

# *Avanços Recentes no Conhecimento dos Mecanismos Moleculares Envolvidos na Tumorigênese Adrenocortical*

**atualização**

## RESUMO

A tumorigênese adrenal é um fenômeno complexo, que envolve múltiplas alterações genéticas. Uma melhor compreensão dos mecanismos que levam ao desenvolvimento dos tumores adrenocorticais possibilitaria não só a identificação precoce dos casos de má evolução, mas também o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Embora nos últimos anos tenham surgido vários estudos sobre a tumorigênese adrenocortical, o processo permanece em grande parte desconhecido. A maior parte dos trabalhos disponíveis estudou apenas um ou poucos genes. Por se tratar de um fenômeno complexo, técnicas que avaliam múltiplos, como os *microarrays*, possivelmente possibilitarão o entendimento de aspectos que até o momento são desconhecidos. Nesta revisão, tentamos resumir de forma abrangente os principais trabalhos científicos produzidos nos últimos anos a respeito do processo de tumorigênese adrenocortical. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:753-768**)

**Descritores:** Tumorigênese adrenal; Tumores adrenais; Patologia adrenal

## ABSTRACT

### **Molecular Mechanisms Involved In Adrenocortical Tumorigenesis.**

The adrenocortical tumorigenesis is a complex process, which involves multiple genetic changes. A better knowledge on the mechanisms involved in tumor development would enable an early identification of malignant disease and also lead to the development of new treatment strategies. Although in the recent years a large amount of data was produced, the exact mechanisms that lead to adrenocortical tumor development remains poorly understood. Most of the studies produced were based on the candidate-gene strategy, which has its own limitations. A genome-wide approach, such as *microarrays*, will surely shed some light into the mechanisms responsible for adrenocortical tumorigenesis. In this review, we summarize the most recent data available on this complex process. (**Arq Bras Endocrinol Metab 2005;49/5:753-768**)

**Keywords:** Adrenal cortex pathology; Adrenal cortex neoplasms; Adrenal cortex tumorigenesis

**O**S TUMORES ADRENOCORTICAIS SÃO NEOPLASIAS comuns em seres humanos. A prevalência aumenta com a idade, podendo atingir até 30% dos indivíduos de faixas etárias mais avançadas, conforme verificado por estudos de necrópsias (1). Até 6% dos pacientes, submetidos a exames radiológicos por motivos não relacionados, podem apresentar nódulos adrenais como achado incidental. Cerca de 0,1% destes achados correspondem a neoplasias malignas primárias em estádios iniciais (1). No entanto, a maior parte destes tumores são adenomas não-funcionantes e a terapêutica consiste apenas em observação clínica. Uma minoria destes nódulos

*Antonio Marcondes Lerario  
Berenice B. de Mendonça  
Chin Jia Lin*

*Unidade de Endocrinologia do  
Desenvolvimento, Laboratório de  
Hormônios e Genética Molecular –  
LIM 42, Disciplina de  
Endocrinologia do HCFMUSP,  
São Paulo, SP.*

*Recebido em 10/08/05  
Revisado em 11/08/05  
Aceito em 23/08/05*

los é funcionante. A terapia de escolha para os carcinomas e os nódulos funcionantes é a ressecção cirúrgica (2). O diagnóstico diferencial entre os tumores benignos e malignos em estádios iniciais pode ser muito difícil. O critério radiológico mais sugestivo de malignidade é o tamanho tumoral. Menos de 1% dos tumores menores que 4cm são malignos, enquanto o diagnóstico de malignidade é feito em cerca de 15% dos tumores maiores que 6cm (2). Adotando-se o critério de 4cm para indicação cirúrgica, a grande maioria dos casos trata-se de adenomas não-funcionantes e, portanto, o tratamento cirúrgico seria desnecessário, mas é realizado devido à ausência de marcadores de malignidade mais específicos (3).

Apesar do diagnóstico de carcinoma da adrenal ser raro, a doença é letal. A mortalidade em 5 anos está entre 15-47% (4). O fator prognóstico mais importante é o estadiamento, conforme proposto por MacFarlane (5) e modificado por Sullivan (6). O prognóstico dos pacientes com doença localizada (estádios 1 e 2) geralmente é muito bom, enquanto os portadores de doença avançada (estádios 3 e 4) apresentam um prognóstico mais reservado (4). A maior parte dos casos encontra-se nos estádios 3 e 4 ao diagnóstico, embora séries mais recentes têm mostrado tendência a um diagnóstico em estádios mais precoces, provavelmente pela maior disponibilidade e melhor qualidade técnica dos exames de imagem (7). O diagnóstico de carcinoma é feito de acordo com sistemas de classificação baseados em critérios clínicos e anátomo-patológicos (8-10). Apesar de apresentarem boa acurácia em pacientes adultos, existem algumas limitações, como a dependência de patologista experiente e a não-concordância entre diferentes patologistas (11), limitações dos escores intermediários (12) e a não aplicabilidade em tumores pediátricos (13,14). Os critérios definitivos de malignidade são a presença de invasão de tecidos e órgãos adjacentes ou metástases. Assim, um marcador de malignidade com maior especificidade e com a capacidade de diferenciar precocemente os casos de má evolução seria de grande utilidade clínica. Com este objetivo, nos últimos anos, foram estudados marcadores imuno-histoquímicos e moleculares, mas até o momento, nenhum deles mostrou-se melhor que os parâmetros clínicos e anátomo-patológicos.

Pouco se sabe acerca dos mecanismos moleculares responsáveis pela tumorigênese adrenocortical. Admite-se que um tumor é o resultado de uma série de eventos genéticos (mutações, deleções, ganhos, rearranjos) e epigenéticos que são acumulados por um determinado clone celular ao longo do tempo. Até o presente momento, a cadeia de eventos que leva ao

desenvolvimento dos tumores adrenocorticais não é totalmente compreendida, embora nos últimos anos muitos trabalhos relacionados ao tema tenham sido publicados. O entendimento desta cadeia de eventos constitui uma oportunidade para a identificação de um marcador precoce de malignidade e para a elaboração de novos protocolos terapêuticos ou mesmo o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento da doença, a exemplo do que já é realidade para outras doenças neoplásicas. A terapêutica do câncer tende a ser cada vez mais individualizada, direcionada especificamente a mecanismos moleculares conhecidos. Esta abordagem provou ser de maior eficácia terapêutica e com menor incidência de efeitos colaterais sistêmicos. Podem ser citados como exemplos os novos tratamentos disponíveis para as leucemias e tumores estromais gastro-intestinais (15,16). O objetivo desta revisão é sintetizar os recentes avanços obtidos no diagnóstico molecular e no conhecimento do processo de tumorigênese das neoplasias adrenocorticais.

### **Mecanismos gerais da tumorigênese**

O processo de tumorigênese é caracterizado por um acúmulo sucessivo de alterações gênicas em determinada linhagem celular. Estas alterações podem ser mutações, deleções, ampliações, translocações e inserções, ou fenômenos epigenéticos que em última análise conferem à célula um funcionamento anômalo, escapando dos mecanismos fisiológicos de controle do crescimento e proliferação celular. Neste processo, alterações vão ocorrendo de maneira aleatória e, quando envolvem a inativação de genes supressores tumorais ou a ativação de proto-oncogenes, conferem às células tumorais vantagens seletivas em relação às demais. Ocorre expansão deste clone e mais alterações gênicas vão sendo acumuladas, à medida que os ciclos de replicação vão se sucedendo. Um tumor, então, é o resultado de diversos ciclos de replicação celular, acúmulo de mutações e expansão clonal, de tal maneira que os clones que o compõem são o resultado de um processo de seleção semelhante à teoria da evolução das espécies proposta por Darwin (17). De acordo com o conceito proposto por Hanahan (18), no processo de tumorigênese, as células tumorais adquirem progressivamente habilidades que as distinguem das células normais, conforme alterações genômicas são acumuladas ao longo do tempo. Estas habilidades adquiridas, comuns a todas as neoplasias, são enumeradas a seguir: auto-suficiência de sinais proliferativos, insensibilidade a sinais inibitórios, potencial replicativo ilimitado, escape dos mecanismos de apoptose, angiogênese sustentada, invasão e metástases (as duas últimas, exclusi-

vas dos tumores malignos). A ordem temporal na qual as habilidades são adquiridas, bem como o número de alterações genéticas necessárias, é extremamente variável. O repertório de alterações capazes de fazer a célula adquirir tais habilidades são múltiplos, mas não infinitos, e o conhecimento acerca destes está se acumulando rapidamente na literatura oncológica, principalmente através de estudos que avaliam a expressão gênica de maneira global (por exemplo, *microarrays* [19], SAGE [20]). Estes estudos têm permitido melhor caracterização de mecanismos moleculares, conhecidos ou não, que estão implicados em processos não só de tumorigênese, mas de fenômenos complexos, como resistência à quimioterapia ou formação de metástases. Apesar dos dados relativos à tumorigênese adrenal ainda serem escassos quando comparados à outras neoplasias, nas últimas décadas surgiram diversos estudos com o objetivo de elucidar alterações moleculares envolvidas no processo de tumorigênese adrenocortical. A seguir, faremos uma síntese das principais alterações descritas.

