos demais pacientes (Tabela 2) para confirmação das expressões diferenciais por nós detectadas nessa comparação. Todas as amostras foram obtidas após o consentimento dos pacientes ou de seus responsáveis legais. Os espécimes utilizados neste trabalho estão preservados no banco de tecidos do Laboratório de Hormônios e Genética Molecular - LIM/42 do Hospital das Clínicas da FMUSP (Serviço da Profa. Dra. Berenice Bilharinho de Mendonça). As peças tumorais foram preservadas em nitrogênio líquido imediatamente após sua excisão cirúrgica e dessa maneira conservadas até a extração de RNA. Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Protocolo de pesquisa N^o 470/05).

3.1.3 RNA controle de supra-renal humana

Como fonte de transcritos de córtex adrenal não neoplásico utilizamos uma preparação comercial de RNA (Human Adrenal Gland Total RNA Clontech, Palo

Alto, CA, lot. No. 1050635). Este preparado é uma mistura de RNAs extraídos de supra-renais de 62 indivíduos de ambos os sexos, de 15 a 61 anos de idade.

3.2 Obtenção do RNA das amostras

Todos os reagentes e soluções utilizados na extração ou processamento de RNA são livres de RNase, assim adquiridos dos fornecedores. A água utilizada no preparo de soluções no laboratório foi tratada com dietilpirocarbonato (DEPC), para eliminar qualquer eventual atividade de RNase. Para isso adicionou-se 0,1% (v/v) de DEPC à água Milli-Q. Após um período de 12 a 18 h o DEPC foi inativado por autoclavação a 121 °C por 15 minutos.

Além do tratamento da água com DEPC, outras medidas de prevenção de degradação do RNA foram adotadas, incluindo o tratamento da vidraria com calor seco (200 °C/4 h), uso de luvas para manipulação de instrumentos, tubos e frascos; aplicação de RNase Zap[®] * - um preparado comercial específico para eliminação de RNase - nas cubas de eletroforese e no instrumental usado na fragmentação e homogeneização de tecidos. As centrifugações foram realizadas a 4 °C, salvo se indicado o contrário.

* Após aplicação de RNase Zap as cubas e o instrumental foram enxaguados exaustivamente com água tratada com DEPC

3.2.1 Extração de RNA total a partir das células NCI-H295A

As células NCI-H295A foram cultivadas até a confluência, em uma placa com 15 cm de diâmetro. A monocamada de células aderida à placa foi lavada três vezes com solução de PBS, para imediata extração do RNA total com o reagente comercial TRIzol[®] a base de isotiocianato de guanidina (Invitrogen, Carlsbad, CA). A extração, em uma única etapa, é baseada no método de Chomczynski & Sacchi^[111], e foi realizada conforme instruções fornecidas pelo fabricante*.

O RNA foi quantificado em espectrofotômetro por absorvância a 260 nm (A_{260}) e a pureza da preparação foi avaliada pela relação das absorvâncias a 260 nm e a 280 nm (A_{260}/A_{280}). As amostras com A_{260}/A_{280} entre 1,8 e 2,0 foram consideradas adequadas. A eletroforese em gel de agarose 1% foi realizada para verificação da integridade do preparado. Foram consideradas íntegras as amostras que apresentaram as bandas 18S e 28S de RNA ribossomais intactas na visualização do gel por transiluminação com luz ultravioleta, após coloração do mesmo com brometo de etídeo (Invitrogen[™] Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA - 50 µg/mL gel). Para prevenir degradação das amostras de RNA durante a conservação foram adicionadas 40 U de inibidor placentário de ribonuclease (RNasin, Promega, Madison, WI), para cada 10 µL de preparação de RNA. As alíquotas foram conservadas a -80 °C.

*<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iProtocol.unitSectionTree&objectId=47F35F65D66FDC7376000A16FB06DD6C&treeNodeId=48EE00F4EFA019A020C63E2B5B3E5399>

3.2.2 Extração de RNA total de supra-renais normais

A preparação comercial de RNA representando supra-renais humanas é fornecida em suspensão alcoólica. Foram centrifugados 200 µL do produto a 12.000 g por 30 minutos para sedimentação do RNA. O “pellet” de RNA foi lavado com etanol 75% e ressuspenso em água DEPC. Para a quantificação e a verificação da qualidade do RNA, bem como a conservação das amostras, seguiu-se os mesmos procedimentos utilizados para o RNA de células NCI-H295A (item 3.2.1).

3.2.3 Extração de RNA dos espécimes tumorais

Fragmentos das amostras tumorais foram retirados da peça congelada para obtenção de RNA. O peso total dos fragmentos retirados dos espécimes tumorais foi de 100 mg, em média, sendo estes imediatamente colocados em 1 mL de TRIzol^{®*} e triturados com um homogeneizador (Biospec Products, Bartlesville, OK), seguindo-se a purificação do RNA conforme o fabricante do TRIzol^{®*}. Para a quantificação e a verificação da qualidade do RNA, bem como a conservação das amostras, seguiu-se os mesmos procedimentos utilizados para o RNA de células NCI-H295A (item 3.2.1).

*<https://catalog.invitrogen.com/index.cfm?fuseaction=iProtocol.unitSectionTree&objectId=47F35F65D66FDC7376000A16FB06DD6C&treeNodeId=48EE00F4EFA019A020C63E2B5B3E5399>

3.2.4 Tratamento do RNA com DNase I

O RNA obtido de cada amostra utilizada na comparação dos transcritomas foi tratado com DNase I (RQ1 RNase-free DNase, Promega Madison, WI) para garantir que os achados correspondam aos produtos de expressão e não a DNA genômico contaminante. Cada 10 µg de RNA foram incubados com 1 U da enzima e 40 U do inibidor de ribonuclease (em 40 mM Tris HCl pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 10 mM NaCl) a 37 °C por 30 minutos, em 50 µL finais.

Uma vez completado o tratamento com DNase os RNAs das células NCI-H295A, do tumor da paciente e do controle de adrenal normal foram submetidos à extração com fenol/clorofórmio (100 µL TRIzol[®]/20 µL clorofórmio), para remoção da DNase. O RNA da fase aquosa foi precipitado com isopropanol (84 µL para cada 100 µL de sobrenadante) e sedimentado por centrifugação a 12.000 g por 15 minutos.

Nos RNA extraídos dos demais tumores a eliminação do DNA genômico residual foi realizada por precipitação com acetato de amônio* com 0,3 M acetato de amônio, pH 4,5 e 2 volumes de etanol durante uma noite a -80 °C. Nesta condição o DNA e as proteínas permanecem solubilizadas enquanto o RNA é precipitado e recuperado por centrifugação a 20.000 g durante 15 minutos. Os “pellets” foram lavados com etanol 75% e ressuspensos em água DEPC.

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

Para comprovar a remoção do DNA genômico das preparações de RNA foram realizadas RT-PCRs para detecção do gene “housekeeping” (de expressão constitutiva) ciclofilina. Os “primers” CYC-F e CYC-R (Tabela 3) foram escolhidos de tal modo que o produto de amplificação do mRNA da ciclofilina contenha 259 bp, tamanho usual para as condições normais da PCR. A ausência da banda de amplificação em reações nas quais a transcriptase reversa não é empregada indica que a remoção do DNA genômico foi obtida. Uma alíquota de cada preparação de RNA tratada com DNase I foi empregada em RTs, com um oligonucleotídeo iniciador (“primer”) rico em timidina (T). A incubação foi realizada a 50 °C por 60 minutos, sendo adicionadas 200 U de uma transcriptase reversa do vírus de leucemia murina de Moloney modificada (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA), após os 10 minutos iniciais. A enzima foi inativada por incubação a 75 °C por 15 minutos.

Os produtos das RTs, assim como uma segunda alíquota de cada preparação de RNA tratado, foram utilizados em PCRs, para amplificação de um segmento da ciclofilina. As reações, realizadas num volume final de 20 µL, continham a amostra (0,8 µL de RNA ou RT), 4 pmol dos “primers” CYC-F e CYC-R, 1 U de Taq DNA polimerase e 2,5 nmol de dNTP (Pharmacia, Upsala, Suécia), em 50 mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂. Os parâmetros de ciclagem* incluíram uma etapa inicial de desnaturação por 5 minutos a 94 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação (15 s a 94 °C), “annealing” (30 s a 56 °C) e extensão (30 s a 72 °C). Por fim,

* Ciclador automatizado com controle de temperatura dos tubos

Tabela 3 - “Primers” utilizados em PCRs

“Primer”	Transcrito	Seqüência
CYC-F	Ciclofilina	5'-TTTCACAGAATTATTCCAGGGTTT-3'
CYC-R		5'-CAATATTCATGCCT TCTTTCACCT-3'
BCSC1-F	BCSC-1	5'- AGGGAGACTCCAGCAAGTGA -3'
BCSC1-R		5'- TCAGCTGCACAAGGTGATTC -3'
FUT11-F	FUT11	5'-CCATGGGACATAAGGAGCAT-3'
FUT11-R		5'-GTTGGACCAGCACCTTGAAT-3'

Tabela 4 - “Primers” de ancoragem (3´) e arbitrários (5´) utilizados no DDRT-PCR, para obtenção dos perfis de transcrição das amostras tumorais (células NCI-H295A e tumor da paciente) e do controle de adrenal normal

Nome		Seqüência
“Primer” de ancoragem	HT ₁₁ G	5´- AAG CTT TTT TTT TTT G-3´
	HT ₁₁ A	5´- AAG CTT TTT TTT TTT A-3´
	HT ₁₁ C	5´- AAG CTT TTT TTT TTT C-3´
	ET ₁₁ G	5´- GAA TTC TTT TTT TTT G-3´
	ET ₁₁ A	5´- GAA TTC TTT TTT TTT A-3´
	ET ₁₁ C	5´- GAA TTC TTT TTT TTT C-3´
“Primer” arbitrário	HAP1	5´-AAG CTT GAT TGC C-3´
	HAP2	5´-AAG CTT CGA CTG T-3´
	HAP3	5´-AAG CTT TGG TCA G-3´
	EAP4	5´-GAA TTC CTC AAC G-3´
	EAP5	5´-GAA TTC AGT AGG C-3´
	EAP6	5´-GAA TTC GCA CCA T-3´
	EAP7	5´-GAA TTC AAC GAG G-3´
	EAP8	5´-GAA TTC TTA CCG C-3´
	EAP9	5´-GAA TTC CAT TCC G-3´
	EAP10	5´-GAA TTC CCA CGT A-3´
	EAP50	5´-GAA TTC TGA GAC T-3´
	EAP53	5´-GAA TTC CCT CTA T-3´

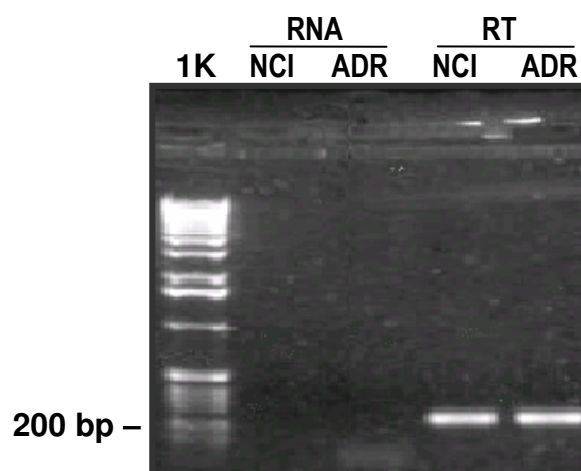


Figura 1 - Experimento representativo da análise de contaminação das amostras de RNA por DNA genômico

Amostras de RNA e seus respectivos produtos de RTs são submetidos a PCR para amplificação de um fragmento de ciclofilina (controle positivo). NCI = amostras provenientes da linhagem celular NCI-H295A; ADR = amostras provenientes do controle de adrenal normal; 1K = marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder - Invitrogen, Carlsbad, CA). Gel de agarose 1,5%.

uma extensão adicional de 7 minutos a 72 °C foi feita para que todas as cadeias cuja extensão já tivesse sido iniciada pudessem ser completadas. A Figura 1 mostra um resultado típico de tratamento bem sucedido: a banda correspondente ao fragmento do transcrito de ciclofilina só é observada nas PCRs onde a amostra de RNA utilizada foi previamente submetida a RT.

3.3 Differential Display - DDRT-PCR

No DDRT-PCR a extremidade 3' dos RNA mensageiros, presentes nas preparações de RNA total controle, das células NCI-H295A e do tumor metastático da paciente estudada, foi amplificada através RT-PCR. Foram utilizados um de três “primers” de ancoragem oligo-dT (3') combinados com um de doze “primers” (5') com 13 bases, de seqüência arbitrária. Os “primers” de ancoragem diferem respectivamente pela presença de uma base G, A ou C na posição imediatamente 3' após uma seqüência de 11 bases^[112]. As seqüências dos “primers” de ancoragem e “primers” arbitrários encontram-se na Tabela 4. A Figura 2 ilustra as principais etapas do DDRT-PCR.

Na primeira etapa (RT) trezentos nanogramas de RNA total de cada amostra, todos eles tratados previamente com DNase I, foram empregados em transcrições reversas. Além do RNA total a mistura de reação (20 µL finais) foi constituída de 4 pmol do “primer” de ancoragem (Tabela 3), 400 pmol de dNTP (PCR nucleotide mix, Promega, Corp., Madison, WI), 40 U de inibidor de ribonuclease e 200 U de uma transcritase reversa do

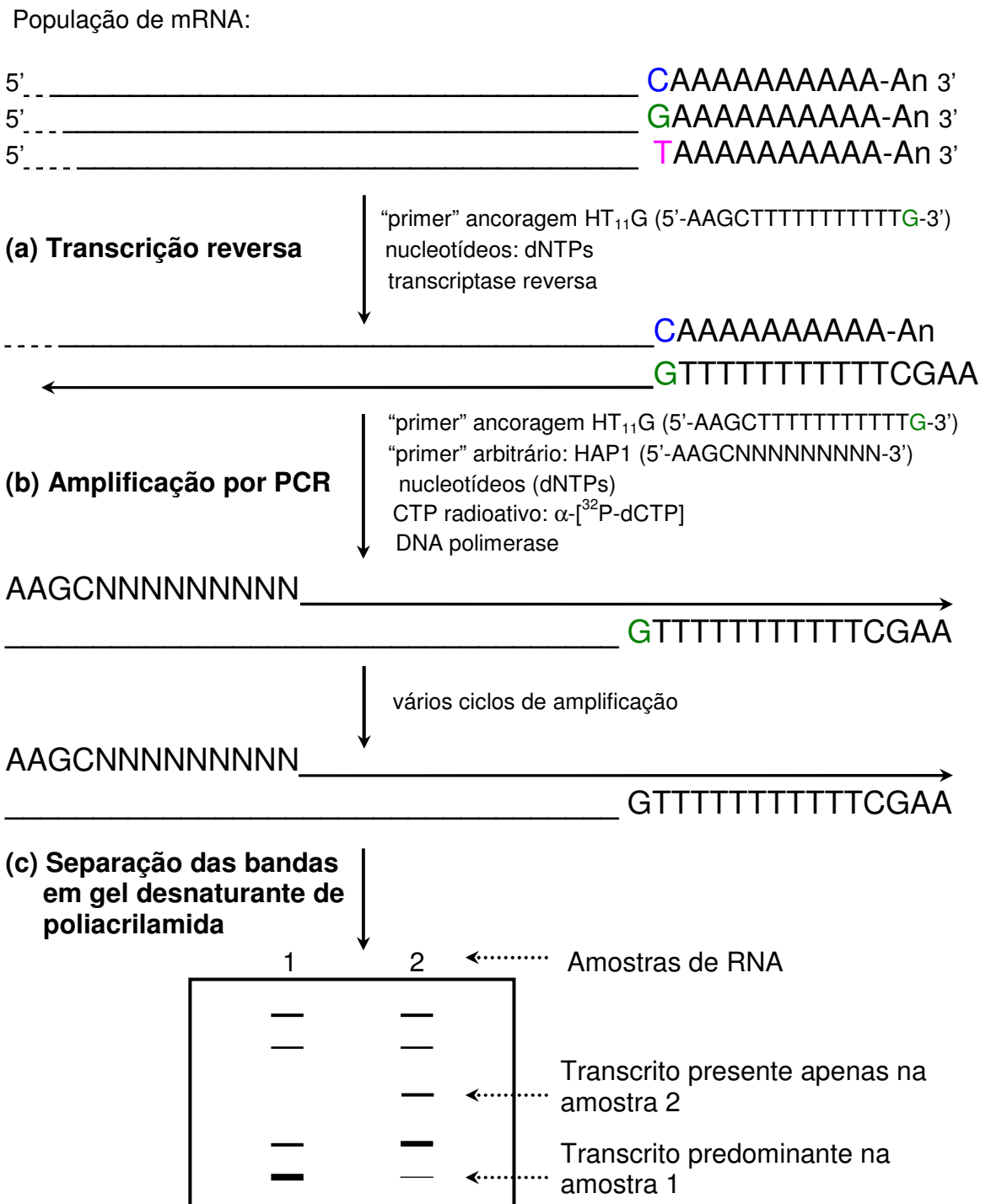


Figura 2 - Representação esquemática do “Differential Display” (DDRT-PCR)

Exemplo de comparação de duas amostras utilizando a combinação de um “primer” de ancoragem (HT₁₁G) com um “primer” arbitrário (HAP1). Diferentes pares de “primers” permitem analisar conjuntos distintos de mRNAs de cada amostra. Os transcritos diferencialmente expressos são recuperados, para seqüenciamento e identificação. Adaptado de GenHunter[®] on line (<http://www.genhunter.com/products/differential/>).

vírus de leucemia murina de Moloney modificada (SuperScript™ III Reverse Transcriptase, Invitrogen, Carlsbad, CA). A reação ocorreu em 50 mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT. A incubação foi realizada a 50 °C por 60 minutos, sendo a transcriptase reversa adicionada após os 10 minutos iniciais. A enzima foi inativada por incubação a 75 °C por 15 minutos. Para cada amostra de RNA (células NCI-H295A, espécime tumoral e controle) foram realizadas três transcrições reversas independentes, com cada um dos “primers” de ancoragem.

Os cDNAs de cada uma das transcrições reversas foram amplificados por PCRs, com o mesmo “primer” de ancoragem que lhes deu origem combinado com um “primer” arbitrário (Tabela 4). Inicialmente foram utilizados 10% dos produtos da RT (2 µL), 2 µCi de [α -P32] dCTP, (Amersham-Pharmacia, Piscataway, NJ), 20 pmol de cada “primer”, 400 pmol de cada dNTP (PCR nucleotide mix, Promega, Madison, WI) and 1 U Taq Polymerase (Qiagen, Hilden, Germany). A mistura de reação (20 µL finais) continha 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 9,3 e 1.5 mM MgCl₂. Posteriormente a mistura comercial de nucleotídeos foi substituído por uma mistura de nucleotídeos individuais (Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, United Kingdom) na qual o dCTP não radioativo foi reduzido para 17,2 pmol. Em testes comparativos, com diferentes concentrações deste nucleotídeo, esta condição aumentou a intensidade do sinal das bandas produzidas, reduzindo tempo necessário para a revelação do autorradiograma e permitindo o uso do dCTP radioativo por um período mais prolongado, dada à limitada meia vida do isótopo [α -P32], sem detrimento da qualidade da

resolução das bandas. Os parâmetros de ciclagem* incluíram uma etapa de desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 15 s a 94 °C, 2 minutos a 40 °C e 45 s a 72 °C e uma etapa final de extensão por 5 minutos a 72 °C.