### Alterações cromossômicas

Desde os primeiros estudos anátomo-patológicos é conhecido que as neoplasias adrenocorticais apresentam diversas alterações morfológicas nucleares, como múltiplas figuras de mitoses atípicas e anisocariose bastante evidente. Os estudos de citologia de fluxo e citogenética corroboram estas observações, mostrando que principalmente os carcinomas apresentam alto grau de aneuploidia. Estas alterações refletem o intenso grau de instabilidade cromossômica que existe nestes tumores, que segundo Hanahan é fundamental para que todas as etapas do processo de tumorigênese sejam cumpridas. Os mecanismos moleculares que

causam este fenômeno são pouco conhecidos, mas presume-se que podem ser o resultado de alterações em centenas de genes (21). Como resultados desta instabilidade, ocorrem ganhos e perdas cromossômicas, bem como rearranjos e ampliações de determinadas regiões. Estas alterações podem ser observadas por métodos citogenéticos, desde cariótipo propriamente dito até técnicas mais sofisticadas como FISH (*fluorescence in-situ hybridization*), estudos de marcadores polimórficos e CGH (*comparative genome hybridization*). Os poucos estudos de cariótipo em tumores adrenocorticais permitem a observação de alterações estruturais múltiplas nos carcinomas (22,23). A fim de caracterizar estas alterações, no final da década de 90 surgiram alguns estudos baseados em CGH. Esta técnica permite avaliar regiões cromossômicas que sofreram deleções ou ampliações, através da hibridização do DNA tumoral versus um DNA controle (sangue periférico) em uma lâmina contendo preparações de cariótipo humano normal em metáfase (24). Admite-se que regiões cromossômicas que sofrem ampliações devam conter potenciais oncogenes, e as que sofreram deleções, genes supressores tumorais. A tabela 1 mostra os achados dos principais estudos disponíveis na literatura (25-30). Os resultados mostram algumas discrepâncias, sobretudo nos tumores de adultos. Neste grupo, os adenomas apresentaram menor número de alterações cromossômicas que os carcinomas e também foi observada correlação entre tamanho tumoral e número de alterações, chegando a atingir significância estatística. Chamou a atenção a relação positiva entre agressividade da doença e o número de alterações presentes (25,30). Os dois trabalhos que estudaram crianças mostram resultados semelhantes: número de alterações

**Tabela 1.** Estudos de CGH em tumores adrenocorticais.

	Ganhos Cromossômicos e regiões envolvidas		Perdas Cromossômicas e regiões envolvidas	
	Adenomas	Carcinomas	Adenomas	Carcinomas
Kjellman, 1996 (25)		4 e 5		17p, 11q, 2
Figueiredo, 1999 (26)	9q34, 5p, 5q, 6p, 6q, 8p, 8q, 10p, 11q, 12q, 13q, 14q, 15q, 16, 18q, 19, 20q		2,3,4, 9p, 11, 13q, 18, 20p, Xq	
James, 1999 (27)		9q34		2q, 22q, 4
Zhao, 1999 (28)	17q, 17p	20q, 5q, 9q, 12q, Xq, 4p, 5p	1p, 9p, 3p, 2q, 6q, 11q	
Dohna, 2000 (29)	4, 5, 7, 8, 9q34, 11q, 12q, 14q, 16, 17q, 19, 20, 22q			9p
Sidhu, 2002 (30)	4q, 5, 2	5p, 5q, 12p, 12q, 19, 4	1p, 17p	1p, 17p, 2q, 11q, 22

\*Crianças.

equivalentes entre os carcinomas e os adenomas e amplificação do locus 9q34 na maioria dos casos, apesar das casuísticas serem constituídas por indivíduos de grupos étnicos diferentes. Os estudos de CGH corroboram o alto grau de instabilidade cromossômica presente nos tumores adrenocorticais (sobretudo nos carcinomas), além de apontar para mecanismos diferentes de tumorigênese em pacientes adultos e crianças, conforme já sugerido na literatura por observações epidemiológicas (31). As discrepâncias encontradas entre os estudos podem ser explicadas por diferenças metodológicas, diferente background genético entre as casuísticas ou, alternativamente, diferentes alterações gênicas responsáveis pela tumorigênese, conforme sugerido por Hanahan (18). Outro fato interessante deve ser ressaltado: as alterações gênicas presentes nos adenomas também foram encontradas nos carcinomas, reforçando a hipótese de que em alguns casos, os carcinomas surgem a partir dos adenomas que progressivamente acumulam mais mutações (32,33), de maneira análoga ao processo de tumorigênese das neoplasias de cólon (34).

Com base nas alterações identificadas mais comumente, uma lista de genes candidatos pode ser elaborada. Demonstrou-se em estudos posteriores que alguns destes genes sabidamente participam do processo de tumorigênese, como veremos a seguir. Nos tumores pediátricos, possíveis genes-candidatos estão na região 9q34, entre eles, *c-abl* e *SF-1*. De fato, em trabalho recente foram demonstradas amplificações do gene *SF-1* através da técnica de FISH em 8 dos 9 casos estudados, de crianças portadoras de amplificação da região cromossômica 9q34, indicando um possível papel na tumorigênese [35].

Baseado no fato de alguns dos estudos de CGH mostrarem de maneira consistente perda de fragmentos do cromossomo 17p e que nesta região encontra-se o gene *p53*, um supressor tumoral que sabidamente está mutado em cerca de 50% das neoplasias humanas, incluindo os tumores adrenocorticais esporádicos, um estudo recente avaliou perda de heterozigose através de marcadores polimórficos distribuídos por toda a extensão do cromossomo 17. A casuística era constituída por 29 pacientes adultos e crianças, sendo que 16 apresentavam a mutação germinativa *Arg337His*, apontada como responsável pela alta prevalência de tumores adrenocorticais nas regiões sul e sudeste do Brasil, como veremos a seguir. Os achados foram perda de todo o cromossomo 17 tanto em crianças quanto em adultos, tanto em adenomas quanto carcinomas. A frequência de perdas do cromossomo 17 (com conseqüente LOH do locus do *p53*) foi maior

nos pacientes portadores da mutação germinativa, corroborando o mecanismo de perda de heterozigose tecido-específica, na qual é necessário um segundo evento para a inativação do alelo "*wild-type*", conforme proposta por Knudson (36). O mesmo estudo também avaliou perdas nos cromossomos 2, 9 e 11, através do mapeamento de marcadores polimórficos cromossomo-específicos. Foi demonstrada que a perda concomitante dos cromossomos 17, 11, 9 e 2 foi achado exclusivo dos carcinomas, enquanto que perda de heterozigose dos cromossomos 17, 11 e 2 também foi evidenciada em adenomas. Portanto, nos pacientes portadores da mutação *Arg337His*, a transformação maligna parece ter relação com a perda do cromossomo 9, por razões ainda desconhecidas (37).

### Alterações genéticas específicas

Os dados gerados pelos estudos com CGH e a caracterização dos mecanismos moleculares de algumas doenças genéticas que cursam com uma incidência aumentada de tumores adrenocorticais, permitiram a identificação de diversos genes-candidatos que poderiam estar envolvidos no processo de tumorigênese adrenocortical. Nos últimos anos, diversos estudos surgiram com o objetivo de avaliar o envolvimento destes genes no processo. A seguir, relacionaremos as principais alterações gênicas identificadas pelos estudos.

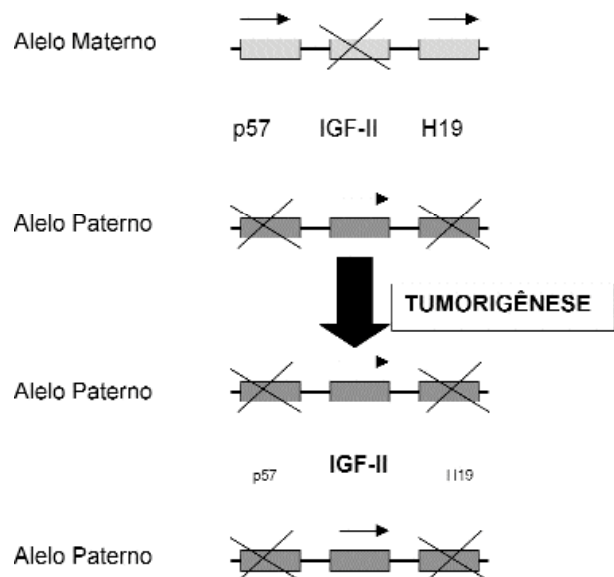
**Gene *p53*:** O gene *p53* é um importante gene supressor tumoral, capaz de promover interrupção do ciclo celular e provocar apoptose, caso haja danos ao material genético das células. Constitui um importante mecanismo de defesa contra as alterações genéticas que levam ao aparecimento de neoplasias. Sua função está alterada em cerca de 50% dos cânceres humanos (38). A síndrome de Li-Fraumeni (OMIM 151623), doença cuja herança é autossômica dominante, caracteriza-se por uma incidência aumentada e em idade precoce de alguns tipos de tumores, como neoplasia de mama, sarcoma, tumores cerebrais e leucemias. O carcinoma adrenocortical ocorre em 3,6% dos casos, sendo a manifestação menos freqüente (39); o mecanismo fisiopatológico responsável pela síndrome são mutações germinativas em heterozigose do gene *p53*. Nos tecidos tumorais ocorre perda do segundo alelo (conforme hipótese de Knudson), fazendo com que células com danos em seu material genético continuem a dividir-se, propagando estas alterações para as células-filhas. Uma nova mutação germinativa do *p53*, recentemente descrita nas regiões sul e sudeste do Brasil, até o momento é a única mutação germinativa do *p53* cujo fenótipo é o de tumorigênese tecido-específica, já que não foi descrita a ocorrência de ou-