Os fragmentos amplificados e radiomarcados foram resolvidos em gel poliacrilamida 6% desnaturante (7 M de uréia), em TBE (Tris-HCl 45 mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 100 mM, pH 8,6). A 5 µL das amostras foram adicionados 3,5 µL de tampão de aplicação (95% formamida, 10 mM EDTA, 0,09% de xileno cianol, 0,09% de azul de bromofenol), seguindo-se desnaturação por 3 minutos a 80 °C e aplicação no gel. Foram aplicados lado a lado os produtos resultantes respectivamente das amostras tumoral (células NCI-H295A ou tumor da paciente) e controle de adrenal normal, de cada combinação de “primers”, para melhor comparação do perfil eletroforético. A corrida eletroforética foi realizada com potência fixa em 60 W, com pré-corrída de 40 a 60 minutos, e finalizada imediatamente após a saída do segundo corante.

Após a eletroforese o gel foi transferido a um papel de filtro Whatman, submetido a secagem por calor e vácuo e exposto contra uma tela sensível radiação beta (“phosphorscreen”) por uma noite. O autorradiograma das bandas foi capturado em um “Phosphorimager” Storm 860 (Amersham Pharmacia Biotech) o que permite a documentação digital do experimento e análise da qualidade da corrida e das bandas. A seguir o mesmo gel foi exposto a um filme de radiografia e revelado após 2 a 7 dias.

* Ciclador automatizado com controle de temperatura dos tubos

As imagens digitais dos autorradiogramas dos géis de DDRT-PCR foram submetidas a correção de sinais de fundo e depois analisadas pelo programa ImageQuant (ImageQuant, versão 5.2 - Molecular Dynamics/Amersham Pharmacia Biotech). Todas as bandas foram então marcadas com um retângulo de 4 x 11 pixels. Em cada dupla de colunas (transcritos das amostras tumorais x controle obtidos com um mesmo par de “primers”), para cada banda marcada em uma das colunas um retângulo de mesmas dimensões foi também desenhado na coluna da amostra controle, na altura correspondente (com ou sem banda). As intensidades das bandas foram determinadas e os respectivos valores transferidos para uma planilha eletrônica (Microsoft Excel), para cálculo da relação de intensidades de banda tumoral/banda controle. Eram candidatas a posterior análise aquelas bandas cuja razão das intensidades tumoral/controle fosse maior do que 2 ou menor do que 0,5. Foram analisadas preferencialmente as bandas que apresentaram maior diferença de expressão na avaliação visual do autorradiograma obtido no filme de radiografia.

A posição das bandas a ser recortada foi determinada pela justaposição da imagem do autorradiograma do filme ao gel. Cada banda de interesse foi recortada do gel e hidratada com 100 µL de água, durante 30 a 60 minutos a temperatura ambiente, fervidas durante 15 minutos e eluídas por um período de 4 a 24 horas em geladeira. O material eluído (1 a 3 µL) foi amplificado por PCR com o mesmo par de “primers” que gerou a banda correspondente no DDRT-PCR. Além da banda eluída a reação (50 µL) continha 10 pmol de cada “primer”, 2,5 nmol de dNTP e 2,5 U Taq DNA

polimerase (Pharmacia, Upsala, Suecia), em 50 mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂. Os parâmetros de ciclagem foram: desnaturação inicial por 5 minutos a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 2 minutos a 40 ou 41 °C e 45 s a 72 °C, e extensão final por 5 minutos a 72 °C. Os produtos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 1,5% com brometo de etídeo, conforme mencionado no item 3.4, para resolução dos fragmentos amplificados. Nos casos em que bandas secundárias estivessem presentes foi adotado para a PCR um protocolo de “touch down”, onde a temperatura de “annealing” é alta no primeiro ciclo e decresce gradativamente nos demais ciclos (55 °C no 1º ciclo; decréscimo de 1 °C do 2º ao 12º ciclo; 43 °C por 3 ciclos, 42 °C por 4 ciclos e 41 °C nos 11 ciclos restantes).

Os produtos da amplificação das bandas foram seqüenciados diretamente. Inicialmente os nucleotídeos e “primers” não incorporados na PCR foram removidos pelo tratamento com exonuclease I e fosfatase alcalina de camarão (ExoSap-IT, Amersham Pharmacia Biotech, Cleveland, Ohio, USA), utilizando-se 2 µL para até 7 µL de amostra. A reação foi incubada por 15 minutos a 37 °C, seguidos de 15 minutos a 80 °C.

Todo o produto de purificação foi então empregado nas reações de seqüenciamento com o kit BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), conforme instruções do fabricante. O “primer” adicionado (5 pmol) foi o mesmo “primer” de ancoragem que gerou o transcrito nos experimentos de DDRT-PCR. O produto da reação de seqüenciamento foi purificado em colunas Centri Sep (Princeton Separation, Adelphia, New Jersey, USA) e submetido à

eletroforese capilar no seqüenciador automático ABI Prism 310 ou 3100 Genetic Analyzer Automatic DNA Sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas em bancos de seqüências genômicas*, para identificação e anotação dos transcritos.

3.4 Expressão dos genes *BCSC-1* e *FUT11* em tumores adrenocorticais

A abundância dos transcritos do gene supressor tumoral *BCSC-1*^[113] e do gene da *FUT11* (fucosiltransferase 11)^[114] foi avaliada em 19 tumores adrenocorticais, provenientes de 10 adultos e 9 crianças, (pacientes 1 a 10, 12 a 20, Tabela 2). No grupo dos adultos o tumor foi considerado maligno quando o índice de Weiss era igual ou superior a 4 e benigno quando inferior a 4. Nos tumores pediátricos, nos quais os critérios de Weiss não são adequados^{[12], [115]}, foram classificados em localizados ou disseminados/recorrentes.

O RNA total foi extraído dos tumores (item 3.2.3) e tratado para remoção do DNA genômico (item 3.2.4). Um micrograma de RNA total foi reversamente transcrito juntamente com 10 nmol dNTP (Pharmacia, Upsala, Suecia), 0,5 µg de primer oligo(dT) (oligo(dT)12-18, Invitrogen, Carlsbad,

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>
<http://www.ensembl.org>
<http://www.expasy.org>
<http://source.stanford.edu>
<http://david.abcc.ncifcrf.gov> (Genome Biology 2003;4(5):P3)

CA) e 40 U de inibidor de ribonuclease, em 50 mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT.

As PCRs realizadas num volume final de 20 µL continham a amostra de DNA, 4 pmol de cada "primer" (BCSC1-F/BCSC1-R ou FUT11-F/FUT11-R) (Tabela 3), 1 U de Taq DNA polimerase e 2,5 nmol de dNTP (Pharmacia, Upsala, Suecia), em 50 mM Tris HCl pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂. Os parâmetros de ciclagem foram: 1) BCSC-1: 40 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 54 °C e 60 s a 72 °C; 2) FUT11: 30 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 58 °C, 60 s a 72 °C e 3) Ciclofilina: 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C e 30 s a 72 °C. Todos os três protocolos de amplificação foram precedidos de uma etapa de desnaturação inicial de 5 minutos a 94 °C e outra de extensão final de 7 minutos a 72 °C. Para amplificação de BCSC-1 a concentração de MgCl₂ foi aumentada para 2 mM.

As imagens digitalizadas dos géis de eletroforese dos produtos de PCR foram lidas por um aplicativo comercial (UN-SCAN-ITgel™ digitizing software, Silk Scientific, Inc.-Orem, Utah, USA), para extração da intensidade das bandas. A intensidade da banda correspondente à ciclofilina foi usada como controle interno para normalização dos sinais. A expressão dos genes *BCSC-1* e *FUT11* nos diferentes grupos de tumores foi comparada através de testes Mann-Whitney.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Obtenção de transcritos diferencialmente expressos nas amostras tumorais por “Differential Display” (DDRT-PCR)

O perfil transcricional da linhagem celular NCI-H295A ou do tumor adrenocortical da paciente foi comparado ao do “pool” de adrenais humanas normais, através do DDRT-PCR. Foram empregadas as preparações de RNA previamente tratadas com DNase I.

4.1.1 Perfil transcricional comparativo

Nos experimentos de DDRT-PCR foram utilizadas 27 combinações de primers no estudo da linhagem celular e 12 no do tumor. Este número de combinações cobre teoricamente^[104] 38,7% e 15,1% do transcrito das células NCI-H295A e do tumor, respectivamente.

A figura 3 ilustra a imagem digitalizada de um gel típico, comparando o perfil de expressão de uma das amostras tumorais (células NCI-H295A ou tumor da paciente) com o do controle de adrenal normal. Os produtos transcricionais de ambas as amostras gerados pelo mesmo par de “primers” foram aplicados lado a lado, para facilitar a comparação. O sinal dos cDNAs amplificados e radiomarcados dos géis foi capturado (Figura 3A) e as imagens tratadas para remoção do “background” (Figura 3B). As bandas foram então

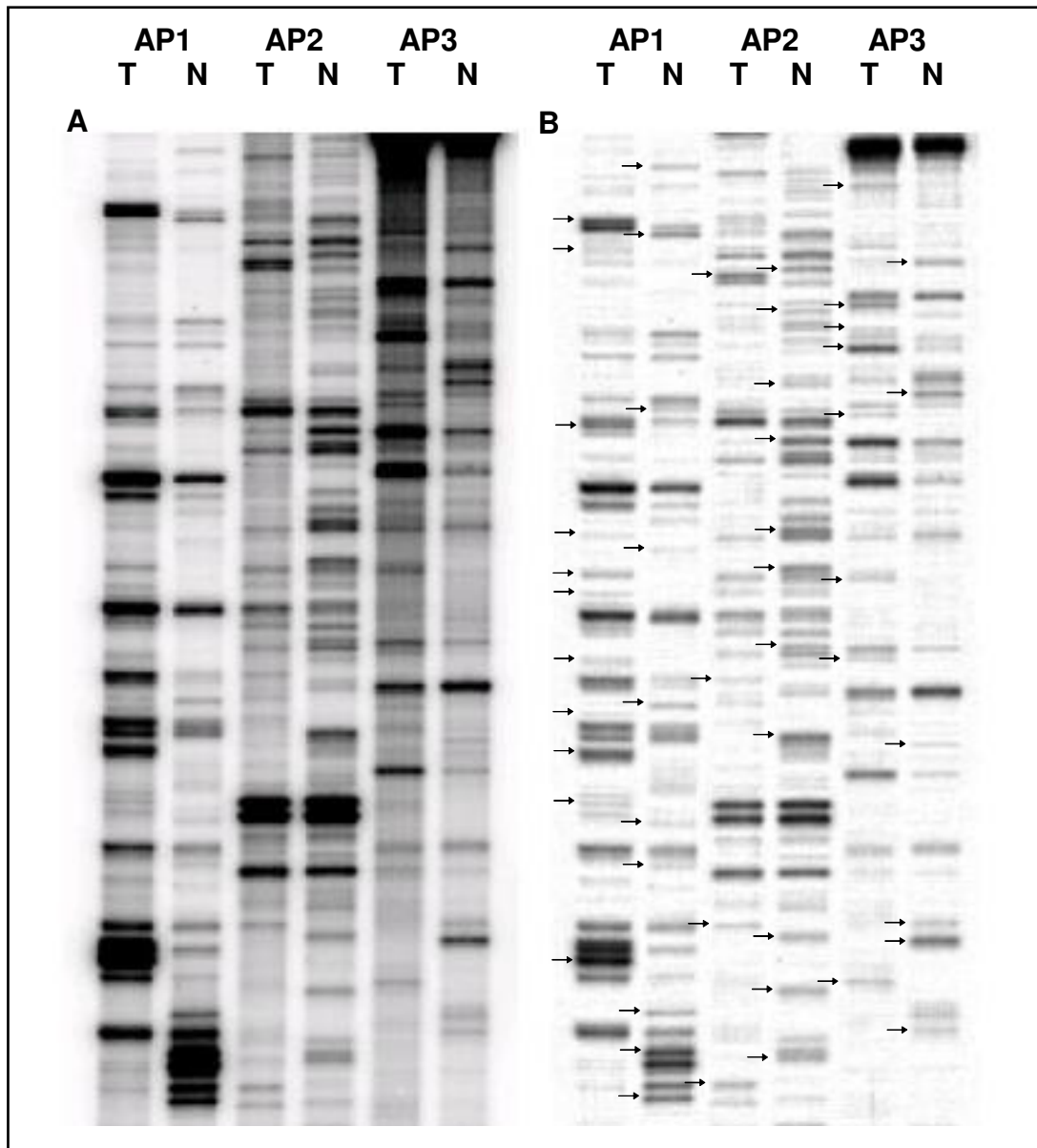


Figura 3 - Autorradiograma típico de um experimento de DDRT-PCR

Os produtos de RT provenientes das amostras tumorais (células NCI-H295A ou espécime tumoral) e do controle de adrenal normal foram utilizados nos experimentos de DDRT-PCR. Neste exemplo um “primer” de ancoragem foi combinado com três “primers” arbitrários (AP1, AP2 ou AP3). Para cada uma das combinações o perfil de transcritos de uma das amostras tumorais (T) foi comparado lado a lado com o do controle (N). A imagem digitalizada do gel de seqüenciamento (A) foi submetida a remoção de “background” (B) e comparação das intensidades das bandas. As setas indicam alguns dos fragmentos selecionados para análise.

delimitadas: a DO de cada banda da amostra tumoral foi comparada com a da banda (ou posição) correspondente do controle e vice-versa. Os transcritos foram considerados hiper- ou hipo-expressos quando a relação $DO_{amostra}/DO_{controle}$ era superior a 2 ou inferior a 0,5, respectivamente.

Para cada canaleta do gel de seqüenciamento, contendo os produtos gerados por cada combinação de “primers”, foi possível detectar 85 bandas, em média. Entre essas foram selecionadas 5 a 40 que apresentaram diferença de expressão mais evidente. Os fragmentos selecionados foram eluídos do gel e amplificados por PCR, utilizando-se o mesmo par de “primers” que os originaram (Figura 4). No total foram recuperadas 79 a 233 bandas de cada amostra tumoral e condição, isto é, transcritos hiper-/hipo-expressos nas células NCI-H295A ou no tumor em relação ao controle (Tabela 5).

4.1.2 Identificação e classificação dos transcritos

As seqüências dos produtos de PCR foram comparadas com as depositadas em bancos de seqüências genômicas. Os transcritos para os quais não houve retorno de nenhum registro foram descartados. Os resultados redundantes, isto é, duas ou mais bandas representando o mesmo transcrito, foram consolidados. Essas seqüências (únicas) foram separadas em 8 grupos, correspondentes aos genes hiper-/hipo-expressos nas amostras tumorais (células NCI-H295A ou tumor da paciente), representando

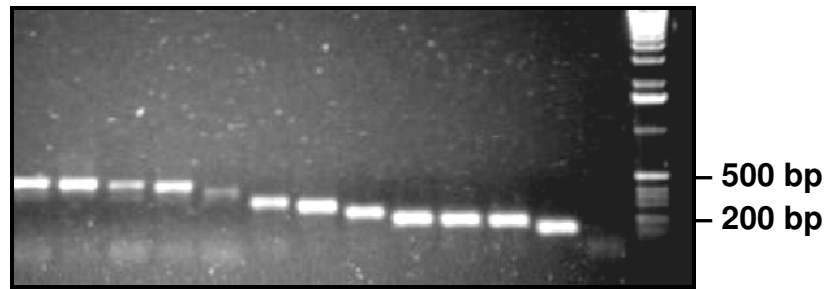


Figura 4 - Produtos de re-amplificação de bandas selecionadas do gel de DDRT-PCR

As bandas correspondentes a transcritos com expressão diferenciada entre as amostras tumorais e o controle de adrenal normal foram eluídas de uma das canaletas do gel de seqüenciamento e utilizadas em PCRs, com o mesmo par de “primers” que os geraram (este gel corresponde aos transcritos selecionados de uma canaleta do gel de DDRT-PCR). 1K = marcador de peso molecular 1 Kb DNA Ladder - Invitrogen, Carlsbad, CA). Gel de agarose 1,5%.

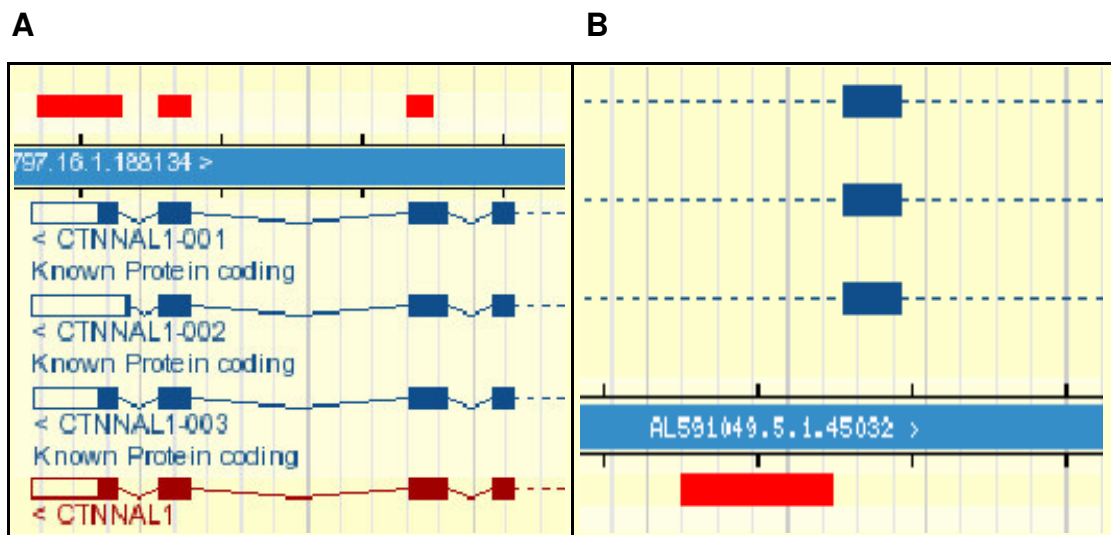


Figura 5 - Resultados típicos de consulta de seqüências obtidas a banco público de seqüências depositadas

As seqüências dos transcritos re-amplificados foram comparadas com as de bancos de seqüências genômicas (<http://www.ensembl.org>). Os transcritos identificados (barras vermelhas) mapearam tanto em regiões exônicas (**A**) quanto intrônicas (**B**) de genes conhecidos.

tanto regiões exônicas quanto intrônicas desses genes (Tabela 5, Figura 5).

Todos os transcritos identificados neste estudo estão listados nas Tabelas 6 a 15.

4.2 Distribuição dos transcritos nos cromossomos

As 317 seqüências únicas obtidas neste estudo cobriram quase todos os cromossomos (Figuras 6 e 7). Os transcritos diferencialmente expressos nas células NCI-H295A em relação ao controle de adrenal normal não representaram as regiões 4q, 13p, 14p, 15p, 17p, 18q, 21 e 22p. Para a amostra do tumor da paciente não houve representação das regiões 9p, 10p, 13p, 14p, 15p, 18p, 21p e 22p. Apenas 5 cromossomos (13p, 14p, 15p, 21p e 22p) não foram representados por nenhum transcrito de ambas as amostras. Os cromossomos que mais contribuíram com transcritos diferencialmente expressos foram o 1q, para células NCI-H295A, e 15q, para o tumor da paciente.

Não houve proporcionalidade entre o número de transcritos exônicos e intrônicos para cada cromossomo (Figura 7). Entre os fragmentos correspondentes a regiões exônicas de genes os cromossomos mais representados pelos transcritos hiper-expressos nas células NCI-H295A foram 1q, 14q e MT. O cromossomo 17 q foi o mais representado pelos transcritos exônicos hipo-expressos. Na amostra do tumor da paciente os transcritos exônicos hiper-expressos mapearam com maior freqüência nas regiões 5q e 15q.

Tabela 5 - Transcritos obtidos nos experimentos de DDRT-PCR: células NCI- H295A ou tumor da paciente comparados com o controle de adrenal normal

		Células NCI-H295A	Tumor da paciente
Hiper-expressos	Bandas recuperadas	154	233
	Seqüências úteis	144	174
	Seqüências únicas: total	93	126
	exônicas	58	40
	intrônicas	33	86
Hipo-expressos	Bandas recuperadas	79	99
	Seqüências úteis	65	70
	Seqüências únicas: total	47	53
	exônicas	23	23
	intrônicas	24	30

As seqüências obtidas após o processamento de todas as bandas recuperadas dos géis (seqüências úteis) foram analisadas. Resultados redundantes ou seqüências não reconhecidas foram descartados. As seqüências restantes (seqüências únicas) foram classificadas em 8 grupos para análise funcional.

Tabela 6 - Genes* hiper-expressos nas células NCI-H295A

Gene	Citobanda
Ubiquitin specific peptidase 1	1p31.3
DNA methyltransferase 1 associated protein 1	1p34
Chromosome 1 open reading frame 2	1q21
Ras-like without CAAX1	1q21.2
LAG1 longevity assurance homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	1q21.2
Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	1q21.2
Death associated protein 3	1q21-q22
Small proline-rich protein 2D	1q21-q22
Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (<i>eta</i>)	2p13.2
GENSCAN0000000030	2p16.1
Chromosome 2 open reading frame 37	2q31.1
LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	3p25.1
Leucine rich repeat containing 58	3q13.33
Transmembrane protein 39A	3q13.33
eIF-2B GDP-GTP exchange factor	3q27.1
Leukemia inhibitory factor receptor	5p13-p12
Cisplatin resistance related protein CRR9p	5pter-p15.3
3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	5q13.3-q14
Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	5q35.3
KIAA0241	7p14.3
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	7p15
Tetraspanin 13	7p21.1
Dynein axonemal heavy polypeptide 11	7q21
Cell division cycle associated 2	8p21.2
Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	8p23.1
Peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (Zellweger syndrome)	8q21.1
Clathrin light polypeptide (Lca)	9p13
Phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 2	9p24.1
Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	9q31.2
Zinc finger protein 618	9q32
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	10q21.1
Tripeptidyl peptidase I	11p15
Zinc finger protein 91 homolog (mouse)	11q12
Ferritin, heavy polypeptide 1	11q13
DAZ associated protein 2	12q12
Prefolding subunit 5	12q1212q13
Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	12q24.3-qter
Importin 4	14q12
Solute carrier family 38, member 6	14q23.1
Coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (<i>S. cerevisiae</i>)	14q24.3
Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	14q32.13
Cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	15q21.2
THAP domain containing 10	15q23
Epithelial membrane protein 2	16p13.2
WD repeat domain 68	17q23.3
Thymidylate synthetase	18p11.32
Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	19q12-q13.1
GIN5 complex subunit 1 (Psf1 homolog)	20p11.21
Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 KD)	22cen-q12.3
Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	22q13.1
Adenylosuccinate lyase	22q13.1-q13.2
Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	Xp22.12
Oligophrenin 1	Xq12
ATP synthase 6	MT
ATP synthase f0 subunit 8	MT
Cytochrome b	MT
Cytochrome oxidase subunit II	MT
NADH dehydrogenase subunit 4	MT

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva localização cromossômica

Tabela 7 - Genes* hiper-expressos no espécime tumoral

Gene	Citobanda
Ras-associated protein RAP1	1p13.3
Palmdelphin	1p21.3
5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	1q43
Transmembrane protein 127	2q11.2
IWS1 homolog (S. cerevisiae)	2q14.3
Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	2q31
Myeloid differentiation primary response gene (88)	3p22-p21.3
Hermansky-Pudlak syndrome 3	3q24-q25.1
Dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	3q27
Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	4q22.2
3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	5q13.3-q14
Chromosome 5 open reading frame 13	5q22.1
IK cytokine, down-regulator of HLA II	5q31.3
Dedicator of cytokinesis 2	5q35.1
Adenosylmethionine decarboxylase 1	6q21-q22
Peroxisomal biogenesis factor 7	6q21-q22.2
Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	7q32-q33
Myotrophin	7q33-q35
SPFH domain family, member 2	8p11.2
Neurofilament 3 (150kDa medium)	8p21
Neurofilament, light polypeptide 68kDa	8p21
N-myc downstream regulated gene 1	8q24.3
Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	10q21.1
Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	10q22.3
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	12p13
Ubiquitin specific peptidase 12	13q12.13
Nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small nucleolar RNPs)	15q14-q15
Tumor protein p53 binding protein, 1	15q15-q21
Cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	15q21.2
Beta-2-microglobulin	15q21-q22.2
Cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase	15q22
Tropomyosin 1 (alpha)	15q22.1
THAP domain containing 10	15q23
Protein regulator of cytokinesis 1	15q26.1
Nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide-like	17q23.2
Myosin VB	18q21
Transmembrane protein 1	21q22.3
Sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	22q13.31
Zinc finger protein, X-linked	Xp21.3
ATP synthase 6	MT

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva localização cromossômica

Tabela 8 - Genes* hipo-expressos nas células NCI-H295A

Gene	Citobanda
PHD finger protein 13	1p36.31
Transmembrane protein 127	2q11.2
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	4q12
Prolactin receptor	5p14-p13.3
Ankyrin repeat and KH domain containing 1	5q31.3
N-myc downstream regulated gene 1	8q24.3
Cytoskeleton associated protein 5	11p11.2
Ribosomal protein L27A	11p15
Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	11p15.5
Asparagine-linked glycosylation 8 homolog (<i>S. cerevisiae</i> , alpha-1,3-glycosyltransferase)	11q14.1
FK506-binding protein 11 precursor	12q13.12
ADP-ribosylation factor 3	12q13
Forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	13q14.1
Beta-2-microglobulin	15q21-q22.2
Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	15q23-q43
3 beta-hidroxyesteroid dehydrogenase type 7	16p12p11.2
Thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-ERB-A) oncogene homolog, avian)	17q11.2
SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	17q21.2
Signal recognition particle 68kDa	17q25.1
Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	19p13.1-p12
Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	20q11.22-q11.23
Cytochrome c oxidase polypeptide I	MT
NADH dehydrogenase subunit 2	MT

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva localização cromossômica

Tabela 9 - Genes* hipo-expressos no espécime tumoral

Gene	Citobanda
Filamin binding LIM protein 1	1p36.21
Cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa	2p25.1
SP110 nuclear body protein	2q37.1
RAB7, member RAS oncogene family	3q21.3
Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	4q12
Fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly)	5q23-q31
Flotillin 1	6p21.3
Ras responsive element binding protein 1	6p25
Utrophin (homologous to dystrophin)	6q24
Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	7q31.1
RB1-inducible coiled-coil 1	8p22-q21.13
Ribosomal protein L27a	11p15
Ring finger protein 141	11p15.4
Chromosome 11 open reading frame 30	11q13.5
Tar (HIV-1) RNA binding protein 2	12q12-q13
Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	14q24.3
THUMP domain containing 1	16p12.2
Coiled-coil domain 47	17q23.3
APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)	17q25.3
Myosin IF	19p13.3-p13.2
Oligophrenin 1	Xq12
NADH dehydrogenase subunit 3	MT
Cytochrome c oxidase subunit i	MT

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva localização cromossômica

Tabela 10 - Genes* hiper-expressos nas células NCI-H295A

Nº de acesso	Gene	ER*
NM_001071	Thymidylate synthetase	95,50
BC015971	Ubiquinol-cytochrome c reductase complex (7.2 KD)	71,87
NM_007096	Clathrin light polypeptide (Lca)	52,60
NM_002547	Oligophrenin 1	52,40
NM_019100	DNA methyltransferase 1 associated protein 1	42,74
NM_006945	Small proline-rich protein 2D	38,90
BG354575	Cell division cycle associated 2	36,00
gi:17981862	NADH dehydrogenase subunit 4	35,58
gi:22202633	Prefolding subunit 5	31,95
BC012542	GINS complex subunit 1 (Psf1 homolog)	30,53
AF411122	Importin 4	29,90
NM_002032	Ferritin, heavy polypeptide 1	26,00
NM_003777	Dynein axonemal heavy polypeptide 11	22,51
NM_014764	DAZ associated protein 2	21,23
NM_005828	WD repeat domain 68	20,30
NM_020147	THAP domain containing 10	19,37
D87682	KIAAA0241	19,17
NM_021974	Polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide F	18,48
NM_182476	Coenzyme Q6 homolog, monooxygenase (<i>S. cerevisiae</i>)	16,06
gi:17981857	ATP synthase f0 subunit 8	15,12
NM_002810	Proteasome (prosome, macropain) 26S subunit, non-ATPase, 4	13,89
NM_025000	Chromosome 2 open reading frame 37	13,39
NM_030782	Cisplatin resistance related protein CRR9p	12,71
NM_020414	Dead (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 24	12,11
BC013757	Leucine rich repeat containing 58	12,00
X61615	Leukemia inhibitory factor receptor	11,65
NM_001412	Eukaryotic translation initiation factor 1A, X-linked	11,13
NM_013449	Bromodomain adjacent to zinc finger domain, 2A	10,94
BC003418	Cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	10,54
NM_006098	Guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2-like 1	10,40
gi:17981865	Cytochrome b	10,04
NM_006589	Chromosome 1 open reading frame 2	9,57
NM_203453	Phosphatidic acid phosphatase type 2 domain containing 2	9,55
NM_053023	Zinc finger protein 91 homolog (mouse)	9,52
NM_001009570	Chaperonin containing TCP1, subunit 7 (eta)	9,37
NM_002137	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1	8,87
gi:17981856	Cytochrome oxidase subunit ii	8,86
NM_014399	Tetraspanin 13	8,75
NM_000318	Peroxisomal membrane protein 3, 35kDa (Zellweger syndrome)	8,08
	GENSCAN0000000030	7,86
BC014563	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	7,63
NM_003097	eIF-2B GDP-GTP exchange factor	7,63
NM_133374	Zinc finger protein 618	7,57
U52100	Epithelial membrane protein 2	6,80
NM_006003	Ubiquinol-cytochrome c reductase, Rieske iron-sulfur polypeptide 1	6,57
gi:17981858	ATP synthase 6	6,33
AF189062	LAG1 longevity assurance homolog 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	6,28
NM_014463	LSM3 homolog, U6 small nuclear RNA associated (<i>S. cerevisiae</i>)	5,82
NM_000859	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase	5,50
NM_003798	Catenin (cadherin-associated protein), alpha-like 1	5,24
NM_153811	Solute carrier family 38, member 6	5,22
NM_001017415	Ubiquitin specific peptidase 1	4,69
AF017456	Tripeptidyl peptidase I	4,42
NM_006912	Ras-like without CAAX1	4,38
NM_000026	Adenylosuccinate lyase	3,87
NM_004632	Death associated protein 3	3,02
NM_003747	Tankyrase, TRF1-interacting ankyrin-related ADP-ribose polymerase	2,28
NM_018266	Transmembrane protein 39A	2,09

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva expressão relativa à amostra controle.

Tabela 11 - Genes* hiper-expressos no espécime tumoral

Nº de acesso	Gene	ER*
NM_003613	Cartilage intermediate layer protein, nucleotide pyrophosphohydrolase	46,00
NM_018648	Nucleolar protein family A, member 3 (H/ACA small nucleolar RNPs)	23,28
NM_001786	Cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	22,35
NM_173540	Fucosyltransferase 11 (alpha (1,3) fucosyltransferase)	19,73
NM_000859	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase	14,60
NM_000254	5-methyltetrahydrofolate-homocysteine methyltransferase	11,91
NM_BC003418	Cyclic AMP phosphoprotein, 19 kD	10,54
NM_017969	IWS1 homolog (S. cerevisiae)	10,26
NM_199290	Nascent-polypeptide-associated complex alpha polypeptide-like	9,37
NM_000288	Peroxisomal biogenesis factor 7	8,08
NM_004772	Chromosome 5 open reading frame 13	7,56
gi:17981858	ATP synthase 6	7,43
NM_017734	Palmdelphin	6,63
NM_181893	Ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	6,56
NM_004048	Beta-2-microglobulin	5,95
NM_032383	Hermansky-Pudlak syndrome 3	5,53
NM_006083	IK cytokine, down-regulator of HLA II	5,53
NM_145808	Myotrophin	5,36
NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1	5,11
NM_015380	Sorting and assembly machinery component 50 homolog (S. cerevisiae)	4,28
NM_001018007	Tropomyosin 1 (alpha)	3,94
NM_003410	Zinc finger protein, X-linked	3,92
AB032945	Myosin VB	3,78
NM_017849	Transmembrane protein 127	3,71
NM_003274	Transmembrane protein 1	3,65
NM_020147	THAP domain containing 10	3,53
NM_001033059	Adenosylmethionine decarboxylase 1	3,51
NM_002468	Myeloid differentiation primary response gene (88)	3,42
NM_001762	Chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	3,37
NM_002046	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	3,35
NM_005382	Neurofilament 3 (150kDa medium)	3,30
NM_007175	SPFH domain family, member 2	3,20
23821015	Ras-associated protein RAP1	3,17
NM_005657	Tumor protein p53 binding protein, 1	3,13
NM_004423	Dishevelled, dsh homolog 3 (Drosophila)	3,10
NM_006164	Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	2,78
NM_003981	Protein regulator of cytokinesis 1	2,76
NM_006158	Neurofilament, light polypeptide 68kDa	2,67
NM_004946	Dedicator of cytokinesis 2	2,17
NM_182488	Ubiquitin specific peptidase 12	2,10

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva expressão relativa à amostra controle.

Tabela 12 - Genes* hipo-expressos nas células NCI-H295A

Nº de acesso	Gene	ER*
NM_005545	Immunoglobulin superfamily containing leucine-rich repeat	0,01
NM_199334	Thyroid hormone receptor, alpha (erythroblastic leukemia viral (v-ERB-A) oncogene homolog, avian)	0,01
NM_017849	Transmembrane protein 127	0,02
NM_006096	N-myc downstream regulated gene 1	0,02
NM_024079	Asparagine-linked glycosylation 8 homolog (S. cerevisiae, alpha-1,3-glucosyltransferase)	0,03
NM_014230	Signal recognition particle 68kDa	0,03
NM_031483	Itchy homolog E3 ubiquitin protein ligase (mouse)	0,03
NM_000949	Prolactin receptor	0,03
NM_000990	Ribosomal protein L27a	0,05
gi:17981855	Cytochrome c oxidase subunit I	0,05
NM_153812	PHD finger protein 13	0,05
NM_016594	ADP-ribosylation factor 3	0,05
NM_003079	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	0,05
NM_001033930	Ubiquitin A-52 residue ribosomal protein fusion product 1	0,07
gi:17981854	NADH dehydrogenase subunit 2	0,07
	3 beta-hidroxyesteroid dehydrogenase type 7	0,08
NM_002015	Forkhead box O1A (rhabdomyosarcoma)	0,08
NM_017747	Ankyrin repeat and KH domain containing 1	0,09
NM_006435	Interferon induced transmembrane protein 2 (1-8D)	0,09
NM_004048	Beta-2-microglobulin	0,10
NM_016594	FK506-binding protein 11 precursor	0,13
NM_006452	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	0,16
NM_014056	Cytoskeleton associated protein 5	0,19

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva expressão relativa à amostra controle.

Tabela 13 - Genes* hipo-expressos no espécime tumoral

Nº de acesso	Gene	ER*
NM_017954	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	0,09
NM_001024215	Filamin binding LIM protein 1	0,12
NM_001999	Fibrillin 2 (congenital contractural arachnodactyly)	0,12
NM_017736	THUMP domain containing 1	0,13
NM_002547	Oligophrenin 1	0,13
NM_000990	Ribosomal protein L27a	0,14
NM_006452	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase, phosphoribosylaminoimidazole succinocarboxamide synthetase	0,15
NM_005589	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	0,16
NM_007124	Utrophin (homologous to dystrophin)	0,18
NM_005803	Flotillin 1	0,21
gi:17981860	NADH dehydrogenase subunit 3	0,22
NM_004637	RAB7, member RAS oncogene family	0,24
NM-002955	Ras responsive element binding protein 1	0,25
NM_001002244	APC11 anaphase promoting complex subunit 11 homolog (yeast)	0,25
NM_014781	RB1-inducible coiled-coil 1	0,27
NM_016207	Cleavage and polyadenylation specific factor 3, 73kDa	0,29
NM_004510	SP110 nuclear body protein	0,30
NM_016422	Ring finger protein 141	0,30
NM_134324	Tar (HIV-1) RNA binding protein 2	0,31
NM_020193	Chromosome 11 open reading frame 30	0,32
AB032945	Myosin IF	0,38
gi:17981855	Cytochrome c oxidase subunit i	0,40

*Transcritos exônicos do DDRT-PCR e respectiva expressão relativa à amostra controle.

Tabela 14 - Transcritos intrônicos diferencialmente expressos (células NCI-H295A)

Hiper-expressos			Hipo-expressos		
Banda	Citobanda	ER*	Banda	Citobanda	ER*
NA10-4	1p31.1	7,05	AG50-5	1p32.3	0,05
NG53-2	1p35.1	5,23	AC1-4	1q21.3	0,03
NG9/11	1q21.3	26,93	AC2-8	2p21	0,08
NA53-8	1q44	15,53	AG50-15	2q33.3	0,04
NG53-16	2q22.1	37,36	AC3-1	3p25.1	0,03
NG1-6	2q22.3	4,95	AG10-2	3p25.3	0,20
NA50-13	2q34	8,27	AC3-5	3q21.3	0,05
NA50-8	3p12.2	5,94	AC3-12	3q25.1	0,05
NC9/7	4p15.33	24,71	AG53-2	3q26.31	0,11
NA10-7	5p14.1	27,08	AC1-13	7p14.3	0,09
NC9/13	5p15.33	12,71	AG50-3	7q11.21	0,07
NA3-2	5q23.2	15,22	AG50-1	7q22.3	0,15
NC1-9	5q31.2	20,08	AC1-11	7q31.1	0,04
NG50-12	6p21.33	133	AG50-4	8q22.3	0,15
NG50-11	C6_QBL	15,03	AC2-3	9q34.3	0,08
NG7/7	7p14.1	10,22	AG10-15	10p12.1	0,01
NA10-11	7p15.1	25,44	AC2-11	12p13.31	0,07
NG1-12	7p22.1	4,65	AC2-9	12q13.3	0,05
NG2-4	7q11.22	3,78	AC2-6	12q21.2	0,06
NG50-19	8p11.21	42,12	AG10-5	13q12.11	0,08
NG50-13	8p12	12,31	AG50-11	15q15.1	0,02
NA50-7	8q12.2	6,78	AC1-8	16p12.1	0,05
NG10-5	8q24.3	4,2	AG1-3	17q21.33	0,39
NA10-5	9q34.1	11,47	AG10-8	Yp11.2	0,09
NG2-3	9q34.11	6,42			
NG10-13	12q22	6,31			
NG53-4	12q23.1	19,8			
NA10-9	14q23.1	15,77			
NG53-6	15q21.3	8,37			
NG7/15	16q24.1	54,20			
NA10-10	22q13.2	53,52			
NG2-1	Xp22.12	5,01			
NA10-8	Xq23.1	8,75			

Transcritos intrônicos do DDRT-PCR: respectivas localização cromossômica e expressão relativa à amostra controle (*ER).