tros tumores nos familiares dos afetados. Esta mutação caracteriza-se pela substituição Arg337His no domínio de tetramerização da proteína e encontra-se fora da região *hotspot* para outras mutações descritas (exons 5-8). Mais de 90% dos casos de carcinoma adrenocortical em crianças e 30% dos adultos das regiões Sul e Sudeste apresentam a mutação em heterozigose nos tecidos periféricos, com perda do alelo “*wild-type*” nos tumores (40,41). A presença da mutação explica a incidência aumentada dos tumores adrenais na região Sul do Brasil, que por muitos anos foi atribuída à poluição ambiental. A análise de 2 marcadores polimórficos intragênicos em pacientes portadores de tumores adrenocorticais com a mutação Arg337His demonstrou a co-segregação de dois alelos distintos com o alelo p53 mutado, indicando efeito fundador (42). A mutação não provoca déficits funcionais da proteína em condições fisiológicas, mas em situações extremas de pH e temperatura leva à perda da estabilidade da proteína. Hipotetiza-se que os tumores adrenocorticais de crianças sejam originados de células provenientes da zona fetal, que normalmente apresenta rápida involução após o nascimento à custa de apoptose. Neste processo, atingem-se as condições de temperatura e pH nas quais ocorre a perda de estabilidade da p53 (43). Em tumores esporádicos, foram demonstradas mutações do gene p53 cerca de 20% – 30% dos casos, tanto em adenomas quanto nos carcinomas (44,45), embora estes autores tenham estudado apenas os exons 5-8. Mais recentemente, outro estudo identificou mutações presentes cerca de 70% dos casos de carcinomas adrenocorticais (46).

**IGF-2:** A idéia de que este fator de crescimento pudesse estar envolvido no processo de tumorigênese veio a partir da observação de níveis elevados da proteína em outras neoplasias (por exemplo, tumor de Wilms [47]) e a partir da elucidação do mecanismo fisiopatológico da síndrome de Beckwith-Wiedemann (OMIM 130650). Esta síndrome é caracterizada por organomegalia, onfalocelo, retardo mental e desenvolvimento de algumas neoplasias (rabdomyosarcoma, hepatoblastoma, nefroblastoma e o carcinoma adrenocortical). O mecanismo responsável pela síndrome é a dissomia uniparental da região 11p15.5. Esta região contém um *cluster* de genes que sofrem *imprinting*; entre estes, o próprio IGF-II, que sofre *imprinting* materno, os genes H19, que dão origem a um transcrito não traduzido, e o gene p57, relacionado aos mecanismos de controle do ciclo celular, considerado um supressor tumoral. Ocorre duplicação do alelo paterno e deleção do alelo materno, por mecanismos desconhecidos. Assim, há expressão bialélica do gene

IGF-II e silenciamento dos genes p57 e H19, o que leva a níveis bastante aumentados da proteína IGF-II e à predisposição para a formação de tumores, devido ao silenciamento dos genes regulatórios (figura 1). Em tumores adrenocorticais esporádicos, foi observado um importante aumento da expressão do IGF-II em cerca de 90% dos casos (48). De maneira semelhante ao que ocorre na síndrome de Beckwith-Wiedemann, foi demonstrada duplicação do alelo paterno e perda do materno pelo tecido tumoral (49).

Além do IGF-II, foi também constatado aumento da expressão do IGF1R (receptor do tipo tirosina-quinase, que medeia os efeitos proliferativos do IGF-2) e do IGFBP2 (proteína carreadora que apresenta alta afinidade pelo IGF-II), por tumores adrenocorticais malignos (50,51). Evidências sugerem que o IGFBP2 potencializa a ação do IGF-2 por manter altas concentrações da proteína no ambiente pericelular (52,53). Nos modelos animais de hiperexpressão de IGF-II, ocorre hiperplasia da zona reticulada, acompanhada por aumento da esteroidogênese (54). O IGF-II é um potente estimulador do crescimento das células tumorais adrenocorticais em modelo *in-vitro*. Ocorre proliferação celular intensa mesmo quando uma linhagem celular derivada de carcinoma adrenocortical (a célula NCI-H295R) é mantida em



**Figura 1.** Representação esquemática de 3 alelos importantes envolvidos no processo de tumorigênese, pertencentes ao locus 11p15: **A** - Na adrenal normal, tanto os alelos paternos quanto os maternos estão presentes, mas apenas um dos alelos é expresso devido ao mecanismo de *imprinting* genômico; **B** - No processo de tumorigênese ocorre perda do alelo materno e duplicação do alelo paterno, o que leva à expressão bialélica do IGF-II e silenciamento dos genes p57 e H19.

meio de cultura em ausência de soro fetal. A hipótese de que o IGF-II atuaria de maneira parácrina ou autócrina no próprio tumor foi confirmada pelo mesmo estudo a partir da inibição do crescimento celular quando as células em cultura eram tratadas com anticorpos anti-IGF2 ou anti-IGF1R (55).

**Proteína G:** A proteína G liga-se aos receptores de 7 domínios transmembrana, uma importante via de sinalização intracelular no sistema endócrino. É formada por 3 sub-unidades: a alfa, que exerce função catalítica, e as sub-unidades gama e delta, de papel regulador. Mutações ativadoras da sub-unidade alfa levam a uma sinalização intracelular alterada, e em alguns casos é capaz de promover proliferação celular, funcionando como um oncogene (56). A síndrome de McCune-Albright (OMIM 174800) é caracterizada por puberdade precoce independente de gonadotrofinas, associada à manchas café-com-leite e displasia óssea. Como manifestações da síndrome podem ocorrer hipertireoidismo primário, causado por adenomas tóxicos, síndrome de Cushing ACTH-independente, adenomas hipofisários, cistos ovarianos funcionantes e displasia óssea. A síndrome é causada por mutações ativadoras da sub-unidade  $G\beta_s$ , ocorrendo no período pós-zigótico, levando a um quadro de mosaïcismo. O portador é um mosaico de duas linhagens celulares: uma normal e outra afetada pela mutação. O estado de ativação constante da proteína  $G\beta_s$  leva a uma maior atividade da adenilato-ciclase, com acúmulo intracelular de cAMP e ativação da proteína quinase A. Esta pode levar tanto à hiperfunção endócrina quanto a um aumento da proliferação celular, dependendo da linhagem afetada (56). Em tumores esporádicos hiperfuncionantes de outros órgãos do sistema endócrino, foi mostrada presença de mutações ativadoras da proteína  $G\beta_s$  em adenomas tóxicos da tireóide esporádicos e adenomas hipofisários produtores de GH (57). Nos tumores adrenocorticais, entretanto, estas mutações não foram descritas, exceto por um estudo japonês, que identificou mutação ativadora em um aldosteronoma (58). Um único estudo identificou mutações da proteína  $G\beta_{12}$  em casos de adenomas adrenocorticais (59), achado não confirmado por estudos posteriores (60,61). Outro estudo identificou mutações ativadoras da proteína  $G\beta_s$  em casos de hiperplasia macronodular adrenal (62). Além das mutações ativadoras, a expressão ectópica de receptores ligados à proteína G pode ser responsável pela formação de nódulos adrenocorticais hiperfuncionantes. Nos pacientes portadores de hiperplasia macronodular foram verificados níveis aumentados de receptores de angiotensina-1, LH, 5-HT, GIP e  $\beta$ -

adrenérgicos. Potencialmente, os antagonistas específicos destes receptores seriam capazes de reduzir a hiperfunção destes nódulos (63).

**Receptor do ACTH (MC2R):** O MC2R é do tipo 7 domínios transmembrana, associado à proteína G. Em estados onde ocorre estímulo crônico pelo ACTH, com conseqüente ativação do MC2R (como na doença de Cushing ou na hiperplasia adrenal congênita) há formação de nódulos e aumento do volume das adrenais. Além disso, em casos de nódulos hiperfuncionantes da tireóide, foram descritas mutações ativadoras somáticas do receptor de TSH (64). Hipotetizou-se que mutações ativadoras do receptor de ACTH pudessem estar envolvidas no processo de tumorigênese adrenocortical. Contudo, os estudos não identificaram mutações ativadoras do MC2R em tumores adrenocorticais malignos e benignos (65,66). Adenomas produtores de cortisol e aldosteronomas podem apresentar níveis de expressão aumentados do receptor, justificando o padrão de resposta ao estímulo com ACTH exógeno. Um estudo posterior mostrou que tumores adrenocorticais nos quais havia deleção do gene MC2R apresentaram pior evolução clínica. Histologicamente, estes tumores eram mais indiferenciados (67). Mutações ativadoras do MC2R, portanto, não parecem participar do processo de tumorigênese. Sua ativação induz aumento da esteroidogênese e inibição da proliferação celular em modelos *in-vitro*. Estudos recentes mostraram que outro peptídeo derivado do POMC tem um potente efeito mitogênico em células adrenocorticais. Este peptídeo é um produto de clivagem proteolítica do pro-gama-MSH, feita por uma serina-protease (AsP) expressa no tecido adrenal (68). As vias de sinalização e controle deste mecanismo permanecem desconhecidas até o presente momento, mas parecem serem mediadas pelo SF-1 e sua ativação pode ter papel na tumorigênese (69).