Tabela 15 - Transcritos intrônicos diferencialmente expressos no espécime tumoral

Hiper-expressos			Hipo-expressos		
Banda	Citobanda	ER*	Banda	Citobanda	ER*
TG2-6	1p35.3	9,06	PC1-2	1p36.11	0,32
TA4-33	1q21.2	9,58	PC2-2	1p36.21	0,19
TC1-21	1q32.1	3,24	PC1-6	1q32.1	0,09
TG4-13	1q32.3	4,64	PC4-4	1q41	0,34
TG2-3	1q42.13	14,54	PC4-5	2p15	0,29
TC1-18	2p13.2	7,25	PC2-8	3p24.3	0,28
TC1-26	2p14	7,45	PC3-1	3p25.1	0,14
TA4-25	2p22.1	4,12	PA3-3	3q23	0,26
TA4-7	2q21.1	8,15	PG2-21	4q35.1	0,47
TG4-29	2q21.3	29,06	PC1-4	5p13.2	0,47
TG1-3	2q22.3	4,02	PA3-9	5q23.1	0,30
TA4-27	2q24.1	8,70	PC1-3	6q14.1	0,01
TA1-8	2q31.2	2,28	PG2-6	7p22.1	0,07
TG4-21	2q32.3	2,10	PG2-30	8p23.1	0,10
TG3-9	3p cent	2,24	PC4-11	8q21.3	0,03
TC4-16	3p13	7,00	PG2-38	8q24.12	0,11
TC1-20	3p14.3	9,33	PA2-9	10q21.2	0,25
TC4-18	3p21.1	6,01	PC4-1	12q13.2	0,19
TC1-11	3p21.1	3,10	PC1-5	13q14.11	0,37
TG4-18	3p21.1	3,03	PC2-7	13q14.11	0,30
TG4-12	3p21.31	5,85	PA2-5	15q24.1	0,26
TC2-18	3q13.13	2,65	PC3-7	16q22.3	0,4
TG4-22	3q25.1	3,08	PC2-9	16q24.1	0,05
TC2-19	3q26.1	4,50	PC2-3	17p11.2	0,23
TG4-9	3p26.3	2,00	PC2-5	17q21.33	0,16
TG4-11	3q26.33	8,47	PA2-6	19p13.12	0,29
TC1-37	4p15.2	4,50	PG2-7	19p13.2	0,09
TC1-12	4p16.1	2,39	PA2-6	19p13.2	0,29
TG1-13	4p16.3	5,10	PA1-1	21q22.12	0,09
TG4-19	4q26	14,08	PA3-1	22q13.2	0,30
TG4-5	4q31.21	3,79			
TA4-20	4q32.1	6,97			
TC1-40	4q34.3	7,67			
TC4-4	5p15.33	65,50			
TC1-7	5q23.2	8,29			
TA4-15	6p21.1	3,09			
TA1-9	6p21.2	2,72			
TC4-11	6q21	3,29			
TG3-2	6q22.31	10,58			
TC1-41	7p15.3	2,94			
TA4-34	7p21.3	2,19			
TC1-42	7q31.33	5,79			
TC1-16	7q33	4,62			
TG3-10	8p11.21	4,60			
TC2-8	8p12	2,00			
TC4-19	8q11.21	2,70			

Transcritos intrônicos do DDRT-PCR: respectivas localização cromossômica e expressão relativa à amostra controle (*ER).

Tabela 15 (continuação) - Transcritos intrônicos diferencialmente reguladas no espécime tumoral

Hiper-expressos

Banda	Citobanda	ER*
TC4-10	8q22.1	12,65
TG3-5	8q24.22	5,11
TA4-4	9q22.33	6,90
TA4-28	9q34.11	2,55
TG4-14	10q22.1	2,62
TC4-27	10q24.32	4,75
TC4-1	10q25.2	2,91
TG2-9	10q26.2	3,15
TA4-31	11p11.2	2,01
TC1-30	11p15.4	3,88
TC4-23	11q11.2	9,76
TC1-31	11q12.1	9,22
TC1-32	12p13.2	7,56
TC1-19	12q12	7,25
TG4-25	12q13.2	13,24
TC2-5	12q21.2	4,59
TC4-21	12q21.2	2,41
TG4-20	12q23.2	4,05
TA4-38	12q24.22	6,33
TA4-6	13q12.3	39,64
TA1-4	13q14.2	3,67
TG4-27	13q32.1	3,67
TC3-1	13q32.2	6,43
TC1-8	14q11.2	2,15
TA4-19	15q11.2	10,37
TA4-10	15q15.3	3,13
TC4-14	15q15.3	5,55
TC2-7	15q21.3	3,33
TC4-13	16q23.1	5,55
TG2-10	18q12.3	2,49
TC4-9	18q21.23	2,17
TA2-9	19p12	8,21
TG4-26	19p13.11	9,47
TA4-13	19p13.2	15,70
TC2-16	19q12	3,78
TA4-21	20p12.3	5,18
TA2-1	20q13.12	2,00
TC2-12	22q12.2	5,05
TC1-13	Xp11.22	2,28
TA4-26	Xq28	14,17

Transcritos intrônicos do DDRT-PCR: respectivas localização cromossômica e expressão relativa à amostra controle (*ER).

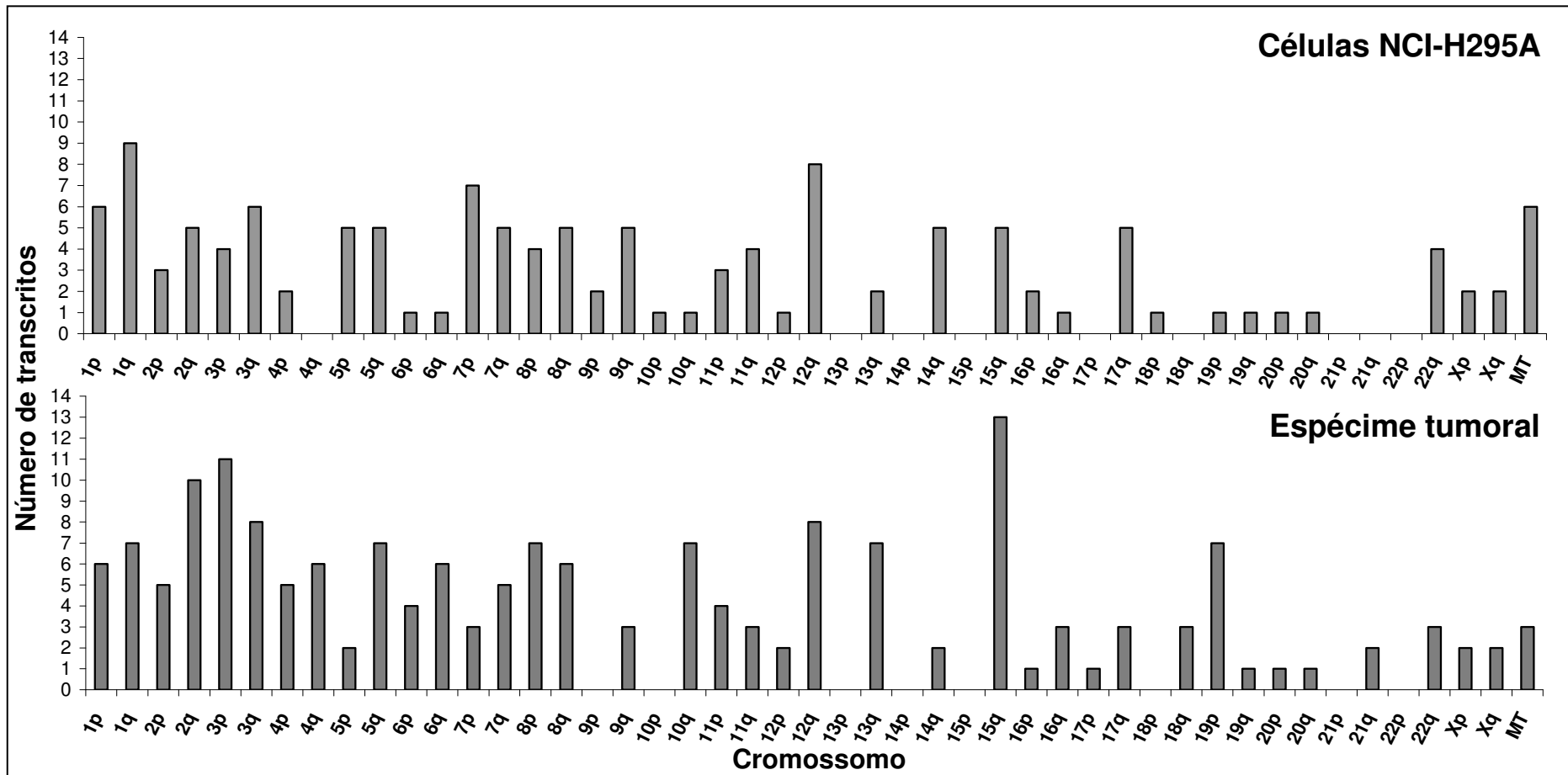


Figura 6 - Distribuição dos transcritos nos cromossomos.

Os transcritos com expressão aumentada ou diminuída nas células NCI-H295A ou no espécime tumoral, comparados com o controle de adrenal normal, foram analisados quanto a sua distribuição nos cromossomos humanos.

MT = mitocondrial; p = braço curto; q = braço longo.

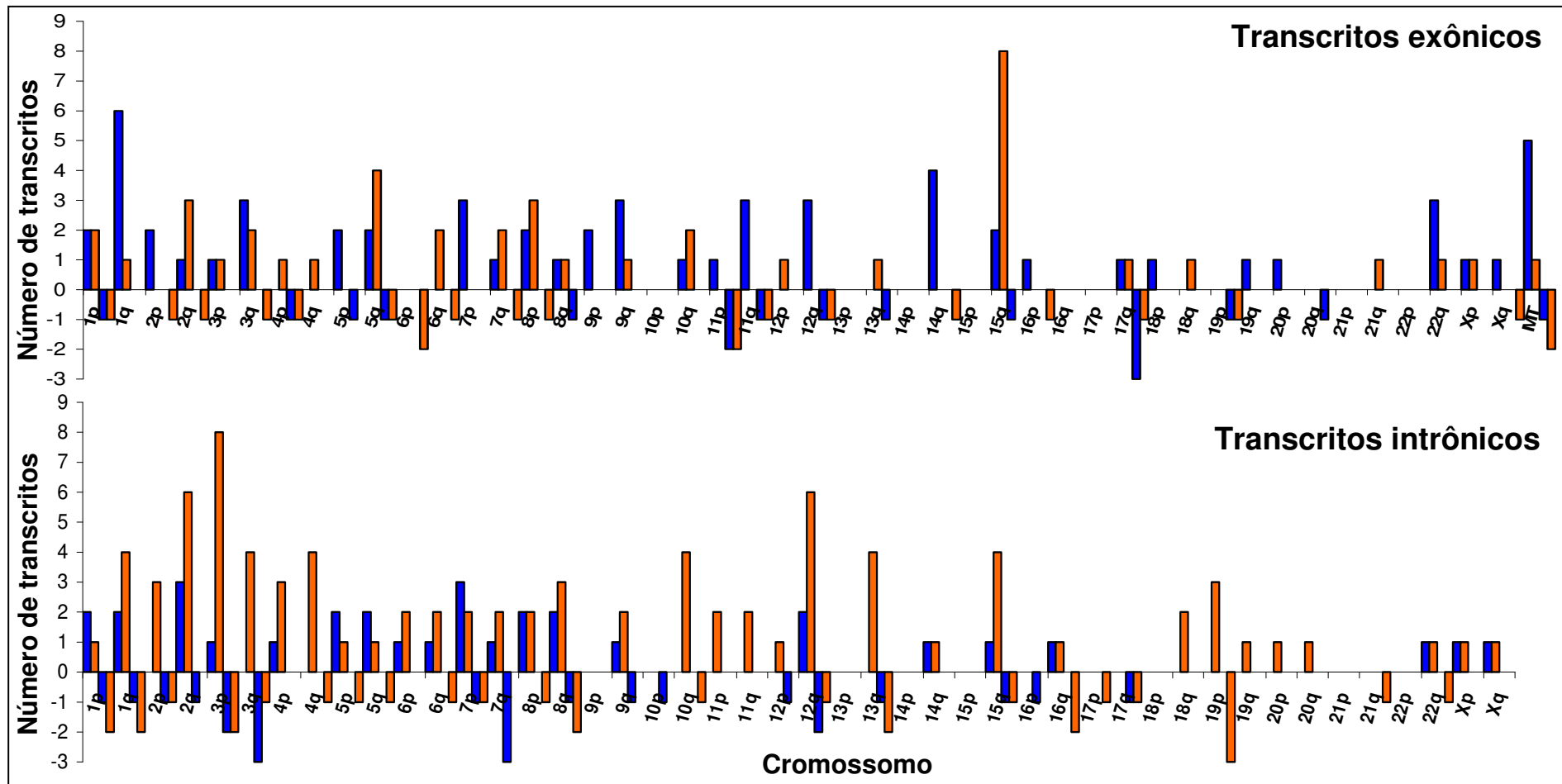


Figura 7 - Distribuição dos transcritos nos cromossomos.

Cromossomos representados pelos transcritos exônicos e intrônicos, com expressão aumentada (valores positivos) ou diminuída (valores negativos) nas células NCI-H295A ou no espécime tumoral, em relação ao controle de adrenal normal.

■ = Células NCI-H295A; ■ = Espécime tumoral; MT = mitocondrial; p = braço curto; q = braço longo.

As seqüências intrônicas foram notadamente representadas na amostra do tumor da paciente, entre os transcritos hiper-expressos (Figura 7, Tabela 5). O cromossomo 3 foi o mais representado, com 21/172 seqüências, 13 na região 3p e 8 na 3q. As regiões 1q, 2q, 8q, 12q e 15q também foram significativamente representadas (Figura 7). Aproximadamente dois terços dos transcritos hiper-expressos na amostra do tumor da paciente corresponderam a regiões intrônicas. Em oposição, um terço dos transcritos hiper-expressos obtidos a partir das células NCI-H295A eram de regiões intrônicas. Esta distribuição peculiar não foi observada entre os transcritos hipo-expressos (Figura 7, Tabela 5).

4.3 Significado funcional dos genes diferencialmente expressos

Esta análise considerou apenas os genes para os quais foram obtidos transcritos correspondentes a regiões exônicas.

A anotação funcional dos genes diferencialmente expressos permitiu a separação dos mesmos em diversas categorias funcionais (Figuras 8 e 9). Um número expressivo de genes não foi pôde ser classificado através do sistema adotado pelo Gene Ontology (função desconhecida). Esta categoria foi a mais abundantemente representada pelos genes hiper-expressos tanto nas células NCI-H295A quanto no tumor da paciente. As duas amostras também apresentaram maior expressão de genes envolvidos com motilidade celular, via de sinalização do Wnt, importação de glicose/neoglicogênese e biossíntese do colesterol (Figura 8A e 8B).

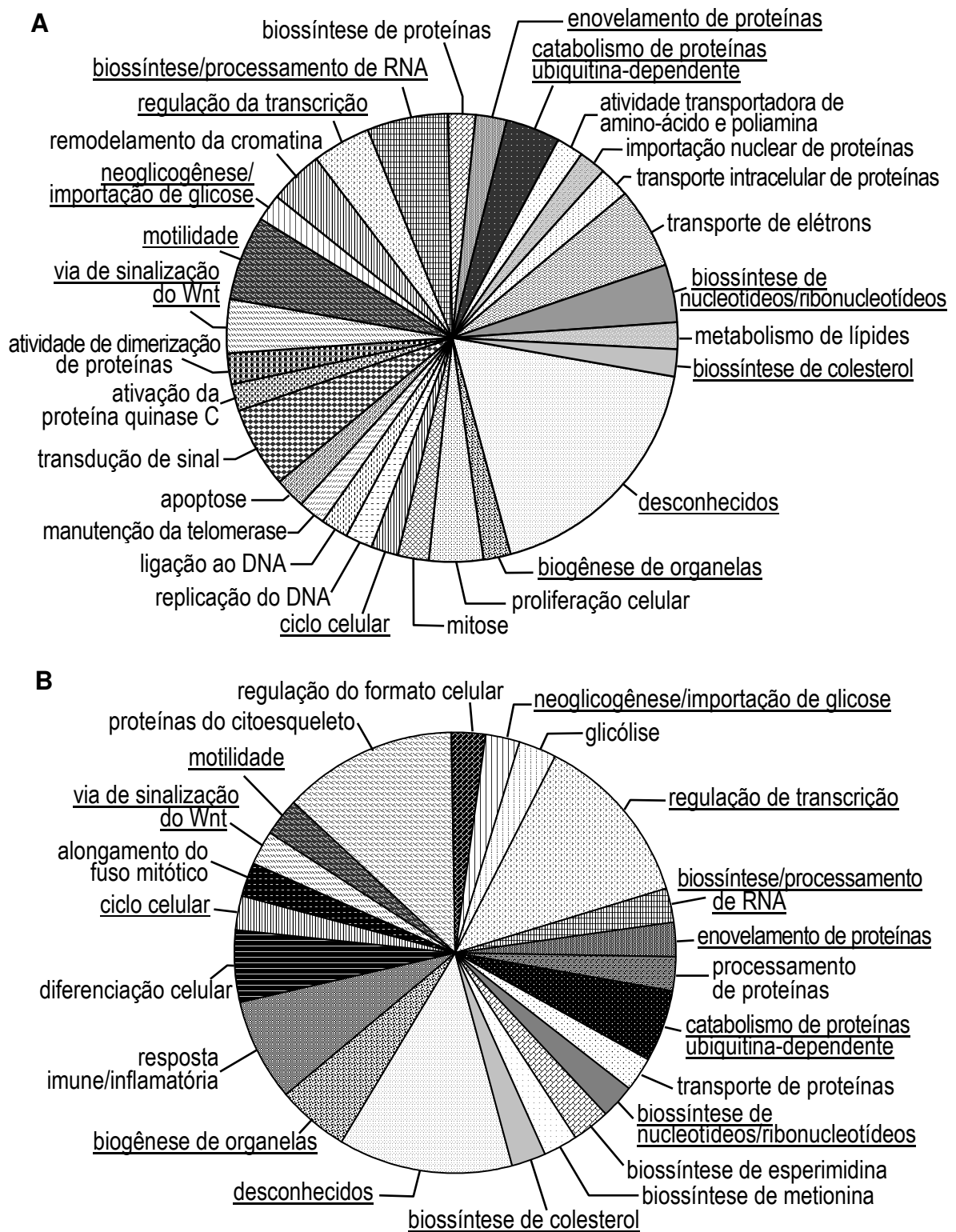


Figura 8 - Grupos funcionais - genes hiper-expressos

Os genes hiperexpressos nas células NCI-H295A (**A**) e no tumor da paciente (**B**) foram classificados através do sistema adotado pelo Gene Ontology (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). As categorias representadas nas duas amostras neoplásicas foram sublinhadas.

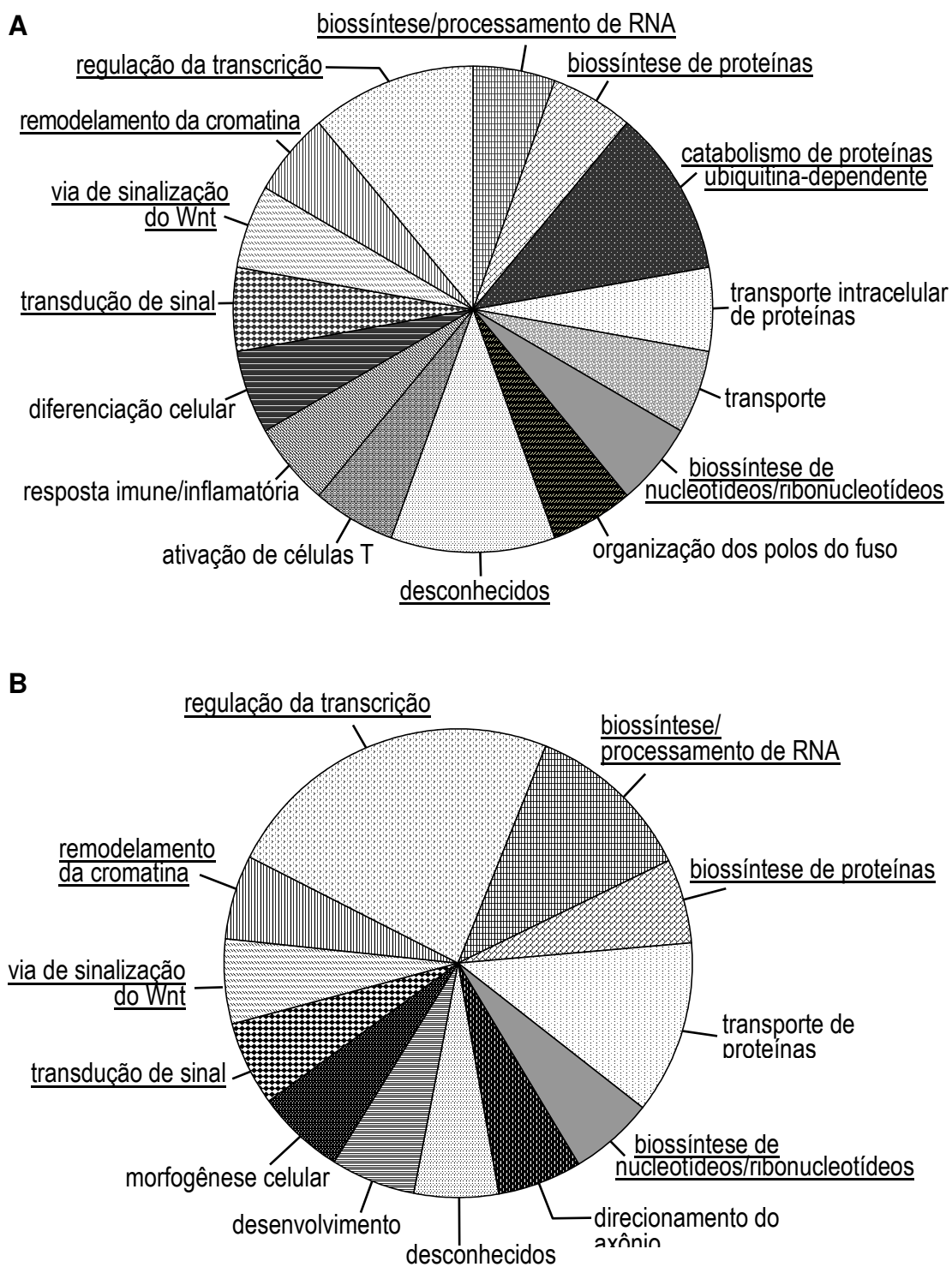


Figura 9 - Grupos funcionais - genes hipo-expressos

Os genes hiperexpressos nas células NCI-H295A (**A**) e no tumor da paciente (**B**) foram classificados através do sistema adotado pelo Gene Ontology (<http://david.abcc.ncifcrf.gov>). As categorias representadas nas duas amostras neoplásicas foram sublinhadas.

Os transcritos cuja expressão estava reduzida tanto nas células NCI-H295A quanto no tumor da paciente produziram um número bem menor de categorias funcionais, comparado ao dos hiper-expressos (Figuras 8 e 9). Nas duas amostras houve diminuição da expressão de genes envolvidos na regulação de transcrição, no remodelamento da cromatina e na biossíntese/processamento de RNA (Figuras 8 e 9). Em geral foi observado um número menor de transcritos nas amostras tumorais, em comparação ao controle de adrenal normal.

4.4 Genes com participação potencial na tumorigênese da adrenal

Neste estudo detectamos inúmeros transcritos hiper- ou hipo-expressos nas amostras neoplásicas (células NCI-H295A e tumor da paciente) em relação ao controle de adrenal normal (Tabelas 6 a 15). Dentre eles podemos destacar alguns exemplos para cujos genes correspondentes já existe relato de participação em processos biológicos que conferem fenótipo maligno a neoplasias em outros tecidos.

Dois genes associados ao desenvolvimento de resistência a tratamentos anti-tumorais encontraram-se hiper-expressos nas células NCI-H295A: *TYMS*, que codifica a timidilato sintetase, e *CRR9*, gene da proteína relacionada à resistência à cisplatina. A cisplatina, um agente que causa danos ao DNA, é amplamente utilizado em tratamentos quimioterápicos^[116].

Níveis aumentados de transcritos da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) foram detectados na amostra do tumor da paciente. Além do seu conhecido papel na via glicolítica, esta enzima está envolvida em outros processos biológicos, tais como brotamento do microtúbulo, apoptose, exportação de RNA do núcleo, replicação e reparo do DNA^[117].

A 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (HMGCoA redutase) é responsável pela síntese do mevalonato, sendo este o primeiro passo da biossíntese do colesterol. Esta via também participa dos processos de farnesilação e isoprenilação de proteínas. A expressão do seu gene (*HMGCR*) encontrou-se aumentada nas duas amostras neoplásicas.

4.5 Expressão dos genes *BCSC-1* e *FUT11* em tumores adrenocorticais

Os genes *BCSC-1* e *FUT11* (fucosiltransferase 11) foram selecionados para verificação de sua expressão em diversos tumores de córtex da supra-renal. O *BCSC-1* foi apontado em um experimento piloto do DDRT-PCR, tendo sido selecionado por seu possível papel como supressor tumoral em vários tipos de tumores sólidos^{[113], [118]}. O *FUT11*, por sua vez, é uma fucosiltransferase, enzima responsável pela síntese de glicanos fucosilados, os quais possuem um papel importante em diversos eventos, incluindo adesão leucócito-endotélio, interação microorganismo-hospedeiro e câncer^[114]. A hiper-expressão das fucosiltransferases nas células tumorais resulta em aumento de glicanos fucosilados e, conseqüentemente, da sua

capacidade de adesão às células endoteliais, facilitando sua disseminação^[119].

A abundância dos transcritos de *BCSC-1* e *FUT11* foi avaliada em 19 tumores adrenocorticais, provenientes de 10 adultos (tumores benignos e malignos) e 9 crianças (tumores localizados e disseminados/recorrentes) (Figuras 10A e 10B).

No grupo dos adultos foi observada a perda da expressão do *BCSC-1* nos tumores malignos, em relação aos tumores benignos: Média_{benignos} = $681,9 \pm 501,1$ x Média_{malignos} = $161,9 \pm 115,2$ ($p = 0,019$). Esta diferença não foi encontrada no grupo das crianças, quando os tumores localizados foram confrontados com os disseminados/recorrentes: Média_{localizados} = $201,7 \pm 120,0$ x Média_{disseminados/recorrentes} = $177,8 \pm 85,9$ ($p = 0,905$) (Figura 10A).

Por sua vez a expressão do *FUT11* permitiu separar as neoplasias do grupo pediátrico, sendo significativamente maior nos tumores disseminados/recorrentes: Média_{localizados} = $547,4 \pm 302,2$ x Média_{disseminados/recorrentes} = $1.510,5 \pm 526,7$ ($p = 0,065$). Esta distinção não ocorreu no grupo dos adultos: Média_{benignos} = $653,9 \pm 236,3$ x Média_{malignos} = $698,7 \pm 335,2$ ($p = 0.609$) (Figura 10B).

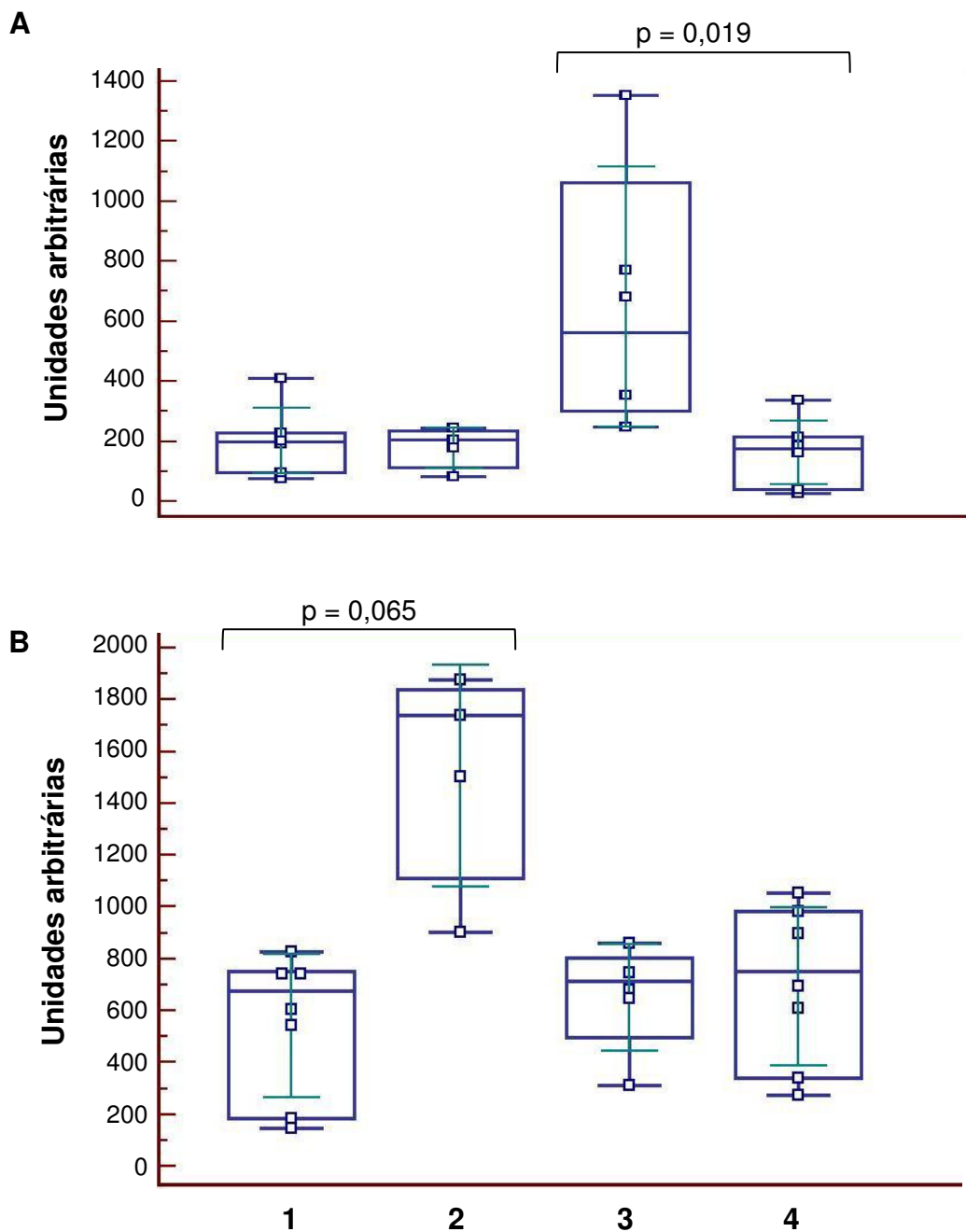


Figura 10 - Expressão dos genes BCSC-1 e FUT11 em tumores adrenocorticais

A expressão dos genes BCSC-1 (**A**) e FUT11 (**B**) foi avaliada em 19 tumores adrenocorticais, através de RT-PCRs semi-quantitativas. A expressão de um transcrito de ciclofilina foi adotada para normalização. Tumores: 1 = criança localizado; 2 = criança recorrente/metastático; 3 = adulto benigno; 4 = adulto maligno.

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

As metodologias que abordam globalmente o genoma tornaram-se estratégias padrão em muitas áreas da Biologia. Embora a genética clássica, focada em um ou poucos genes, tenha sido bem sucedida em dissecar doenças moleculares que são afetadas por ganho ou perda de função de uma proteína codificada por um único gene, tal abordagem provou ser menos frutífera para o entendimento de doenças controladas por muitos genes^[93]. Até o momento existem apenas alguns poucos perfis de transcrição de neoplasias adrenocorticais^{[100], [101], [102], [103]}. O presente estudo revelou vários genes que sabidamente conferem fenótipo maligno a neoplasias de outros tecidos, cujo envolvimento no carcinoma adrenocortical não havia sido suspeitado até o presente momento, enriquecendo assim o conhecimento da Biologia desta condição rara e agressiva.

Em comparação ao “microarray” de cDNAs, que possibilita a análise em paralelo da expressão de milhares de genes, o DDRT-PCR é um procedimento trabalhoso e demorado. É, no entanto, uma estratégia importante no estudo de fenômenos oncológicos uma vez que o DDRT-PCR não depende do conhecimento prévio da composição de mRNA, sendo assim mais apropriado para a descoberta de novos transcritos. Outra vantagem do DDRT-PCR é a pequena quantidade de RNA de cada amostra necessária para a realização do experimento. O poder do DDRT-PCR como ferramenta para a descoberta de novos transcritos é confirmado pelo número de transcritos únicos sobre os quais não há virtualmente nenhuma

informação disponível (Figuras 8 e 9). A principal desvantagem do DDRT-PCR, além da demanda de tempo e trabalho, é o fato do DDRT-PCR não ser um método quantitativo, exigindo assim experimentos independentes confirmatórios que validem e quantifiquem a intensidade da diferença de expressão.

Para compararmos o transcrito representativo do carcinoma do córtex adrenal com transcrito de adrenal não neoplásico (controle) adotamos as células NCI-H295A por esta ser uma linhagem celular estabelecida e bem caracterizada e pela disponibilidade virtualmente ilimitada de material. Por CGH Dohna et al. identificaram nas linhagens de células de carcinoma da supra-renal (SW13 e NCI-H295) as mesmas alterações citogenéticas encontradas nas amostras de tumor, o que reforça a nossa posição de usar linhagens de células tumorais como protótipo do tumor de interesse^[34].

Na seleção de bandas do gel de DDRT-PCR a serem analisadas abrimos mão, por vezes, daquelas com altos valores absolutos de DO, em prol de outras com menor intensidade (mas com maior diferença entre as amostras tumorais e controle). Esta abordagem nos permite concentrar esforços na caracterização da parte mais interessante do transcrito - a de maior complexidade em espécie mas que ocupa uma fração menor da massa total - em oposição àquela mais simples, correspondente à porção maior da massa de transcritos^[120].

Neste estudo foi recuperado um número considerável de transcritos diferencialmente expressos das amostras de NCI-H295A e do tumor. Estes

representaram quase todos os cromossomos (Figuras 6 e 7), indicando que a combinação de “primers” adotada neste estudo foi aparentemente suficiente para fornecer um panorama representativo das alterações no perfil transcricional das neoplasias adrenocorticais.

Vários estudos citogenéticos realizados com diferentes séries de tumores mostraram alterações genéticas freqüentes nas neoplasias do córtex da supra-renal^{[32], [33], [34], [35]}. Muitos dos transcritos identificados no nosso estudo mapearam em regiões cromossômicas cuja amplificação ou deleção em carcinomas adrenocorticais é conhecida (Tabela 1).

O cromossomo 15 albergou o maior número dos transcritos hiper-expressos, principalmente aqueles provenientes do tumor da paciente. Adicionalmente, vários genes hiper-expressos mapearam na região cromossômica 5q13.3-5q35.3, incluindo o gene da 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A redutase (*HMGCR*). Ganhos em ambos os cromossomos 15 e 5 já foram relatados^{[33], [36]}. Este último cromossomo é um dos principais alvos de amplificações nos carcinomas adrenocorticais^{[32], [33], [34], [35]} (Tabela 1).

Os cromossomos mais representados pelos transcritos hiper-expressos das células NCI-H295A foram 1q e 14q. Nove transcritos identificados no braço 1q estão concentrados em um curto segmento, entre 1q21 e 1q22. Dohna et al.^[34] mostraram elevada amplificação da região 1q22-q25 na linhagem de células NCI-H295 e em dois tumores do córtex da supra-renal^[34].

Seis transcritos que apresentaram expressão aumentada mapearam no cromossomo 9q, entre as regiões 9q22.33 e 9q34.11. Esta região foi alvo de amplificação em tumores estudados por CGH^{[32], [33], [34], [36]}.

O cromossomo 17q foi o mais representado pelos transcritos hipo-expressos nas células NCI-H295A. Pinto et al.^[56] construíram um mapa de deleção do cromossomo 17 a partir de 30 tumores adrenocorticais. Em 18 dessas amostras foi observada a perda de todo o cromossomo 17. Entre estes tumores apenas os carcinomas exibiram a perda concomitante dos cromossomos 2, 9 e 11. Este fato sugere a deleção do cromossomo 17 como sendo um evento precoce na tumorigênese da supra-renal, ao contrário do proposto por Zhao et al., os quais defendem que ganhos no 17p e 17q são importantes para o início da transformação maligna dos tumores adrenocorticais. O fato de não termos observado um aumento da representação de transcritos do 17p entre os hipo-expressos pode ser apenas reflexo das combinações de “primers” que foram utilizadas neste estudo. Também nos chamou a atenção o mapeamento de alguns dos genes hipo-expressos na região 11p15-p15.5. A perda de quase todo o braço curto do cromossomo 11 foi apontada por Dohna et al.^[34], inclusive nas células NCI-H295 e em diversos tumores. Nos carcinomas do córtex da supra-renal é freqüente a ocorrência de LOH e alterações epigenéticas nesta região^{Gicquel2001}, que resultam na hiper-expressão do *IGF2* e silenciamento dos genes *H19* e *p57kip2* (envolvidos no controle do ciclo celular).

A coincidência das regiões cromossômicas mais representadas no nosso estudo com regiões conhecidas por sofrerem rearranjos

cromossômicos respalda a suposição de que a hiper/hipo-expressão de tais genes possa resultar de desbalanços cromossômicos.