**Proteína quinase A (PKA):** A via da proteína quinase A é uma das principais vias de sinalização intracelular do sistema endócrino. Estruturalmente, a PKA é um tetrâmero constituído por duas sub-unidades catalíticas e duas unidades regulatórias. Na ausência de estímulo as sub-unidades catalíticas são mantidas em seu estado inativo pelas sub-unidades reguladoras. Na presença de níveis elevados de cAMP, ocorre liberação da sub-unidades catalíticas, tornando-as ativas. Foram caracterizadas algumas doenças cujo mecanismo fisiopatológico é causado por disfunção em componentes desta via. O complexo de Carney (OMIM 160980) é uma síndrome caracterizada pela presença de mixomas cardíacos e cutâneos, tumores testiculares e pituitários e síndrome de Cushing ACTH

independente causada por hiperplasia micronodular pigmentosa das adrenais. A síndrome é causada por uma mutação inativadora do gene da sub-unidade regulatória A1 da PKA (gene PKARIA), o que leva a uma atividade aumentada das sub-unidades catalíticas. Foi demonstrada perda de heterozigose do locus do PKARIA nos tecidos tumorais de pacientes portadores de complexo de Carney, sugerindo um possível papel de gene supressor tumoral (70,71). Em adenomas adrenocorticais esporádicos, foram identificadas mutações somáticas no gene da PKARIA em alguns dos casos estudados. Estes pacientes apresentavam quadro clínico e laboratorial de síndrome de Cushing, muito semelhante aos portadores da hiperplasia micronodular pigmentosa do complexo de Carney (72). O mesmo estudo mostrou freqüentes deleções no locus 17q22-24 tanto em adenomas quanto em carcinomas. Um estudo recente mostra perda da expressão da sub-unidade PKAR2B em adenomas produtores de cortisol (Vincent-Dejean, 2005 – pôster P1-445, apresentado no ENDO 2005 – San Diego, EUA).

**MENIN:** A MEN-1 (neoplasias endócrinas múltiplas tipo 1) — OMIN 13100 — é uma síndrome de herança autossômica dominante, caracterizada pela associação de hiperparatireoidismo primário, associada a tumores hipofisários e do pâncreas. Outras manifestações incluem carcinóides brônquicos e tumores adrenocorticais (em até 40% dos casos [73]), a maior parte das vezes adenomas assintomáticos, mas há descrição de casos de carcinoma. A síndrome é causada por mutações em homozigose do gene MENIN. Estas podem ocorrer *de novo* ou são transmitidas às células germinativas. O desenvolvimento tumoral ocorre quando há perda do alelo selvagem nos tecidos tumorais, conforme a hipótese de Knudson. A função exata do gene MENIN não é totalmente compreendida, mas interage com o fator de transcrição JunD, modulando a função deste (74). Alguns trabalhos estudaram o papel de mutações somáticas do gene MENIN no desenvolvimento de tumores esporádicos da paratireóide, pâncreas e hipófise. Mutações somáticas do gene MENIN foram descritas em até 50% dos casos, associada com LOH do alelo normal, sendo um mecanismo de inativação do MENIN semelhante ao que ocorre no NEM-1. Porém, em tumores adrenocorticais esporádicos malignos e benignos, foi encontrada apenas uma mutação em 30 casos estudados, embora deleções do locus 11q13 foram achados freqüentes, sobretudo nos carcinomas (75). Um estudo posterior analisou a expressão do mRNA do gene MENIN em 25 casos de tumores adrenocorticais esporádicos (19 adenomas e 6 carcinomas), sendo

encontrada expressão do MENIN reduzida em apenas 1 caso de carcinoma (76). Portanto, ao contrário do que ocorre nos correlatos esporádicos de outros tumores associados ao NEM-1, mutações somáticas do gene MENIN não são achados freqüentes em tumores adrenocorticais, embora haja associação entre LOH do locus 11q13 e carcinomas. Este fato provavelmente é reflexo do fenômeno de instabilidade cromossômica, uma vez que regiões bem maiores do cromossomo 11 e de outros cromossomos estão freqüentemente deletados, embora exista a possibilidade da perda de função de algum supressor tumoral desconhecido localizado no cromossomo 11.

**GATA-4 e GATA-6:** Os fatores de transcrição da família GATA são proteínas relacionadas à organogênese, proliferação e diferenciação celular e apoptose em diferentes tecidos. Existem 6 representantes desta classe de fatores de transcrição, que apresentam em comum uma estrutura de dedo de zinco, altamente conservada entre as espécies. Os fatores GATA 1, 2 e 3 predominam no tecido hematopoiético, enquanto os fatores GATA 4, 5 e 6 são expressos em pulmões, fígado, trato gastro-intestinal, hipotálamo, gônadas, adrenais e pituitária (77,78). Nas gônadas, aumento na expressão de GATA-4 acompanha períodos onde há aumento da proliferação das células de Sertoli e granulosa, e a estimulação de tecido ovariano imaturo por gonadotrofinas resulta em aumento da expressão de GATA-4 (79,80). O GATA-4 parece proteger as células da granulosa da apoptose e níveis reduzidos de expressão associam-se à atresia folicular (81). Nas adrenais, tanto em ratos como em humanos, há expressão do GATA-4 principalmente no período fetal, enquanto o GATA-6 é expresso tanto no período fetal quanto em adultos (82). Em um modelo murino que desenvolve espontaneamente tumores adrenocorticais, há abundante expressão do GATA-4 no tecido tumoral, acompanhada por baixos níveis do GATA-6 (83). Um estudo recente avaliou a expressão dos fatores de transcrição GATA-4 e GATA-6 em tumores adrenocorticais humanos malignos e benignos. Porém, diferentemente do que ocorre no modelo animal, tanto as adrenais normais estudadas quanto a linhagem de células tumorais, bem como os tumores, apresentaram expressão de GATA-6 positiva. Os níveis de expressão de GATA-4 também foram detectados em adrenais normais e células NCI-H295R. Tanto os tumores malignos quanto os benignos expressaram GATA-4, mas os primeiros apresentaram níveis de expressão significativamente mais elevados. Também foi notável uma relação inversa entre a expressão de GATA-4 e a do receptor de LH. Houve também uma menor

expressão do GATA-6 pelos tumores malignos, comparados aos benignos e adrenais normais. Baseados nos dados de expressão do GATA-4, foi proposto um *cut-off* capaz de separar os tumores malignos dos benignos, com alguns falso-negativos (4 de 10 tumores malignos) (84). Um estudo posterior avaliou a expressão do GATA-6 em tumores adrenocorticais benignos e malignos (85), através de imuno-histoquímica e *north-ern-blot*, correlacionando a expressão do fator com o SF-1, CYP-17 e p21. Em geral, foram encontrados menores níveis de expressão do GATA-6 pelos carcinomas (exceto os tumores virilizantes, que expressavam os maiores níveis dentre os tumores malignos). Houve uma relação inversa entre o *score* de Weiss e o nível de expressão do GATA-6, bem como uma relação direta entre seus níveis de expressão e os do CYP17, sugerindo a importância do fator na manutenção da diferenciação celular. Foi notada também relação direta entre o nível de expressão de SF-1 e o do GATA-6, mostrando a inter-relação entre as duas proteínas, conforme previamente sugerido na literatura (86). Os fatores de transcrição da família GATA, portanto, além de apresentarem papel importante no desenvolvimento e na regulação da proliferação e diferenciação celular da adrenal adulta, parecem também estar envolvidos no processo de tumorigênese da supra-renal, afetando principalmente os processos de diferenciação celular e apoptose. Conforme sugerido pelos estudos, são potenciais marcadores de malignidade.