Nós encontramos um número considerável de transcritos que mapearam em regiões intrônicas, particularmente aqueles hiper-expressos no tumor da paciente (Tabela 5, Figura 7). A presença de seqüências intrônicas hiper- ou hipo-reguladas nas nossas amostras pode ser justificada por falha na maquinaria de processamento (“splicing”) ou por acúmulo excessivo de RNAs regulatórios, possivelmente codificados por tais regiões intrônicas, cuja expressão alterada poderia indicar mudanças na biologia das células NCI-H295A e do espécime tumoral analisado. A associação entre “splicing” alternativo e transformação celular, bem como o envolvimento da alteração dos fatores de “splicing” já foi relatada^[121]. Os RNAs não codificantes (ncRNAs) desempenham várias funções nas células eucarióticas^{[122], [123]}, incluindo os microRNAs na regulação de genes^[124]. bem como o envolvimento de ncRNAs longos no controle transcricional ou pós-transcricional da expressão gênica^[125]. A abundância de ncRNAs longos já foi correlacionada com o grau de malignidade no câncer da próstata^[126]. Transcritos não codificantes mapeiam total (TIN) ou parcialmente (PIN) nas regiões intrônicas de três quartos de todos os genes depositados em bancos públicos de seqüências^[127]. A análise por “microarray” de 7.135 RNAs TIN (“sense” e “antisense”), paralelamente às seqüências exônicas dos genes codificadores correspondentes identificou padrões de “expressão intrônica” com funções regulatórias distintas. Os resultados indicaram que os RNAs

intrônicos devem regular o padrão de uso dos genes para codificação de suas proteínas.

A contaminação inadvertida das preparações de RNA com DNA genômico, por tratamento inadequado com DNase I, foi descartada uma vez que as PCRs realizadas com as amostras não submetidas a transcrição reversa não geraram a banda esperada nos géis de agarose. O fato do número de transcritos intrônicos para cada cromossomo não ser proporcional ao número de transcritos exônicos (Figura 7) também indica que as seqüências obtidas neste estudo são originadas de moléculas de RNA.

Curiosamente a proporção entre transcritos intrônicos e exônicos nas amostras de células NCI-H295A foi significativamente diferente da do tumor da paciente, mas apenas entre os hiper-expressos (Tabela 5). Esta distribuição peculiar, não observada entre os transcritos hipo-expressos, pode estar relacionada à origem das amostras. As células cultivadas crescem em um substrato plástico e não estão rodeadas por estroma, ao contrário do tumor. Além disso, a hipóxia local, fenômeno que pode ocorrer na intimidade do tecido tumoral *in vivo*, é virtualmente inexistente em uma cultura celular.

A análise dos transcritos hiper- e hipo-expressos nas amostras neoplásicas quanto às suas características funcionais (Figura 8 e 9) destacou vários processos biológicos que podem ser relevantes para o estabelecimento e desenvolvimento do câncer do córtex da supra-renal. Várias categorias foram contempladas nas duas amostras tumorais. Estas

similaridades devem corresponder a aspectos comuns às neoplasias malignas do córtex adrenal, enquanto as diferenças podem ser reflexo das peculiaridades biológicas de cada amostra. Uma das categorias destacada nesta comparação é a motilidade celular (Figura 8), o que pode refletir a importância desta capacidade na iniciação da disseminação tumoral (ver adiante). De fato, as células NCI-H295A foram colhidas do fluido ascítico de uma pessoa que veio a óbito em decorrência de um carcinoma adrenocortical. Da mesma forma, a paciente que forneceu a amostra de tecido tumoral apresentou metástases nos pulmões e no fígado^[109]A ativação da importação de glicose e da neoglicogênese, nas duas amostras, indica um incremento na demanda de substrato energético, o que é esperado para células em proliferação.

A via de sinalização do Wnt dependente de β -catenina também foi representada com transcritos hiperexpressos nas duas amostras, o que sugere sua relevância na tumorigênese adrenocortical. A β -catenina exerce na célula tanto função estrutural (adesão celular) quanto transcricional. Esta última é acionada quando o Wnt se liga ao receptor "Frizzled" (Fz) e recruta a proteína "dishevelled" (Dvl) para a membrana, resultando na estabilização da β -catenina citoplasmática (Figura 11). Nesta condição a β -catenina é translocada para o núcleo, onde se liga a fatores de transcrição, regulando a expressão de genes envolvidos no ciclo celular, adesão e apoptose^{[128], [129]}. Alterações genéticas nesta via foram encontradas em vários tipos de câncer^[130]. Tissier et al.^[131] mostraram que a β -catenina está freqüentemente mutada tanto em tumores do córtex adrenal benignos como malignos e

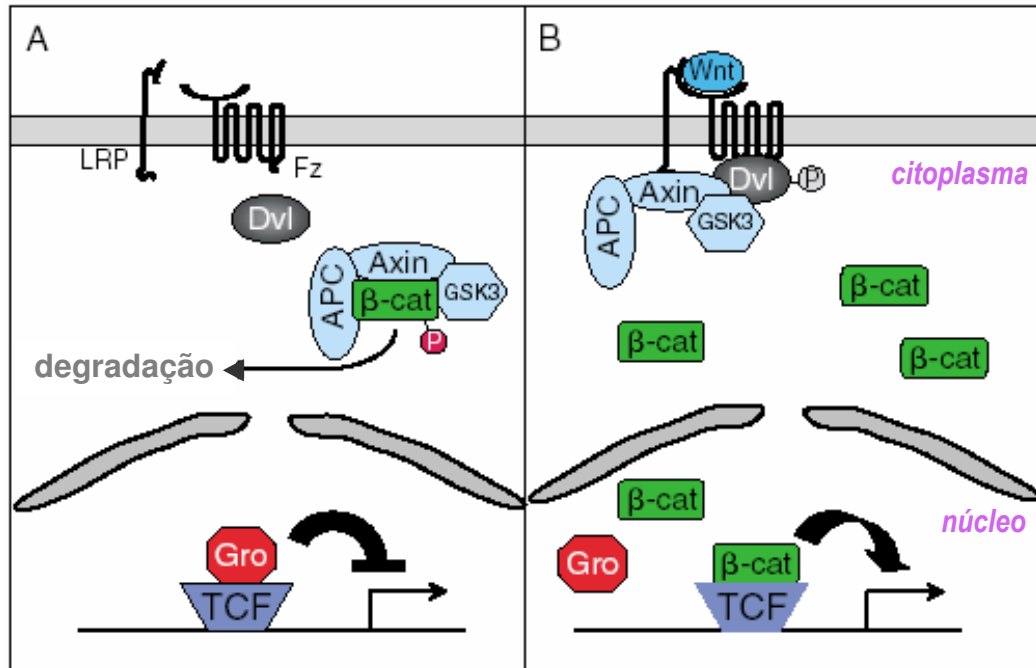


Figura 11 - Esquema representativo da via Wnt/β-catenina

A) Na ausência de Wnt a β-catenina citoplasmática é fosforilada por um complexo contendo axina, “adenomatosis polyposis coli (APC) e “glycogen synthase kinase 3” (GSK3), sendo destinada a degradação no proteassoma. No núcleo, proteínas da família “T-cell factor” (TCF) reprimem os genes alvo do Wnt. **B)** A ligação do Wnt aos receptores “Frizzled” e “low-density-lipoprotein-related protein” (Fz-LRP) resulta na ativação da “Dishevelled” (Dvl) e consequente inativação da GSK3. A β-catenina acumula-se no citoplasma e segue ao núcleo onde ativa a transcrição de genes pelo TFC. Modificado de Cadigan, 2006^[132].

sugerem que outras alterações possam estar envolvidas no acúmulo substancial e freqüente da β -catenina nos carcinomas. Em nosso estudo encontramos a hiperexpressão do gene *DVL3*. A expressão aumentada de proteínas da família Dvl já foi correlacionada com malignidade de neoplasias de outros tecidos^{[133], [134], [135]}.

O gene da HMGCoA redutase (*HMGCR*) encontrou-se hiper-expresso nas células NCI-H295A e no tumor da paciente. Células malignas apresentam alta demanda de colesterol e vários estudos demonstram que células tumorais capturam lipoproteínas ricas em colesterol mais eficientemente que os tecidos normais^[136]. Evidências sugerem que tanto em estágios pré-malignos quanto malignos há perda do controle por retroalimentação da via do mevalonato^{[137], [138]}. Em um estudo de lesões císticas apócrinas de mama Celis et al. constataram a expressão da HMGCoA redutase exclusivamente nas células malignas em comparação às não malignas^[139]. Em comparações recentes de macrocistos apócrinos de mama, tecido normal de mama e tumor de mama, através de técnicas proteômicas, foi detectada uma atividade aumentada e desregulada do HMGCoA, tanto em lesões apócrinas precoces quanto avançadas, mas não no tecido normal^[140]. A atividade desta redutase em células leucêmicas^{[141], [142]} e células de carcinoma de pulmão^[143] está 3-8 vezes e 2 vezes aumentada, respectivamente, em relação às células normais^[137]. A detecção de níveis aumentados de HMGCoA redutase nas nossas amostras sugere que a biossíntese de colesterol, a farnesilação e a isoprenilação de proteínas possam ter um papel relevante na tumorigênese adrenocortical.

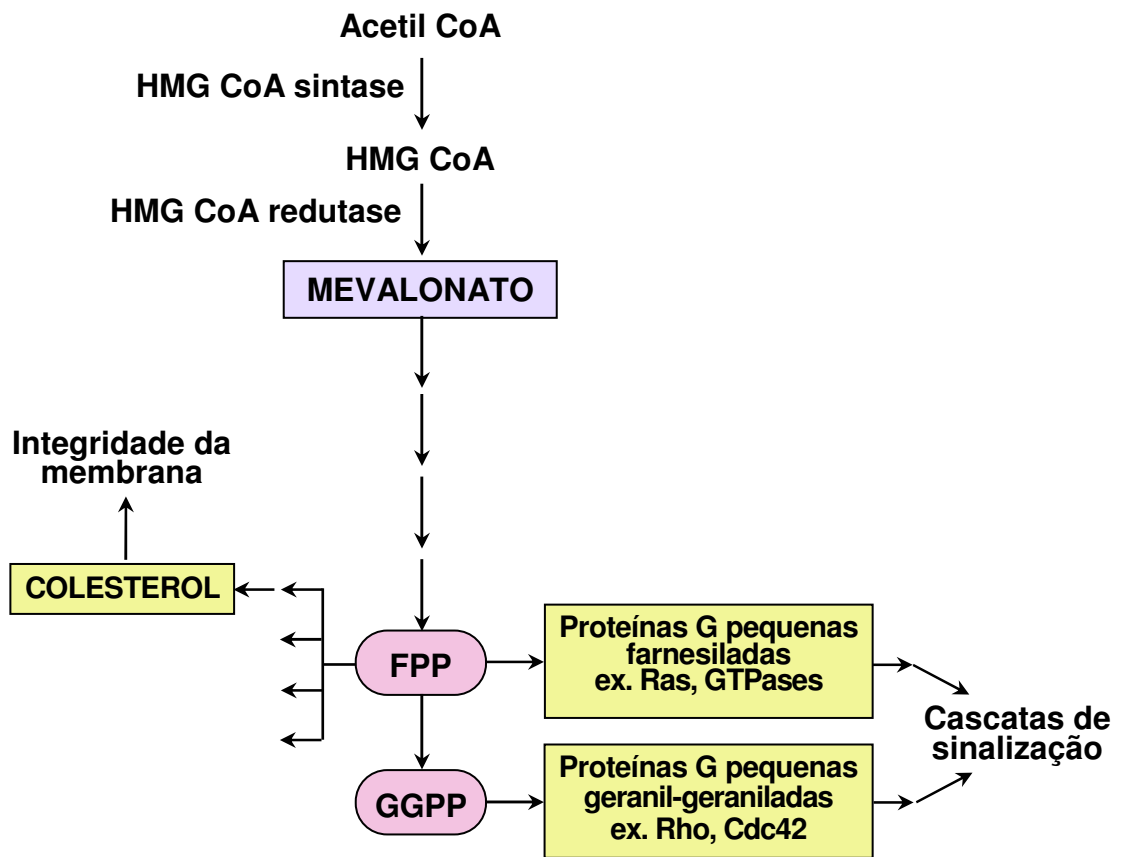


Figura 12 - Esquema representativo da via do mevalonato

O mevalonato é a via precursora do colesterol e isoprenóides. A prenilação de proteínas pode ser seguida de processamentos adicionais, essenciais para sua correta associação à membrana celular. Adaptado de McTaggart, 2006^[144] e Graaf et al, 2004^[145].

FPP = farnesil pirofosfato, GGPP = geranylgeranyl pirofosfato.

A ativação da biossíntese de colesterol nas células NCI-H295A e no tumor pode estar relacionada a alterações de vias proliferativas, em diferentes níveis. A 3-hidroxi-3-metilglutaril-coenzima A (HMGCoA) redutase é a enzima responsável pela síntese do mevalonato, primeiro passo na biossíntese do colesterol. O colesterol está presente nas balsas de lípidos (“lipid rafts”) - domínios da membrana celular enriquecidos em lípidos e proteínas^[146]. Essas estruturas agrupam proteínas sinalizadoras, exacerbando potencialmente o sinal de receptores e aumentando a concentração local de componentes efetores das suas vias^[147]. A síntese do mevalonato é também a reação limitante de outras vias proliferativas (Figura 12), como a isoprenilação (farnesilação) do Ras e de GTPases envolvidas na sinalização intracelular (os isoprenóides facilitam a interação proteína-proteína e proteína-membrana celular)^[144]. Modificações distintas das isoformas do Ras levam à localização de cada uma delas em compartimentos específicos da célula, tendo como consequência a modulação do sinal^[148]. A ativação do Ras na membrana plasmática, por exemplo, é rápida e transitória, enquanto que no complexo de Golgi é mais lenta e sustentada^[149]. As diferenças resultantes desta compartimentalização no perfil temporal de ativação das vias efetoras do Ras têm profundo efeito no desfecho biológico. Em células de feocromocitoma de rato (PC12) a ativação transitória do Ras pelo “epidermal growth factor” (EGF) estimulou a proliferação, enquanto a ativação sustentada pelo “nerve growth factor” (NGF) induziu diferenciação^[150]. A ativação da via de biossíntese do colesterol detectada em nossas amostras sugere que a sinalização pelo Ras

possa estar alterada nos tumores do córtex adrenal: 1) o aumento da produção de colesterol supriria a nova demanda do mesmo para composição das membranas e as balsas de lípidos, sendo estas importantes plataformas para as proteínas sinalizadoras; 2) paralelamente, a farnesilação do Ras possibilitaria a subsequente palmitoilação das isoformas H- e N-ras e sua incorporação às balsas de lípidos^[151], onde a ativação das mesmas desencadearia a proliferação celular.

Em outro trabalho do nosso grupo foi estudado o efeito do inibidor da HMGCóA redutase (lovastatina) na via proliferativa do Ras, MAPK (Ras-RAF-MEK-ERK), em células NCI-H295A. Experimentos de “Western blot” mostraram uma redução dose-dependente da “extracellular signal-regulated kinase” (ERK) fosforilada, indicando a importância da HMGCóA redutase nesta via. Mesmo num tecido que normalmente apresenta atividade sintética de colesterol, como é o caso do córtex adrenal, a HMGCóA redutase tem uma participação significativa na sinalização da via do Ras*.

Três categorias funcionais - motilidade, proteínas do citoesqueleto e regulação do formato celular - agruparam cerca de um sexto dos genes hiper-expressos no tumor da paciente. Estas categorias podem estar relacionadas a um fenômeno mais abrangente: a interação entre o hospedeiro e o carcinoma invasivo/metastático^{[152], [153]}. As células cancerosas alteram o estroma adjacente, formando um ambiente permissivo e provedor para a iniciação, progressão tumoral e metástase tumoral^{[154], [155]}. Os componentes celulares secretam para a matriz extra celular diversas

* Valassi HPL et al., dados não publicados

moléculas, que facilitam a proliferação, invasão e metástase das células neoplásicas, além de induzir angiogênese e evasão do tumor ao sistema imune^[156], ^[154], ^[157]. Os miofibroblastos (fibroblastos que adquirem capacidade de expressar alfa-actina de músculo liso) constituem a população majoritária no estroma de carcinomas invasivos, remodelando o tecido conectivo e interagindo com células epiteliais, participando do controle destes fenômenos na invasão e metástase do tumor^[158]. As células do tumor sofrem alteração do formato e contatos com outras células e com a matriz extra celular. A associação de elementos do citoesqueleto (actina e miosina II) com “gap junctions” foi demonstrada na linhagem de células de tumor adrenocortical SW13, bem como sua importância na internalização dessas estruturas em diversos adenocarcinomas^[159].

A diminuição da expressão de genes envolvidos em transcrição, remodelamento da cromatina e biossíntese/processamento de RNA nas duas amostras estudadas (Figura 9) denota uma redução da complexidade do transcrito tumoral. De fato, em geral é possível observarmos um menor número de bandas resolvidas nas canaletas dos géis de seqüenciamento correspondentes às amostras tumorais, em comparação ao controle de adrenal normal.

Algumas categorias foram representadas tanto por genes hiper- como por hipo-expressos, o que não necessariamente corresponde a uma contradição. Um exemplo de categoria funcional nessa condição é “catabolismo de proteínas dependente de ubiquitina” (Figura 13), processo

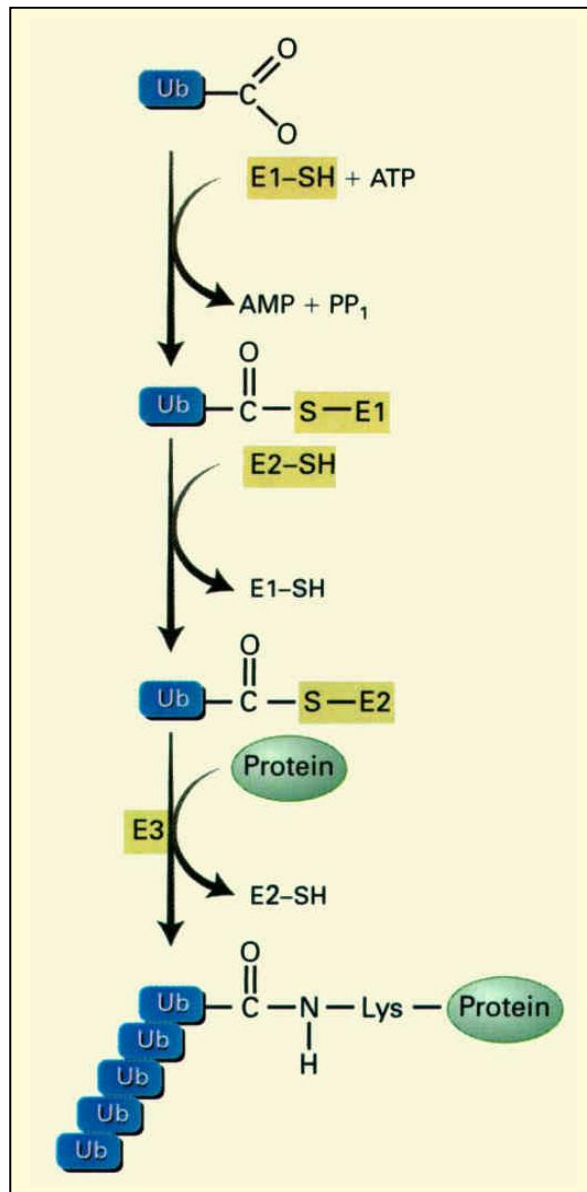


Figura 13 - Esquema da via de ubiquitina-proteassoma de proteólise

O processo de ligação de Ub (ubiquitina) às proteínas inicia-se com a ativação da Ub pela enzima ativadora E1, transferência da Ub ativada para a enzima conjugadora E2 e desta para a proteína-substrato, reação catalizada por uma enzima (ligase) E3. A repetição do ciclo gera uma cadeia de Ubs. A proteína poliubiquitinada é reconhecida e degradada pelo proteassoma 26 S, sendo a ubiquitina reciclada. Mitch e Goldberg, 1996^[160].

que pode envolver tanto a destruição de proteínas pró- quanto anti-tumorigênicas. No sistema ubiquitina-proteassoma as proteínas são processadas pela ação sucessiva de três enzimas: E1 (ativadora), E2 (conjugadora) e E3 (ligase)^[161]. A proteína poliubiquitinada é reconhecida e degradada pelo proteassoma 26S^[162]. A especificidade da ligação E3-substrato condiz com a profusão de componentes desta família de enzimas (centenas a milhares)^[163]. Algumas são consideradas oncogênicas, enquanto que outras são classificadas como supressoras de tumor, o que depende do papel das proteínas alvo no funcionamento da célula. Exemplos de substrato incluem dezenas de proteínas envolvidas no controle do ciclo celular, na transdução de sinal e na diferenciação^[163], bem como em resposta à hipoxia^[164].