**Inibinas e ativinas:** As inibinas e ativinas são glicoproteínas diméricas pertencentes à superfamília do TGF-beta de fatores de crescimento. As inibinas são constituídas pela combinação de uma sub-unidade alfa com uma beta ( $\beta_A$  ou  $\beta_B$ , formando as inibinas A e B, respectivamente) e as ativinas por duas sub-unidades beta ( $\beta_A\beta_A$ ,  $\beta_B\beta_B$  ou  $\beta_A\beta_B$  são as ativinas A, B e AB, respectivamente). As inibinas são expressas nos tecidos esteroideogênicos (ovários, testículos e adrenais), na placenta e na hipófise, enquanto as ativinas apresentam uma expressão mais ubíqua. Tanto as ativinas quanto as inibinas atuam de maneira autócrina e parácrina (87-89). Enquanto o papel das inibinas é mais restrito aos tecidos onde são expressas e basicamente estão envolvidas em mecanismos regulatórios de secreção hormonal, as ativinas participam de diversos mecanismos fisiológicos, desde organogênese até crescimento ósseo, cicatrização e sobrevivência neuronal. As ativinas atuam através de receptores específicos (ActRIA, ActRIB e ActRIIA e ActRIIB). Os efeitos intracelulares desta via de sinalização são os fatores de transcrição Smad2 e Smad3, os mesmos envolvidos na sinalização da via do TGF-beta. As ini-

binas são capazes de antagonizar a resposta fisiológica às ativinas em diversas situações, presumivelmente por um efeito dominante negativo causado pela interação destas com os receptores de ativinas ou supostamente através de um receptor próprio cujas vias intracelulares não são conhecidas. O papel das ativinas e inibinas como reguladores da função adrenocortical é pouco conhecido. O tratamento de células adrenocorticais em cultura com ativinas produz redução da proliferação celular e apoptose, além de aumentar a síntese de cortisol estimulada por ACTH (90-92). A adição de inibinas não promove nenhum efeito direto sobre células adrenocorticais em cultura, porém estas devem de alguma forma participar de processos regulatórios da função adrenocortical, uma vez que em adrenais normais apresentam uma distribuição zonal característica, com predomínio na zona reticular (93), e o estímulo com ACTH aumenta a expressão de inibinas em células adrenocorticais em cultura (94). Observações feitas a partir de alguns estudos revelaram LOH do braço longo do cromossomo 2 em tumores de ovários e próstata, sugerindo um possível gene supressor tumoral nesta região. Os estudos de CGH em tumores adrenocorticais, conforme discutido anteriormente, mostram de maneira consistente deleções no locus 2q. Além da própria cadeia alfa da inibina, este locus contém outros genes pertencentes à via de sinalização das ativinas (sub-unidade  $\beta_B$  e os receptores ActRI e ActRII). Dadas as semelhanças entre os efeitos fisiológicos das ativinas e do TGF-beta, que é reconhecido como importante gene supressor tumoral, presume-se que as ativinas e suas vias de sinalização também são supressores tumorais. Alterações em componentes da via de sinalização do TGF-beta foram descritas em diferentes neoplasias humanas. Por exemplo, virtualmente todos os casos de tumores pancreáticos e cerca de 83% dos tumores cólo-retais apresentam alterações de algum componente da via (95,96). Há evidências que níveis de expressão reduzidos de receptores de ativinas estão associados à progressão maligna em tumores prostáticos e mutações do receptor ActRIB foram descritas em tumores pancreáticos (97,98). Algumas evidências sugerem um papel de supressor tumoral para o gene da cadeia alfa da inibina. Foi descrito um modelo de rato *knock-out* para a sub-unidade alfa, que desenvolve espontaneamente tumores gonadais e tumores adrenocorticais (99). A ausência da cadeia alfa foi determinante para o processo de tumorigênese, mas outros fatores estão envolvidos, uma vez que em ratos cuja secreção de gonadotrofinas era deficiente, não havia formação dos tumores gonadais e adrenocorticais (100). Alguns tumores,



como os de próstata e os de células granulosas dos ovários, apresentam expressão diminuída da sub-unidade alfa, associadas à LOH do locus 2q (101-103). Outros tumores caracteristicamente apresentam níveis elevados, como os de células germinativas de ovários, testículos e os tumores adrenocorticais, sobretudo nos produtores de andrógenos (104). Portanto, os mecanismos relacionados à tumorigênese dos tumores adrenocorticais humanos diferem do modelo animal descrito por Matzuk e cols. Não há evidências que sugiram a participação direta da cadeia alfa no processo e seu significado pode ser apenas o de marcador. Recentemente, foram descritos casos de carcinomas adrenocorticais mais agressivos em que há expressão diminuída da sub-unidade alfa, podendo significar desdiferenciação celular (93). Um único estudo descreve mutações da cadeia alfa em tumores adrenocorticais. Foram avaliadas mutações do gene da cadeia alfa, perda de heterozigose do locus 2q no tecido tumoral e a presença da mutação germinativa Arg337His. Nos casos estudados, 8 dos 9 pacientes apresentaram LOH do locus 2q no tecido tumoral. Destes, 50% apresentaram mutações *missense* no gene da cadeia alfa, não presentes na população controle. Estes achados sugerem participação da cadeia alfa da inibina no processo de tumorigênese, principalmente quando associada a outras alterações gênicas de baixa penetrância (neste caso, a mutação Arg337His) (105).

**Outros genes:** Estudos recentes identificaram genes cuja expressão encontra-se alterada em tumores adrenocorticais. O gene AKR1B1 normalmente apresenta níveis elevados de expressão na supra-renal. Codifica a enzima aldose redutase regulada por cAMP. Sua função na adrenal é a de reduzir radicais tóxicos gerados pelo processo da esteroidogênese e peroxidação lipídica, como o isocaproaldeído. Foram verificados níveis de expressão bastante reduzidos nos carcinomas, quando comparados à glândula normal e adenomas. Ainda não foi estabelecido se esta redução participa diretamente do processo de tumorigênese ou é apenas um marcador de perda de diferenciação celular. Por apresentar níveis de expressão tão reduzidos nos carcinomas, é um potencial marcador de malignidade, mas estudos maiores são necessários (106). O gene *nov* (*nephroblastoma overexpressed*) pertence à família CCN. Seus papéis incluem regulação da proliferação celular, quimiotaxia, formação de matriz extracelular e quimiotaxia, tanto durante os processos de organogênese e embriogênese quanto nos processos de inflamação e reparo (107). Em tumores de Wilms, ocorre relação inversa entre a expressão do supressor tumoral WT1 e o *nov* (108). Em tumores adrenocorticais

malignos e benignos, foram verificadas alterações nos padrões de glicosilação da proteína e alterações de peso molecular, com o aparecimento de isoformas mais leves, resultante de proteólise, principalmente nos carcinomas. Foi mostrada também importante redução da expressão, inversamente proporcional aos níveis de IGF-II nos casos de tumores malignos (109). O papel exato deste gene não é conhecido, mas há indícios de que influencie a adesividade celular, principalmente através de interações com proteínas na matriz extracelular (110). Nas adrenais, parece ter papel de gene supressor tumoral e as alterações são detectadas precocemente no processo de tumorigênese (109). O gene p57 encontra-se no locus 11p15 e, ao contrário do IGF-II, sofre *imprinting* paterno. Sua função é o bloqueio do ciclo celular em G1 através da interação com o complexo CDK-ciclina. Tem, portanto, um papel de supressor tumoral. Foi verificada a expressão deste gene em tumores adrenocorticais malignos e benignos. Enquanto os tumores benignos apresentaram níveis de expressão semelhantes aos da adrenal normal, os tumores malignos e os virilizantes apresentaram redução importante dos níveis de mRNA. Foi verificada uma relação inversa entre a expressão de IGF-II e a do p57, o que está de acordo com o mecanismo molecular proposto para a hiperexpressão de IGF-II pelos tumores adrenocorticais (111). Um estudo posterior demonstrou aumento da expressão da ciclina E, CDK2 e CDK4, concomitante à redução na expressão do p57, nos tumores adrenocorticais malignos que apresentaram níveis elevados de IGF-II (112). Outro estudo avaliou especificamente a expressão da ciclina E através de imuno-histoquímica. Foi encontrada co-relação entre a expressão aumentada de ciclina E e o *score* de Weiss, o tamanho tumoral, a presença de outras alterações genéticas como LOH do locus 17p13, hiperexpressão do IGF-II e menor intervalo livre de doença (113). O gene p16 também é um supressor tumoral relacionado ao ciclo celular. Um estudo mostrou através de microssatélites que em cerca de 40% dos casos de carcinoma adrenocortical, este supressor, que localiza-se no locus 9p21, encontra-se deletado e seus níveis de expressão avaliados por imuno-histoquímicas bem suprimidos, ao contrário do que ocorre nos adenomas (114). Um estudo recente avaliou a expressão dos fatores de transcrição CREM e CREB, que fazem parte da via final de sinalização através da proteína kinase A. A fosforilação dos fatores de transcrição pela proteína promove sua ativação, com conseqüente ligação aos elementos responsivos no núcleo da célula e alteração da transcrição gênica. Foi encontrada redução importante do CREB em

casos de carcinoma adrenocortical (115). Um estudo posterior mostrou a expressão do CREB através de *western-blot*, encontrando níveis reduzidos da proteína em casos de carcinomas e adenomas adrenocorticais não secretores. O mesmo estudo verificou a expressão do CREB pela adrenal fetal, encontrando níveis reduzidos quando comparados aos da adrenal adulta (116). Outra proteína que está relacionada ao processo de tumorigênese é a enzima telomerase. Sua ativação confere à célula um fenótipo de capacidade replicativa indeterminada. Um estudo recente avaliou a atividade da telomerase em casos de carcinoma e adenomas, encontrando um aumento importante da atividade enzimática nos casos de carcinoma. Embora o número de casos deste estudo tenha sido limitado, não houve sobreposição entre os dois grupos, de acordo com a atividade da telomerase (117).