Nós encontramos expressão diferenciada de genes representantes dos diferentes estágios do processo de ubiquitinação - UBE2D3 (uma enzima E2), ANAPC11 e ITCH (uma enzima E3), PSMD4 (subunidade do complexo regulatório do proteassoma 26S) e USP1 e USP12L (enzimas desubiquitinadoras) - o que reforça a importância deste mecanismo nas neoplasias adrenocorticais. A identificação da E2 que possa ter um papel na tumorigênese adrenal é por si só relevante pois, ao contrário das enzimas E3, poucos trabalhos relacionaram as E2 com o desenvolvimento de câncer^[163]. A UBE2D3 foi apontada como parceira da Mdm2, a E3 responsável pelo controle dos níveis do supressor tumoral p53^[165]. Vale destacar também que a USP1 (desubiquitinadora), hiper-expressa nas células NCI-H295A, é responsável pelo bloqueio da via anemia Fanconi (FA)

de reparo do DNA, permitindo a retomada do ciclo celular. É possível que níveis aumentados da USP1 possam antecipar a retomada do ciclo celular, perpetuando as lesões ao DNA. Um outro mecanismo, a endocitose, é um aspecto importante da regulação da via do Wnt/Fz^[166]. Esta via (Figura 11) está associada à internalização de Wnt-3a, dependente de clatrina^[167]. Em linhagens celulares murina e humana o bloqueio da endocitose mediada pela clatrina levou à depleção da Dvl2 e Dvl3 (por poliubiquitinação) e, conseqüentemente, ao bloqueio da sinalização à β -catenina^[168]. Nós detectamos níveis aumentados de transcritos de clatrina e Dvl, nas células NCI-H295A e no espécime tumoral respectivamente. Talvez a hiperexpressão de clatrina favoreça a regulação negativa da proteína Dvl e o aumento dos níveis de transcritos Dvl possa ter um papel compensatório na ativação da via Wnt/ β -catenina. Por fim o aumento do catabolismo de proteínas por ubiquitinação pode refletir a necessidade de remoção de proteínas com “folding” alterado, resultantes do estresse oxidativo ao qual as células NCI-H295A estão sujeitas.

Um fato que ilustra o poder da análise comparativa de transcritomas tumorais é a identificação de vários genes (Tabelas 6 a 15) cuja relevância no comportamento biológico das neoplasias já foi descrita previamente. O supressor de tumor BCSC-1 e a FUT11 (fucosiltransferase 11) são exemplos de genes identificados por esta abordagem. A expressão de BCSC-1 e FUT11 foi analisada por RT-PCR semi-quantitativa em vários tumores adrenocorticais benignos e malignos (Figura 10).

Em nossas amostras de neoplasias do córtex adrenal a expressão do *BCSC-1* distinguiu tumores do córtex adrenal benignos dos malignos, entre os pacientes adultos, mas não entre os pediátricos. A LOH do *locus* do *BCSC-1* é comum em vários tumores sólidos, incluindo mama, pulmão, ovário e colo uterino^{[113], [118]}. Mesmo em tumores onde não ocorre mutação somática do *BCSC-1* a LOH do seu *locus* é freqüentemente observada^[113]. A expressão de *BCSC-1* estava diminuída em linhagens celulares derivadas de carcinoma de mama (12/13) e de ovário (7/7), quando comparadas a seus equivalentes normais. A expressão ectópica do *BCSC-1* em diferentes linhagens de células tumorais diminuiu a capacidade de formação de colônias e reduziu o volume de tumores em camundongos quando estas células foram injetadas, demonstrando o papel de supressor tumoral do *BCSC-1*^[113].

Os glicanos fucosilados (sintetizados pelas FUTs) são reconhecidos por receptores do endotélio (L-, E- e P-selectinas). Durante processos inflamatórios esses receptores são transcricionalmente ativados, ligando-se aos glicanos fucosilados presentes na superfície dos leucócitos, promovendo seu recrutamento para os locais de inflamação. De forma similar, as E-selectinas promovem a interação “célula tumoral-endotélio”^[119]. As fucosiltransferases sintetizam glicanos fucosilados, os quais estão mais abundantes em diversos tipos de células cancerosas^{[169], [170]}, possivelmente contribuindo para seu comportamento metastático^{[171], [172], [173]}. A expressão dos antígenos dos grupos sanguíneos ABO, H e Lewis (exemplos de glicanos fucosilados) se encontra alterada em muitos tumores malignos,

sendo correlacionada com mau prognóstico^[114]. A expressão de *FUT11* nas nossas amostras de neoplasias do córtex da supra-renal foi significativamente maior nos tumores pediátricos metastáticos/recorrentes, em comparação aos benignos (Figura 10B). Este é um resultado encorajador, principalmente em relação aos tumores pediátricos, para os quais a distinção entre neoplasias benignas e malignas pelo sistema de Weiss é particularmente ineficiente. Estudos envolvendo uma casuística maior de tumores pediátricos do córtex adrenal são necessários para avaliar o desempenho do *FUT11* na previsão de prognóstico desta condição.

Dois genes associados com a resistência a tratamentos anti-tumorais se encontram hiper-expressos nas células NCI-H295A. O primeiro é o gene da timidilato sintetase (*TYMS*), também relatado como hiper-expresso em carcinomas adrenocorticais por outros investigadores^[100]. A expressão aumentada da timidilato sintetase foi descrita como mediadora de resistência de células de câncer cervical uterino à radiação^[174] sendo também associada à resistência de células de câncer de pulmão ao 5-fluorouracil^[175] e do câncer esofágico à quimioterapia^[176].

Um outro gene implicado no desenvolvimento de resistência a drogas anti-câncer - o *CRR9* (gene da proteína relacionada à resistência à cisplatina) - também mostrou-se hiper-expresso nas células NCI-H295A. A cisplatina é um agente danoso ao DNA, amplamente empregado em quimioterapia, sendo que o DNA modificado por esta droga não é reparado adequadamente^[116]. A resistência à cisplatina foi descrita em vários tumores humanos^[177]. A proteína codificada pelo *CRR9* foi encontrada hiper-expressa

em uma linhagem celular de tumor ovariano cisplatina-resistente, tendo sido associada à hipo-regulação da maquinaria pró-apoptótica^[178].

Os transcritos para a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) estavam hiper-expressos na amostra do tumor da paciente. Além da sua participação bastante conhecida na via glicolítica, esta enzima está envolvida em outros processos biológicos, como brotamento de microtúbulos, apoptose, exportação de RNA nuclear, replicação de DNA e reparo de DNA^[117]. O gene *GAPDH* é tradicionalmente considerado como “housekeeping” e tem sido utilizado como controle interno de ensaios de quantificação de transcritos. No entanto, sua hiper-expressão tem sido apontada em diversos tecidos tumorais^[179], como hepatomas de ratos^[180], linhagens celulares malignas murinas^[181], carcinoma de próstata humano^[182], em tecidos de câncer pulmonar humano^[183] e em carcinomas do córtex adrenal^[101]. A quantificação acurada de mRNAs pressupõe que o gene referência não varie significativamente sua expressão nas diversas condições comparadas. Assim sendo, achamos que o uso do *GAPDH* em estudos de expressão gênica de tumores exige uma cuidadosa validação.

O gene DMAP1 (“DNA methyltransferase 1 associated protein 1”) encontra-se hiper-expresso nas células NCI-H295A. A proteína não apenas mantém a metilação do DNA como também tem papel na perpetuação da repressão transcricional da cromatina durante a replicação do DNA^[184]. É possível que a hiperexpressão do DMAP1 possa inativar, por mecanismos epigenéticos, genes supressores tumorais, contribuindo para a carcinogênese da adrenal.

Em suma, a estratégia adotada neste estudo revelou novos aspectos da Biologia do carcinoma adrenocortical. Pudemos evidenciar moléculas e vias cuja modulação pode ter importância no desenvolvimento deste câncer. Dentre essas podemos salientar a via de sinalização do Wnt, a ubiquitinação de proteínas e a via de biossíntese de colesterol. Estes resultados abrem portas para investigações adicionais, para que possa ser avaliada a utilidade dos genes aqui identificados como potenciais marcadores no diagnóstico e alvos para novas terapias específicas do carcinoma do córtex adrenal.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

- 1) É possível representar praticamente todos os cromossomos com DDRT-PCR usando um conjunto limitado de oligonucleotídeos;
- 2) Existe um desbalanço dos transcritos que representam exons de genes conhecidos e aqueles que representam introns;
- 3) Há uma diferença significativa entre os processos biológicos alterados nas células NCI-H295A e na amostra do espécime tumoral;
- 4) Os genes ligados a motilidade celular, via do Wnt, síntese de colesterol e metabolismo de glicose provavelmente possuem um papel fundamental na definição do fenótipo maligno da supra-renal, visto que estão alterados em ambas as amostras de carcinoma adrenocortical;
- 5) Os genes de função desconhecida formam a categoria mais importante entre os hiper-expressos, o que retrata a excelência do DDRT-PCR para detecção de novos transcritos;
- 6) DDRT-PCR é uma ferramenta valiosa para análise global de transcritomas.

REFERÊNCIAS

7 REFERÊNCIAS

1. Kloos RT, Gross MD, Francis IR, Korobkin M, Shapiro B: Incidentally discovered adrenal masses. *Endocr Rev* 1995; 16(4): 460-84.
2. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, et al.: A survey on adrenal incidentaloma in Italy. Study Group on Adrenal Tumors of the Italian Society of Endocrinology. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2): 637-44.
3. Mansmann G, Lau J, Balk E, Rothberg M, Miyachi Y, Bornstein SR: The clinically inapparent adrenal mass: update in diagnosis and management. *Endocr Rev* 2004; 25(2): 309-40.
4. Third national cancer survey: incidence data. *Natl Cancer Inst Monogr* 1975(41): i-x, 1-454.
5. Latronico AC, Chrousos GP: Extensive personal experience: adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(5): 1317-24.
6. Hutter AM, Jr., Kayhoe DE: Adrenal cortical carcinoma. Clinical features of 138 patients. *Am J Med* 1966; 41(4): 572-80.
7. Nader S, Hickey RC, Sellin RV, Samaan NA: Adrenal cortical carcinoma. A study of 77 cases. *Cancer* 1983; 52(4): 707-11.
8. Soreide JA, Brabrand K, Thoresen SO: Adrenal cortical carcinoma in Norway, 1970-1984. *World J Surg* 1992; 16(4): 663-7; discussion 668.
9. Wooten MD, King DK: Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer* 1993; 72(11): 3145-55.
10. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Medonca BB, et al.: Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer* 2000; 88(4): 711-36.
11. Ng L, Libertino JM: Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. *J Urol* 2003; 169(1): 5-11.
12. Mendonca BB, Lucon AM, Menezes CA, et al.: Clinical, hormonal and pathological findings in a comparative study of adrenocortical neoplasms in childhood and adulthood. *J Urol* 1995; 154(6): 2004-9.

13. Zografos GC, Driscoll D, Karakousis C, Rao U, Huben R: Staging and grading in the survival of adrenal carcinomas. *Eur J Surg Oncol* 1994; 20(4): 449-53.
14. Tritos NA, Cushing GW, Heatley G, Libertino JA: Clinical features and prognostic factors associated with adrenocortical carcinoma: Lahey Clinic Medical Center experience. *Am Surg* 2000; 66(1): 73-9.
15. Rubin R, Rubin E: Sistema Endócrino. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, et al., eds. Rubin, *Patologia: Bases Clinicopatológicas da Medicina*, 4a ed. Rio de Janeiro, RJ, Brasil: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006; 1147 - 1194.
16. Gicquel C, Bertagna X, Gaston V, et al.: Molecular markers and long-term recurrences in a large cohort of patients with sporadic adrenocortical tumors. *Cancer Res* 2001; 61(18): 6762-7.
17. Weiss LM: Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 1984; 8(3): 163-9.
18. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery AL, Jr.: Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. *Am J Surg Pathol* 1989; 13(3): 202-6.
19. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, et al.: Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. *Am J Surg Pathol* 2002; 26(12): 1612-9.
20. Sturgeon C, Shen WT, Clark OH, Duh QY, Kebebew E: Risk assessment in 457 adrenal cortical carcinomas: how much does tumor size predict the likelihood of malignancy? *J Am Coll Surg* 2006; 202(3): 423-30.
21. Vassilopoulou-Sellin R, Schultz PN: Adrenocortical carcinoma. Clinical outcome at the end of the 20th century. *Cancer* 2001; 92(5): 1113-21.
22. 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; 23(3): 155-86.
23. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV: Adrenal cortical carcinoma. *J Urol* 1978; 120(6): 660-5.

24. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M: Management of adrenocortical carcinoma. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2004; 60(3): 273-87.
25. Berruti A, Terzolo M, Pia A, Angeli A, Dogliotti L: Mitotane associated with etoposide, doxorubicin, and cisplatin in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma. Italian Group for the Study of Adrenal Cancer. *Cancer* 1998; 83(10): 2194-200.
26. Khan TS, Imam H, Juhlin C, et al.: Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol* 2000; 11(10): 1281-7.
27. First International Randomized Trial in locally advanced and Metastatic Adrenocortical Cancer Treatment (FIRM-ACT). <http://www.firm-act.org>.
28. Rubin E, Rubin R, Aaronson S: Neoplasia. In: Rubin E, Gorstein F, Rubin R, et al., eds. Rubin, *Patologia: Bases Clinicopatologicas da Medicina*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 2006; 171 - 220.
29. Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57-70.
30. Gicquel C, Leblond-Francillard M, Bertagna X, et al.: Clonal analysis of human adrenocortical carcinomas and secreting adenomas. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1994; 40(4): 465-77.
31. Beuschlein F, Reincke M, Karl M, et al.: Clonal composition of human adrenocortical neoplasms. *Cancer Res* 1994; 54(18): 4927-32.
32. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, et al.: Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. *Cancer Res* 1996; 56(18): 4219-23.
33. Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, et al.: Analysis of genomic alterations in sporadic adrenocortical lesions. Gain of chromosome 17 is an early event in adrenocortical tumorigenesis. *Am J Pathol* 1999; 155(4): 1039-45.
34. 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; 28(2): 145-52.

35. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, et al.: Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(7): 3467-74.
36. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, et al.: Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(3): 1116-21.
37. Corin SJ, Chen LC, Hamburger AW: Enhancement of anchorage-independent growth of a human adrenal carcinoma cell line by endogenously produced basic fibroblast growth factor. *Int J Cancer* 1990; 46(3): 516-21.
38. Skogseid B, Larsson C, Lindgren PG, et al.: Clinical and genetic features of adrenocortical lesions in multiple endocrine neoplasia type 1. *J Clin Endocrinol Metab* 1992; 75(1): 76-81.
39. Kjellman M, Roshani L, Teh BT, 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; 84(2): 730-5.
40. Gortz B, Roth J, Speel EJ, et al.: MEN1 gene mutation analysis of sporadic adrenocortical lesions. *Int J Cancer* 1999; 80(3): 373-9.
41. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, et al.: MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84(1): 216-9.
42. Zwermann O, Beuschlein F, Mora P, Weber G, Allolio B, Reincke M: Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2000; 142(6): 689-95.
43. Bhuiyan MM, Sato M, Murao K, et al.: Differential expression of menin in various adrenal tumors. The role of menin in adrenal tumors. *Cancer* 2001; 92(6): 1393-401.
44. Giordano TJ: Molecular pathology of adrenal cortical tumors: separating adenomas from carcinomas. *Endocr Pathol* 2006; 17(4): 355-63.

45. Omim: Li-Fraumeni syndrome.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/disomim.cgi?id=151623>.
46. Omim: Beeckwith-Wiedman syndrome.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/disomim.cgi?id=151623>.
47. Varley JM, McGown G, Thorncroft M, et al.: Are there low-penetrance TP53 Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. *Am J Hum Genet* 1999; 65(4): 995-1006.
48. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, et al.: An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; 98(16): 9330-5.
49. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, et al.: An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86(10): 4970-3.
50. Sameshima Y, Tsunematsu Y, Watanabe S, et al.: Detection of novel germ-line p53 mutations in diverse-cancer-prone families identified by selecting patients with childhood adrenocortical carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 1992; 84(9): 703-7.
51. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, et al.: Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(2): 207-12.
52. Kobayashi H, Usui T, Fukata J, Yoshimasa T, Oki Y, Nakao K: Mutation analysis of Gsalpha, adrenocorticotropin receptor and p53 genes in Japanese patients with adrenocortical neoplasms: including a case of Gsalpha mutation. *Endocr J* 2000; 47(4): 461-6.
53. Lin SR, Lee YJ, Tsai JH: Mutations of the p53 gene in human functional adrenal neoplasms. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(2): 483-91.
54. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU: p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. *Int J Cancer* 1993; 54(3): 408-10.
55. Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al.: Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63(20): 6643-50.

56. Pinto EM, Billerbeck AE, Fragoso MC, Mendonca BB, Latronico AC: Deletion mapping of chromosome 17 in benign and malignant adrenocortical tumors associated with the Arg337His mutation of the p53 tumor suppressor protein. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90(5): 2976-81.
57. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonca BB, Latronico AC: Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2004; 48(5): 647-50.
58. Reincke M, Karl M, Travis WH, et al.: p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(3): 790-4.
59. Reincke M, Wachenfeld C, Mora P, et al.: p53 mutations in adrenal tumors: Caucasian patients do not show the exon 4 "hot spot" found in Taiwan. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81(10): 3636-8.
60. Sandrini F, Villani DP, Tucci S, Moreira AC, de Castro M, Elias LL: Inheritance of R337H p53 gene mutation in children with sporadic adrenocortical tumor. *Horm Metab Res* 2005; 37(4): 231-5.
61. Sidhu S, Martin E, Gicquel C, et al.: Mutation and methylation analysis of TP53 in adrenal carcinogenesis. *Eur J Surg Oncol* 2005; 31(5): 549-54.
62. 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; 86(22): 1707-10.
63. Slatter RE, Elliott M, Welham K, et al.: Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 1994; 31(10): 749-53.
64. Lerario AM, Mendonca BB, Lin CJ: [Molecular mechanisms involved in adrenocortical tumorigenesis]. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 2005; 49(5): 753-68.
65. Coulter CL: Fetal adrenal development: insight gained from adrenal tumors. *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16(5): 235-42.