**Invasão e metástases:** Embora algumas das alterações genéticas descritas anteriormente sejam eventos observados com maior frequência nos carcinomas, quando analisadas sob o aspecto funcional, de acordo com o mecanismo de tumorigênese proposto por Hanahan, as “habilidades” que elas conferem às células são comuns tanto a tumores malignos quanto benignos. A maior parte das alterações descritas promove aumento da proliferação celular, seja por auto-suficiência de sinais replicativos (como no caso da hiperexpressão do IGF-II), insensibilidade aos sinais inibitórios (como na deleção do receptor MC2R) ou escape da apoptose (alterações do p53). A única “habilidade” que é exclusiva dos tumores malignos é a capacidade de invasão e metástases. Nos últimos anos, foram descritos diversos mecanismos moleculares que levam uma célula a tornar-se capaz de romper os limites do próprio órgão, invadir tecidos vizinhos, ganhar a corrente sanguínea ou linfática e estabelecer colônias em sítios distantes (uma revisão completa sobre o assunto é a referência [118]). Os mecanismos que levam à invasão e formação de metástases envolvem perda da adesividade celular, migração celular, quimiotaxia e proteólise de elementos da matriz extracelular. Existem poucos estudos avaliando o *status* destas vias em tumores adrenocorticais. Uma das principais alterações descritas em diversos tipos de tumores metastáticos é a expressão aumentada de um grupo de enzimas que apresentam homologia estrutural e são capazes de degradar elementos da matriz extracelular. Este grupo de enzimas é conhecido como metaloproteases. Fisiologicamente, participam de processos onde ocorre remodelação da matriz extracelular, como a organogênese, migração celular, angiogênese, inflamação e reparo. Normalmente, este

grupo de enzimas apresenta níveis de expressão muito baixos e finamente controlados. No processo de invasão e metástases há necessariamente aumento de expressão destas enzimas, levando a um quadro de aumento da atividade proteolítica que se mantém ao longo do tempo, causando sérios danos aos tecidos e permitindo às células neoplásicas a propriedade de invasão. A atividade das metaloproteases também é responsável pela ativação local de diversos fatores de crescimento e fatores quimiotáticos, que vão cooperar para o crescimento tumoral (119). Há diversos exemplos de pior prognóstico associado à expressão aumentada deste grupo de enzimas em diversas neoplasias (120,121). Em casos de tumores adrenocorticais, existem poucos estudos disponíveis que avaliam o papel destas enzimas no processo de invasão e metástases. Um estudo avaliou a expressão de MMP-2 (gelatinase A) e MT1-MMP (metaloprotease de membrana do tipo 1) em tumores adrenocorticais malignos e benignos através da técnica de hibridização *in-situ* (122). Foi encontrada uma expressão aumentada tanto da MMP-2 quanto da MT1-MMP na maior parte dos casos de carcinoma, enquanto a maior parte dos adenomas apresentava expressão negativa para as enzimas.

### **Microarrays**

A doença neoplásica é caracterizada pela presença simultânea de múltiplas alterações genéticas. O estudo de uma via isolada, apesar de trazer informações importantes, apresenta limitações. Os *microarrays* (19) permitem a avaliação da expressão gênica de maneira global, com dados relativos à expressão de milhares de genes em um único experimento. A análise destes dados gera determinados “perfis de expressão” ou “assinaturas”, o que permite uma classificação dos tumores de acordo com diversos aspectos da sua biologia, do ponto de vista molecular. A aplicação desta classificação molecular é muito ampla e vai desde a predição de prognóstico em casos de neoplasias em estádios iniciais até a predição de resposta a determinado tipo de tratamento, permitindo a seleção de determinados casos que poderiam se beneficiar de uma determinada modalidade terapêutica (123). No caso dos tumores adrenocorticais, existem dois trabalhos disponíveis na literatura que avaliam a expressão gênica através da técnica de *microarray*. No estudo realizado por Giordano e cols. (124), objetivou-se a identificação dos genes que apresentavam a maior diferença de expressão entre tecidos adrenocorticais malignos (carcinomas) e benignos (adenomas, hiperplasias e adrenais normais), partindo-se de uma plataforma de *microarray* contendo 10.500 transcritos. O estudo foi

capaz de agrupar de maneira correta todos os casos de carcinoma, com base em seus perfis de expressão. Dentre os genes diferencialmente expressos pelos carcinomas, destacam-se o IGF-II, que apresentou a maior diferença de expressão entre os dois grupos – cerca de 100 vezes, confirmando a importante participação deste fator de crescimento no processo de tumorigênese adrenocortical. Destaca-se também a osteopontina, relacionada à interação entre célula neoplásica e matriz extracelular, aurora 2, relacionado com instabilidade cromossômica, e angioportina 2, relacionado à angiogênese. Dentre os adenomas, os genes que apresentam maiores níveis de expressão são os relacionados à esteroidogênese e metabolismo de esteróides, refletindo o maior grau de diferenciação celular destas neoplasias. Neste estudo não foi feita a correlação com o prognóstico. O estudo de Fraipont e cols. (125) avaliou uma amostra de 33 adenomas e 24 carcinomas através de uma plataforma de *microarray* em que foram selecionados 230 genes conhecidos, sendo que 34 eram transcritos específicos do córtex adrenal e 187 eram genes ligados ao câncer (entre estes, genes relacionados ao controle do ciclo celular, fatores de crescimento e seus receptores e moléculas de adesão). Os genes cuja expressão estava relacionada a um mau prognóstico puderam ser agrupados em 2 *clusters*: o *cluster* do IGF-II, (formado principalmente por fatores de crescimento e seus receptores, destacando-se o próprio IGF-II e o TGF-beta) e o *cluster* “esteroidogênico” (constituído principalmente por enzimas relacionadas à esteroidogênese e outras proteínas, destacando-se a cadeia alfa da inibina e o CREM). Tanto a baixa expressão do cluster esteroidogênico quanto a alta expressão do *cluster* IGF-II foram fatores de mau prognóstico. A classificação dos tumores feita pela combinação dos dois *clusters* (alta expressão do cluster do IGF-II associado à baixa expressão do cluster esteroidogênico) permitiu a identificação dos tumores que apresentaram má-evolução com uma acurácia semelhante aos critérios de Weiss. Dentre os carcinomas foi possível a identificação de 14 genes diferencialmente expressos nos casos que evoluíram com recidiva e metástases. Dentre estes, destacam-se genes relacionados ao sistema imunológico, como o receptor de IL-2, moléculas de adesão, como a integrina  $\beta 2$ , o GAPDH, suposto gene “*housekeeping*” e o gene fos. Este estudo corrobora o papel de alguns marcadores que já haviam sido identificados, como o IGF-II por exemplo, e também demonstra a utilidade de classificar os tumores de acordo com seus perfis de expressão e o potencial de identificar novos genes candidatos associados à má evolução, bem como novos alvos terapêuti-

cos. Os novos conhecimentos gerados por estes dois estudos, embora ainda restritos pelo número pequeno de casos, ilustram bem o enorme potencial dos *microarrays*, toda sua versatilidade e aplicabilidade. Estudos posteriores com uma maior casuística, incluindo também crianças, certamente trarão ainda muitos conhecimentos sobre a aspectos biológicos relevantes destas neoplasias.

### Perspectivas futuras

Nos últimos anos, foram caracterizados diversos genes cuja função encontra-se alterada nos tumores adrenocorticais. Isto tem possibilitado avanços no conhecimento acerca do processo de tumorigênese adrenocortical, apesar de este ainda apresentar vários aspectos não conhecidos. Um dos potenciais benefícios que é uma consequência direta do conhecimento que vem sendo acumulado, é a criação de um sistema de classificação que permita fazer o diagnóstico diferencial entre tumores malignos e benignos em seus estádios iniciais, o que sem dúvida permitiria uma melhor seleção da terapêutica mais adequada para cada paciente individualmente, poupando muitos de um tratamento mais agressivo realizado de maneira desnecessária. Como nenhum dos genes estudados isoladamente mostrou uma performance melhor que a dos marcadores anátomo-patológicos, uma estratégia interessante é a de estudar marcadores conhecidos simultaneamente. Um dos maiores obstáculos para a criação de tal sistema de classificação é a própria raridade da doença. São necessários muitos anos para que um número razoável de casos com um tempo de seguimento satisfatório seja acumulado para que um estudo que leve a resultados com significância estatística possa ser realizado. É necessário, então, um esforço conjunto entre os diversos centros de referência do país que tratam destes pacientes, no sentido de criar-se um banco de dados e tecidos nacional, na tentativa de melhor estudar esta patologia. Além disso, avanços tecnológicos como o *microarray*, SAGE e técnicas de proteômica permitirão não apenas a criação de um sistema de classificação mais preciso, baseado em dados moleculares, mas também um melhor entendimento sobre o processo da tumorigênese como um todo e o desenvolvimento de terapias mais eficientes para os casos de carcinoma, que permanece como uma doença de alta letalidade, com opções terapêuticas restritas, sendo praticamente as mesmas desde a década de 1940.