66. Logie A, Boulle N, Gaston V, et al.: Autocrine role of IGF-II in proliferation of human adrenocortical carcinoma NCI H295R cell line. *J Mol Endocrinol* 1999; 23(1): 23-32.
67. Ilvesmaki V, Kahri AI, Miettinen PJ, Voutilainen R: Insulin-like growth factors (IGFs) and their receptors in adrenal tumors: high IGF-II expression in functional adrenocortical carcinomas. *J Clin Endocrinol Metab* 1993; 77(3): 852-8.
68. Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Ilvesmaki V, Voutilainen R: H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995; 80(2): 492-6.
69. Liu J, Kahri AI, Heikkila P, Voutilainen R: Ribonucleic acid expression of the clustered imprinted genes, p57KIP2, insulin-like growth factor II, and H19, in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(6): 1766-71.
70. Gao ZH, Suppola S, Liu J, Heikkila P, Janne J, Voutilainen R: Association of H19 promoter methylation with the expression of H19 and IGF-II genes in adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2002; 87(3): 1170-6.
71. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, et al.: Rearrangements at the 11p15 locus and overexpression of insulin-like growth factor-II gene in sporadic adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78(6): 1444-53.
72. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, 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; 82(8): 2559-65.
73. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, et al.: The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol* 1993; 123(3): 513-22.
74. Tallini G, Garcia-Rostan G, Herrero A, et al.: Downregulation of p27KIP1 and Ki67/Mib1 labeling index support the classification of thyroid

- carcinoma into prognostically relevant categories. *Am J Surg Pathol* 1999; 23(6): 678-85.
75. Terzolo M, Boccuzzi A, Bovio S, et al.: Immunohistochemical assessment of Ki-67 in the differential diagnosis of adrenocortical tumors. *Urology* 2001; 57(1): 176-82.
 76. Molkenin JD: The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 2000; 275(50): 38949-52.
 77. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, 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; 85(9): 3476-83.
 78. Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M: Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 1998; 125(14): 2665-75.
 79. Tremblay JJ, Viger RS: Nuclear receptor Dax-1 represses the transcriptional cooperation between GATA-4 and SF-1 in Sertoli cells. *Biol Reprod* 2001; 64(4): 1191-9.
 80. Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, et al.: Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. *Endocrinology* 1997; 138(8): 3505-14.
 81. Siltanen S, Anttonen M, Heikkila P, et al.: Transcription factor GATA-4 is expressed in pediatric yolk sac tumors. *Am J Pathol* 1999; 155(6): 1823-9.
 82. Lin L, Aggarwal S, Glover TW, et al.: A minimal critical region of the 8p22-23 amplicon in esophageal adenocarcinomas defined using sequence tagged site-amplification mapping and quantitative polymerase chain reaction includes the GATA-4 gene. *Cancer Res* 2000; 60(5): 1341-7.

83. Ketola I, Pentikainen V, Vaskivuo T, et al.: Expression of transcription factor GATA-4 during human testicular development and disease. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(10): 3925-31.
84. Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, 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; 5(7): 490-501.
85. 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; 4(1): 3.
86. Ketola I, Rahman N, Toppari J, et al.: Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. *Endocrinology* 1999; 140(3): 1470-80.
87. Blasco MA: Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005; 6(8): 611-22.
88. Hirano Y, Fujita K, Suzuki K, Ushiyama T, Ohtawara Y, Tsuda F: Telomerase activity as an indicator of potentially malignant adrenal tumors. *Cancer* 1998; 83(4): 772-6.
89. Mannelli M, Gelmini S, Arnaldi G, et al.: Telomerase activity is significantly enhanced in malignant adrenocortical tumors in comparison to benign adrenocortical adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(1): 468-70.
90. Bertram JS: The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med* 2000; 21(6): 167-223.
91. Mehta PP, Bertram JS, Loewenstein WR: Growth inhibition of transformed cells correlates with their junctional communication with normal cells. *Cell* 1986; 44(1): 187-96.
92. Murray SA, Davis K, Fishman LM, Bornstein SR: Alpha1 connexin 43 gap junctions are decreased in human adrenocortical tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85(2): 890-5.

93. Liang P, Pardee AB: Analysing differential gene expression in cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(11): 869-76.
94. Bishop JO, Morton JG, Rosbash M, Richardson M: Three abundance classes in HeLa cell messenger RNA. *Nature* 1974; 250(463): 199-204.
95. Zimmermann CR, Orr WC, Leclerc RF, Barnard EC, Timberlake WE: Molecular cloning and selection of genes regulated in *Aspergillus* development. *Cell* 1980; 21(3): 709-15.
96. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW: Serial analysis of gene expression. *Science* 1995; 270(5235): 484-7.
97. Saha S, Sparks AB, Rago C, et al.: Using the transcriptome to annotate the genome. *Nat Biotechnol* 2002; 20(5): 508-12.
98. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270(5235): 467-70.
99. Lockhart DJ, Winzler EA: Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* 2000; 405(6788): 827-36.
100. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, et al.: Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. *Am J Pathol* 2003; 162(2): 521-31.
101. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, 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; 90(3): 1819-29.
102. Velazquez-Fernandez D, Laurell C, Geli J, et al.: Expression profiling of adrenocortical neoplasms suggests a molecular signature of malignancy. *Surgery* 2005; 138(6): 1087-94.
103. Slater EP, Diehl SM, Langer P, et al.: Analysis by cDNA microarrays of gene expression patterns of human adrenocortical tumors. *Eur J Endocrinol* 2006; 154(4): 587-98.
104. Liang P, Pardee AB: Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 1992; 257(5072): 967-71.

105. Rodriguez H, Hum DW, Staels B, Miller WL: Transcription of the human genes for cytochrome P450_{scc} and P450_{c17} is regulated differently in human adrenal NCI-H295 cells than in mouse adrenal Y1 cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82(2): 365-71.
106. Gazdar AF, Oie HK, Shackleton CH, et al.: Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. *Cancer Res* 1990; 50(17): 5488-96.
107. Staels B, Hum DW, Miller WL: Regulation of steroidogenesis in NCI-H295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. *Mol Endocrinol* 1993; 7(3): 423-33.
108. Zhang L, Zhou W, Velculescu VE, et al.: Gene expression profiles in normal and cancer cells. *Science* 1997; 276(5316): 1268-72.
109. Lerario AM, Arguello AM, Latronico AC, Brito VN, Mendonca BB: Virilizing adrenocortical carcinoma associated with high LH levels in a 16 year-old girl with a history of gonadotropin-dependent precocious puberty. *The Endocrine Society's 85th Annual Meeting*, Philadelphia, PA, 2003.
110. Hatch R, Rosenfield RL, Kim MH, Tredway D: Hirsutism: implications, etiology, and management. *Am J Obstet Gynecol* 1981; 140(7): 815-30.
111. Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162(1): 156-9.
112. Liang P, Zhu W, Zhang X, et al.: Differential display using one-base anchored oligo-dT primers. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(25): 5763-4.
113. Martin ES, Cesari R, Pentimalli F, et al.: The BCSC-1 locus at chromosome 11q23-q24 is a candidate tumor suppressor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(20): 11517-22.
114. Becker DJ, Lowe JB: Fucose: biosynthesis and biological function in mammals. *Glycobiology* 2003; 13(7): 41R-53R.

115. Wieneke JA, Thompson LD, Heffess CS: Adrenal cortical neoplasms in the pediatric population: a clinicopathologic and immunophenotypic analysis of 83 patients. *Am J Surg Pathol* 2003; 27(7): 867-81.
116. Siddik ZH: Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance. *Oncogene* 2003; 22(47): 7265-79.
117. Sirover MA: New insights into an old protein: the functional diversity of mammalian glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1432(2): 159-84.
118. Zhang Z, Gerhard DS, Nguyen L, et al.: Fine mapping and evaluation of candidate genes for cervical cancer on 11q23. *Genes Chromosomes Cancer* 2005; 43(1): 95-103.
119. Martin-Satue M, Marrugat R, Cancelas JA, Blanco J: Enhanced expression of alpha(1,3)-fucosyltransferase genes correlates with E-selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1998; 58(7): 1544-50.
120. Velculescu VE, Zhang L, Zhou W, et al.: Characterization of the yeast transcriptome. *Cell* 1997; 88(2): 243-51.
121. Kirschbaum-Slager N, Lopes GM, Galante PA, Riggins GJ, de Souza SJ: Splicing factors are differentially expressed in tumors. *Genet Mol Res* 2004; 3(4): 512-20.
122. Erdmann VA, Szymanski M, Hochberg A, Groot N, Barciszewski J: Non-coding, mRNA-like RNAs database Y2K. *Nucleic Acids Res* 2000; 28(1): 197-200.
123. Erdmann VA, Barciszewska MZ, Hochberg A, de Groot N, Barciszewski J: Regulatory RNAs. *Cell Mol Life Sci* 2001; 58(7): 960-77.
124. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
125. Goodrich JA, Kugel JF: Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006; 7(8): 612-6.
126. Reis EM, Nakaya HI, Louro R, et al.: Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 2004; 23(39): 6684-92.

127. Nakaya HI, Amaral PP, Louro R, et al.: Genome mapping and expression analyses of human intronic noncoding RNAs reveal tissue-specific patterns and enrichment in genes related to regulation of transcription. *Genome Biol* 2007; 8(3): R43.
128. Peifer M, Polakis P: Wnt signaling in oncogenesis and embryogenesis-- a look outside the nucleus. *Science* 2000; 287(5458): 1606-9.
129. Liu X, Lazenby AJ, Siegal GP: Signal transduction cross-talk during colorectal tumorigenesis. *Adv Anat Pathol* 2006; 13(5): 270-4.
130. Kikuchi A: Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 2003; 94(3): 225-9.
131. Tissier F, Cavard C, Groussin L, 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; 65(17): 7622-7.
132. Cadigan KM, Liu YI: Wnt signaling: complexity at the surface. *J Cell Sci* 2006; 119(Pt 3): 395-402.
133. Uematsu K, He B, You L, Xu Z, McCormick F, Jablons DM: Activation of the Wnt pathway in non small cell lung cancer: evidence of dishevelled overexpression. *Oncogene* 2003; 22(46): 7218-21.
134. Uematsu K, Kanazawa S, You L, et al.: Wnt pathway activation in mesothelioma: evidence of Dishevelled overexpression and transcriptional activity of beta-catenin. *Cancer Res* 2003; 63(15): 4547-51.
135. Nagahata T, Shimada T, Harada A, et al.: Amplification, up-regulation and over-expression of DVL-1, the human counterpart of the Drosophila disheveled gene, in primary breast cancers. *Cancer Sci* 2003; 94(6): 515-8.
136. Tosi MR, Tugnoli V: Cholesteryl esters in malignancy. *Clin Chim Acta* 2005; 359(1-2): 27-45.
137. Mo H, Elson CE: Studies of the isoprenoid-mediated inhibition of mevalonate synthesis applied to cancer chemotherapy and chemoprevention. *Exp Biol Med (Maywood)* 2004; 229(7): 567-85.

138. Tosi GM, Trimarchi C, Macaluso M, et al.: Genetic and epigenetic alterations of RB2/p130 tumor suppressor gene in human sporadic retinoblastoma: implications for pathogenesis and therapeutic approach. *Oncogene* 2005; 24(38): 5827-36.
139. Celis JE, Gromov P, Moreira JM, et al.: Apocrine cysts of the breast: biomarkers, origin, enlargement, and relation with cancer phenotype. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5(3): 462-83.
140. Celis JE, Gromova I, Gromov P, et al.: Molecular pathology of breast apocrine carcinomas: a protein expression signature specific for benign apocrine metaplasia. *FEBS Lett* 2006; 580(12): 2935-44.
141. Vitols S, Norgren S, Juliusson G, Tatidis L, Luthman H: Multilevel regulation of low-density lipoprotein receptor and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase gene expression in normal and leukemic cells. *Blood* 1994; 84(8): 2689-98.
142. Yachnin S, Mannickarottu V: Increased 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase activity and cholesterol biosynthesis in freshly isolated hairy cell leukemia cells. *Blood* 1984; 63(3): 690-3.
143. Bennis F, Favre G, Le Gaillard F, Soula G: Importance of mevalonate-derived products in the control of HMG-CoA reductase activity and growth of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Int J Cancer* 1993; 55(4): 640-5.
144. McTaggart SJ: Isoprenylated proteins. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63(3): 255-67.
145. Graaf MR, Richel DJ, van Noorden CJ, Guchelaar HJ: Effects of statins and farnesyltransferase inhibitors on the development and progression of cancer. *Cancer Treat Rev* 2004; 30(7): 609-41.
146. Brown DA, Rose JK: Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 1992; 68(3): 533-44.
147. Simons K, Toomre D: Lipid rafts and signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2000; 1(1): 31-9.

148. Jura N, Bar-Sagi D: Mapping cellular routes of Ras: a ubiquitin trail. *Cell Cycle* 2006; 5(23): 2744-7.
149. Chiu VK, Bivona T, Hach A, et al.: Ras signalling on the endoplasmic reticulum and the Golgi. *Nat Cell Biol* 2002; 4(5): 343-50.
150. Traverse S, Seedorf K, Paterson H, Marshall CJ, Cohen P, Ullrich A: EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr Biol* 1994; 4(8): 694-701.
151. Prior IA, Harding A, Yan J, Sluimer J, Parton RG, Hancock JF: GTP-dependent segregation of H-ras from lipid rafts is required for biological activity. *Nat Cell Biol* 2001; 3(4): 368-75.
152. Seemayer TA, Lagace R, Schurch W, Tremblay G: Myofibroblasts in the stroma of invasive and metastatic carcinoma: a possible host response to neoplasia. *Am J Surg Pathol* 1979; 3(6): 525-33.
153. De Wever O, Mareel M: Role of myofibroblasts at the invasion front. *Biol Chem* 2002; 383(1): 55-67.
154. Mueller MM, Fusenig NE: Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(11): 839-49.
155. Donjacour AA, Cunha GR: Stromal regulation of epithelial function. *Cancer Treat Res* 1991; 53: 335-64.
156. Olumi AF, Grossfeld GD, Hayward SW, Carroll PR, Tlsty TD, Cunha GR: Carcinoma-associated fibroblasts direct tumor progression of initiated human prostatic epithelium. *Cancer Res* 1999; 59(19): 5002-11.
157. Li H, Fan X, Houghton J: Tumor microenvironment: the role of the tumor stroma in cancer. *J Cell Biochem* 2007; 101(4): 805-15.
158. Desmouliere A, Guyot C, Gabbiani G: The stroma reaction myofibroblast: a key player in the control of tumor cell behavior. *Int J Dev Biol* 2004; 48(5-6): 509-17.
159. Murray SA, Williams SY, Dillard CY, Narayanan SK, McCauley J: Relationship of cytoskeletal filaments to annular gap junction expression in human adrenal cortical tumor cells in culture. *Exp Cell Res* 1997; 234(2): 398-404.

160. Mitch WE, Goldberg AL: Mechanisms of muscle wasting. The role of the ubiquitin-proteasome pathway. *N Engl J Med* 1996; 335(25): 1897-905.
161. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998; 67: 425-79.
162. Hershko A, Ciechanover A: The ubiquitin system for protein degradation. *Annu Rev Biochem* 1992; 61: 761-807.
163. Nakayama KI, Nakayama K: Ubiquitin ligases: cell-cycle control and cancer. *Nat Rev Cancer* 2006; 6(5): 369-81.
164. Flamme I, Krieg M, Plate KH: Up-regulation of vascular endothelial growth factor in stromal cells of hemangioblastomas is correlated with up-regulation of the transcription factor HRF/HIF-2alpha. *Am J Pathol* 1998; 153(1): 25-9.
165. Saville MK, Sparks A, Xirodimas DP, et al.: Regulation of p53 by the ubiquitin-conjugating enzymes UbcH5B/C in vivo. *J Biol Chem* 2004; 279(40): 42169-81.
166. Kikuchi A, Yamamoto H: Regulation of Wnt signalling by receptor-mediated endocytosis. *J Biochem (Tokyo)* 2007; 141(4): 443-51.
167. Blitzer JT, Nusse R: A critical role for endocytosis in Wnt signaling. *BMC Cell Biol* 2006; 7: 28.
168. Bryja V, Cajanek L, Grahn A, Schulte G: Inhibition of endocytosis blocks Wnt signalling to beta-catenin by promoting dishevelled degradation. *Acta Physiol (Oxf)* 2007; 190(1): 55-61.
169. Hanski C, Hanski ML, Zimmer T, Ogorek D, Devine P, Riecken EO: Characterization of the major sialyl-Lex-positive mucins present in colon, colon carcinoma, and sera of patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55(4): 928-33.
170. Ikeda Y, Mori M, Kajiyama K, Haraguchi Y, Sasaki O, Sugimachi K: Immunohistochemical expression of sialyl Tn, sialyl Lewis a, sialyl Lewis a-b-, and sialyl Lewis x in primary tumor and metastatic lymph nodes in human gastric cancer. *J Surg Oncol* 1996; 62(3): 171-6.
171. Inufusa H, Kojima N, Yasutomi M, Hakomori S: Human lung adenocarcinoma cell lines with different lung colonization potential

- (LCP), and a correlation between expression of sialosyl dimeric Le(x) (defined by MAb FH6) and LCP. *Clin Exp Metastasis* 1991; 9(3): 245-57.
- 172.** Matsushita Y, Nakamori S, Seftor EA, Hendrix MJ, Irimura T: Human colon carcinoma cells with increased invasive capacity obtained by selection for sialyl-dimeric LeX antigen. *Exp Cell Res* 1991; 196(1): 20-5.
- 173.** Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S, et al.: Increased expression of sialyl Lewisx antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: clinicopathological and immunohistochemical study. *Cancer Res* 1993; 53(15): 3632-7.
- 174.** Saga Y, Suzuki M, Mizukami H, et al.: Enhanced expression of thymidylate synthase mediates resistance of uterine cervical cancer cells to radiation. *Oncology* 2002; 63(2): 185-91.
- 175.** Oguri T, Achiwa H, Bessho Y, et al.: The role of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in resistance to 5-fluorouracil in human lung cancer cells. *Lung Cancer* 2005; 49(3): 345-51.
- 176.** Joshi MB, Shirota Y, Danenberg KD, et al.: High gene expression of TS1, GSTP1, and ERCC1 are risk factors for survival in patients treated with trimodality therapy for esophageal cancer. *Clin Cancer Res* 2005; 11(6): 2215-21.
- 177.** Ozols RF, Young RC: Chemotherapy of ovarian cancer. *Semin Oncol* 1984; 11(3): 251-63.
- 178.** Yamamoto K, Okamoto A, Isonishi S, Ochiai K, Ohtake Y: A novel gene, CRR9, which was up-regulated in CDDP-resistant ovarian tumor cell line, was associated with apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280(4): 1148-54.
- 179.** Valenti MT, Bertoldo F, Dalle Carbonare L, et al.: The effect of bisphosphonates on gene expression: GAPDH as a housekeeping or a new target gene? *BMC Cancer* 2006; 6: 49.

180. Chang TJ, Juan CC, Yin PH, Chi CW, Tsay HJ: Up-regulation of beta-actin, cyclophilin and GAPDH in N1S1 rat hepatoma. *Oncol Rep* 1998; 5(2): 469-71.
181. Bhatia P, Taylor WR, Greenberg AH, Wright JA: Comparison of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 28S-ribosomal RNA gene expression as RNA loading controls for northern blot analysis of cell lines of varying malignant potential. *Anal Biochem* 1994; 216(1): 223-6.
182. Ripple MO, Wilding G: Alteration of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity and messenger RNA content by androgen in human prostate carcinoma cells. *Cancer Res* 1995; 55(19): 4234-6.
183. Tokunaga K, Nakamura Y, Sakata K, et al.: Enhanced expression of a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene in human lung cancers. *Cancer Res* 1987; 47(21): 5616-9.
184. Rountree MR, Bachman KE, Baylin SB: DNMT1 binds HDAC2 and a new co-repressor, DMAP1, to form a complex at replication foci. *Nat Genet* 2000; 25(3): 269-77.