### Conclusão

A tumorigênese adrenal é um fenômeno complexo e,

apesar do grande número de informações que foram incorporados nas últimas décadas, a cadeia exata de eventos que leva à formação de um tumor adrenocortical permanece desconhecida, mas se mostrou mais heterogênea do que se imaginava, sendo que provavelmente não há um mecanismo único de tumorigênese, mas diversos eventos ocorrendo em paralelo e sem uma ordem específica, sendo o resultado final a formação de um tumor com características únicas. Alguns eventos, como a hiperexpressão do IGF-II e a LOH do locus 17p13 parecem ser fundamentais, mas provavelmente existe a colaboração de outros fatores genéticos e possivelmente ambientais para que as mutações sejam acumuladas e os tumores se desenvolvam. Um sistema de classificação baseado em dados moleculares permitiria não só uma maior capacidade em prever o prognóstico de pacientes portadores de neoplasias adrenocorticais em estádios iniciais, mas também o desenvolvimento e seleção de novas estratégias terapêuticas. À medida que conhecimentos a respeito do processo de tumorigênese em geral acumulam-se e tecnologias vão surgindo, novos paradigmas vão sendo criados e o complexo “quebra-cabeças” das alterações genéticas dos tumores adrenocorticais fica cada vez mais perto de finalmente ser desvendado.

## REFERÊNCIAS

1. Thompson GB, Young Jr. WF. Adrenal incidentaloma. **Curr Opin Oncol** 2003;15(1):84-90.
2. Young Jr. WF. Management approaches to adrenal incidentalomas. A view from Rochester, Minnesota. **Endocrinol Metab Clin North Am** 2000;29(1):159-85, x.
3. Angeli A, Osella G, Ali A, Terzolo M. Adrenal incidentaloma: an overview of clinical and epidemiological data from the National Italian Study Group. **Horm Res** 1997;47(4-6):279-83.
4. Ng L, Libertino JM. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. **J Urol** 2003;169(1):5-11.
5. 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.
6. Sullivan M, Boileau M, Hodges CV. Adrenal cortical carcinoma. **J Urol** 1978;120(6):660-5.
7. Tauchmanova L, Colao A, Marzano LA, Sparano L, Camera L, Rossi A, et al. Adrenocortical carcinomas: Twelve-year prospective experience. **World J Surg** 2004;28(9):896-903.
8. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol** 1984;8(3):163-9.
9. van Slooten H, Schaberg A, Smeenk D, Moolenaar AJ. Morphologic characteristics of benign and malignant adrenocortical tumors. **Cancer** 1985;55(4):766-73.
10. Hough AJ, Hollifield JW, Page DL, Hartmann WH. Prognostic factors in adrenal cortical tumors. A mathematical analysis of clinical and morphologic data. **Am J Clin Pathol** 1979;72(3):390-9.
11. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss system revisited: a clinicopathologic and immunohistochemical study of 49 adrenocortical tumors. **Am J Surg Pathol** 2002;26(12):1612-9.
12. Weiss LM, Medeiros LJ, Vickery Jr. AL. Pathologic features of prognostic significance in adrenocortical carcinoma. **Am J Surg Pathol** 1989;13(3):202-6.
13. Wajchenberg BL, Albergaria Pereira MA, Mendonça BB, Latronico AC, Campos Carneiro P, Alves VA, et al. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. **Cancer** 2000;88(4):711-36.
14. 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.
15. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, et al. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the BCR-ABL tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. **N Engl J Med** 2001;344(14):1031-7.
16. Joensuu H, Dimitrijevic S. Tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) as an anticancer agent for solid tumours. **Ann Med** 2001;33(7):451-5.
17. Yokota J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis** 2000;21(3):497-503.
18. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000;100(1):57-70.
19. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. **Nat Biotechnol** 1996;14(13):1675-80.
20. Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW. Serial analysis of gene expression. **Science** 1995;270(5235):484-7.
21. Draviam VM, Xie S, Sorger PK. Chromosome segregation and genomic stability. **Curr Opin Genet Dev** 2004;14(2):120-5.
22. Limon J, Dal Cin P, Gaeta J, Sandberg AA. Translocation t(4;11)(q35;p13) in an adrenocortical carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet** 1987;28(2):343-8.
23. Mertens F, Kullendorff CM, Moell C, Alumets J, Mandahl N. Complex karyotype in a childhood adrenocortical carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet**, 1998;105(2):190-2.
24. du Manoir S, Speicher MR, Joos S, Schrock E, Popp S, Dohner H, et al. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic in situ hybridization. **Hum Genet** 1993;90(6):590-610.
25. Kjellman M, Kallioniemi OP, Karhu R, Hoog A, Farnebo LO, Auer G, et al. Genetic aberrations in adrenocortical tumors detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. **Cancer Res** 1996;56(18):4219-23.
26. Figueiredo BC, Stratakis CA, Sandrini R, de Lacerda L, Pianovski MA, Giatzakis C, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(3):1116-21.

27. James LA, Kelsey AM, Birch JM, Varley JM. Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer** 1999;81(2):300-4.
28. Zhao J, Speel EJ, Muletta-Feurer S, Rutimann K, Saremaslani P, Roth J, 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.
29. 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.
30. Sidhu S, Marsh DJ, Theodosopoulos G, Phillips J, Bambach CP, Campbell P, et al. Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87(7):3467-74.
31. Figueiredo BC, Ribeiro RC, Zambetti G, Haddad B, Pianovsky MD, Pereira RM, et al. Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: A specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res** 2000;33(10):1217-24.
32. Latronico AC, Chrousos GP. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82(5):1317-24.
33. Bernard MH, Sidhu S, Berger N, Peix JL, Marsh DJ, Robinson BG, et al. A case report in favor of a multistep adrenocortical tumorigenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88(3):998-1001.
34. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990;61(5):759-67.
35. Figueiredo BC, Cavalli LR, Pianovski MA, Lalli E, Sandrini R, Ribeiro RC, et al. Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2005;90(2):615-9.
36. Knudson AG. Hereditary cancer: Two hits revisited. **J Cancer Res Clin Oncol** 1996;122(3):135-40.
37. Pinto EM, Billerbeck AB, Fragoso MC, Mendonça 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.
38. Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. **Science** 1991;253(5015):49-53.
39. Kleihues P, Schauble B, zur Hausen A, Esteve J, Ohgaki H. Tumors associated with p53 germline mutations: A synopsis of 91 families. **Am J Pathol** 1997;150(1):1-13.
40. Ribeiro RC, Sandrini F, Figueiredo B, Zambetti GP, Michalkiewicz E, Lafferty AR, et al. An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001;98(16):9330-5.
41. Latronico AC, Pinto EM, Domenice S, Fragoso MC, Martin RM, Zerbin MC, et al. An inherited mutation outside the highly conserved DNA-binding domain of the p53 tumor suppressor protein in children and adults with sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(10):4970-3.
42. Pinto EM, Billerbeck AE, Villares MC, Domenice S, Mendonça BB, Latronico AC. Founder effect for the highly prevalent R337H mutation of tumor suppressor p53 in Brazilian patients with adrenocortical tumors. **Arq Bras Endocrinol Metab** 2004;48(5):647-50.
43. DiGiammarino EL, Lee AS, Cadwell C, Zhang W, Bothner B, Ribeiro RC, et al. A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol** 2002;9(1):12-6.
44. Reincke M, Karl M, Travis WH, Mastorakos G, Allolio B, Linehan HM, et al. p53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab** 1994;78(3):790-4.
45. Ohgaki H, Kleihues P, Heitz PU. p53 mutations in sporadic adrenocortical tumors. **Int J Cancer** 1993;54(3):408-10.
46. Barzon L, Chilosi M, Fallo F, Martignoni G, Montagna L, Palu G, et al. Molecular analysis of CDKN1C and TP53 in sporadic adrenal tumors. **Eur J Endocrinol** 2001;145(2):207-12.
47. Reeve AE, Eccles MR, Wilkins RJ, Bell GI, Millow LJ. Expression of insulin-like growth factor-II transcripts in Wilms' tumour. **Nature** 1985;317(6034):258-60.
48. Gicquel C, Bertagna X, Schneid H, Francillard-Leblond M, Luton JP, Girard F, 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.
49. Gicquel C, Raffin-Sanson ML, Gaston V, Bertagna X, Plouin PF, Schlumberger M, et al. Structural and functional abnormalities at 11p15 are associated with the malignant phenotype in sporadic adrenocortical tumors: study on a series of 82 tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82(8):2559-65.
50. Boulle N, Logie A, Gicquel C, Perin L, Le Bouc Y. Increased levels of insulin-like growth factor II (IGF-II) and IGF-binding protein-2 are associated with malignancy in sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(5):1713-20.
51. Weber MM, Auernhammer CJ, Kiess W, Engelhardt D. Insulin-like growth factor receptors in normal and tumorous adult human adrenocortical glands. **Eur J Endocrinol** 1997;136(3):296-303.
52. Reeve JG, Schwander J, Bleehen NM. IGFBP-2: an important regulator of insulin-like growth factor action in human lung tumours? **Growth Regul** 1993;3(1):82-4.
53. Russo VC, Bach LA, Fosang AJ, Baker NL, Werther GA. Insulin-like growth factor binding protein-2 binds to cell surface proteoglycans in the rat brain olfactory bulb. **Endocrinology** 1997;138(11):4858-67.
54. Weber MM, Fottner C, Schmidt P, Brodowski KM, Gittner K, Lahm H, et al. Postnatal overexpression of insulin-like growth factor II in transgenic mice is associated with adrenocortical hyperplasia and enhanced steroidogenesis. **Endocrinology** 1999;140(4):1537-43.
55. Logie A, Boulle N, Gaston V, Perin L, Boudou P, Le Bouc Y, 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.
56. Dhanasekaran N, Heasley LE, Johnson GL. G protein-

- coupled receptor systems involved in cell growth and oncogenesis. **Endocr Rev** 1995;16(3):259-70.
57. Lania A, Mantovani G, Spada A. G protein mutations in endocrine diseases. **Eur J Endocrinol** 2001;145(5):543-59.
58. Yoshimoto K, Iwahana H, Fukuda A, Sano T, Itakura M. Rare mutations of the Gs alpha subunit gene in human endocrine tumors. Mutation detection by polymerase chain reaction-primer-introduced restriction analysis. **Cancer** 1993;72(4):1386-93.
59. Lyons J, Landis CA, Harsh G, Vallar L, Grunewald K, Feichtinger H, et al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors. **Science** 1990;249(4969):655-9.
60. Reincke M, Karl M, Travis W, Chrousos GP. No evidence for oncogenic mutations in guanine nucleotide-binding proteins of human adrenocortical neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** 1993;77(5):1419-22.
61. Gicquel C, Le Bouc Y. Molecular markers for malignancy in adrenocortical tumors. **Horm Res** 1997;47(4-6):269-72.
62. Fragoso MC, Domenice S, Latronico AC, Martin RM, Pereira RA, Zerbini MC, et al. Cushing's syndrome secondary to adrenocorticotropin-independent macronodular adrenocortical hyperplasia due to activating mutations of GNAS1 gene. **J Clin Endocrinol Metab** 2003;88(5):2147-51.
63. Lacroix A, Ndiaye N, Tremblay J, Hamet P. Ectopic and abnormal hormone receptors in adrenal Cushing's syndrome. **Endocr Rev** 2001;22(1):75-110.
64. Parma J, van Sande J, Swillens S, Tonacchera M, Dumont J, Vassart G. Somatic mutations causing constitutive activity of the thyrotropin receptor are the major cause of hyperfunctioning thyroid adenomas: identification of additional mutations activating both the cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and inositol phosphate-Ca<sup>2+</sup> cascades. **Mol Endocrinol** 1995;9(6):725-33.
65. Latronico AC, Reincke M, Mendonça BB, Arai K, Mora P, Allolio B, et al. No evidence for oncogenic mutations in the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** 1995;80(3):875-7.
66. Light K, Jenkins PJ, Weber A, Perrett C, Grossman A, Pistorello M, et al. Are activating mutations of the adrenocorticotropin receptor involved in adrenal cortical neoplasia? **Life Sci** 1995;56(18):1523-7.
67. Reincke M, Mora P, Beuschlein F, Arlt W, Chrousos GP, Allolio B. Deletion of the adrenocorticotropin receptor gene in human adrenocortical tumors: implications for tumorigenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 1997;82(9):3054-8.
68. Bicknell AB, Lomthaisong K, Woods RJ, Hutchinson EG, Bennett HP, Gladwell RT, et al. Characterization of a serine protease that cleaves pro-gamma-melanotropin at the adrenal to stimulate growth. **Cell** 2001;105(7):903-12.
69. Beuschlein F, Mutch C, Bavers DL, Ulrich-Lai YM, Engeland WC, Keegan C, et al. Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. **Endocrinology** 2002;143(8):3122-35.
70. Stratakis CA. Genetics of Carney complex and related familial lentiginoses, and other multiple tumor syndromes. **Front Biosci** 2000;5:D353-66.
71. Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit (PRKAR1A) in patients with the "complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity, and schwannomas" (Carney complex). **Ann NY Acad Sci** 2002;968:3-21.
72. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, et al. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. **Cancer Res** 2003;63(17):5308-19.
73. Barzon L, Pasquali C, Grigoletto C, Pedrazzoli S, Boscaro M, Fallo F. Multiple endocrine neoplasia type 1 and adrenal lesions. **J Urol** 2001;166(1):24-7.
74. Agarwal SK, Guru SC, Heppner C, Erdos MR, Collins RM, Park SY, et al. Menin interacts with the AP1 transcription factor JunD and represses JunD-activated transcription. **Cell** 1999;96(1):143-52.
75. Heppner C, Reincke M, Agarwal SK, Mora P, Allolio B, Burns AL, et al. MEN1 gene analysis in sporadic adrenocortical neoplasms. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(1):216-9.
76. Zwermann O, Beuschlein F, Mora P, Weber G, Allolio B, Reincke M, et al. Multiple endocrine neoplasia type 1 gene expression is normal in sporadic adrenocortical tumors. **Eur J Endocrinol** 2000;142(6):689-95.
77. Molkenkin 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.
78. Laitinen MP, Anttonen M, Ketola I, Wilson DB, Ritvos O, Butzow R, et al. Transcription factors GATA-4 and GATA-6 and a GATA family cofactor, FOG-2, are expressed in human ovary and sex cord-derived ovarian tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(9):3476-83.
79. Heikinheimo M, Ermolaeva M, Bielinska M, Rahman NA, Narita N, Huhtaniemi IT, et al. Expression and hormonal regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in the mouse ovary. **Endocrinology** 1997;138(8):3505-14.
80. Ketola I, Rahman N, Toppari J, Bielinska M, Porter-Tinge SB, Tapanainen JS, et al. Expression and regulation of transcription factors GATA-4 and GATA-6 in developing mouse testis. **Endocrinology** 1999;140(3):1470-80.
81. Vaskivuo TE, Anttonen M, Herva R, Billig H, Dorland M, te Velde ER, et al. Survival of human ovarian follicles from fetal to adult life: apoptosis, apoptosis-related proteins, and transcription factor GATA-4. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(7):3421-9.
82. Kiiveri S, Liu J, Westerholm-Ormio M, Narita N, Wilson DB, Voutilainen R, et al. Differential expression of GATA-4 and GATA-6 in fetal and adult mouse and human adrenal tissue. **Endocrinology** 2002;143(8):3136-43.
83. Kiiveri S, Siltanen S, Rahman N, Bielinska M, Lehto VP, Huhtaniemi IT, et al. Reciprocal changes in the expression of transcription factors GATA-4 and GATA-6 accompany adrenocortical tumorigenesis in mice and humans. **Mol Med** 1999;5(7):490-501.

84. Barbosa AS, Giacaglia LR, Martin RM, Mendonça 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.
85. Kiiveri S, Liu J, Arola J, Heikkilä P, Kuulasmaa T, Lehtonen E, et al. Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. **Mol Cell Endocrinol** 2005;233(1-2):47-56.
86. Tremblay JJ, Viger RS. Transcription factor GATA-4 enhances Mullerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. **Mol Endocrinol** 1999;13(8):1388-401.
87. Ying SY. Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins modulating the secretion of follicle-stimulating hormone. **Endocr Rev** 1988;9(2):267-93.
88. Vale W, Rivier C, Hsueh A, Campen C, Meunier H, Bicsak T, et al. Chemical and biological characterization of the inhibin family of protein hormones. **Recent Prog Horm Res** 1988;44:1-34.
89. Woodruff TK. Regulation of cellular and system function by activin. **Biochem Pharmacol** 1998;55(7):953-63.
90. Spencer SJ, Rabinovici J, Jaffe RB. Human recombinant activin-A inhibits proliferation of human fetal adrenal cells in vitro. **J Clin Endocrinol Metab** 1990;71(6):1678-80.
91. Spencer SJ, Rabinovici J, Mesiano S, Goldsmith PC, Jaffe RB. Activin and inhibin in the human adrenal gland. Regulation and differential effects in fetal and adult cells. **J Clin Invest** 1992;90(1):142-9.
92. Spencer SJ, Mesiano S, Lee JY, Jaffe RB. Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrinol Metab** 1999;84(3):1110-5.
93. Munro LM, Kennedy A, McNicol AM. The expression of inhibin/activin subunits in the human adrenal cortex and its tumours. **J Endocrinol** 1999;161(2):341-7.
94. Vanttinen T, Kuulasmaa T, Liu J, Voutilainen R. Expression of activin/inhibin receptor and binding protein genes and regulation of activin/inhibin peptide secretion in human adrenocortical cells. **J Clin Endocrinol Metab** 2002;87(9):4257-63.
95. Villanueva A, Garcia C, Paules AB, Vicente M, Megias M, Reyes G, et al. Disruption of the antiproliferative TGF-beta signaling pathways in human pancreatic cancer cells. **Oncogene** 1998;17(15):1969-78.
96. Grady WM, Myeroff LL, Swinler SE, Rajput A, Thiagalingam S, Lutterbaugh JD, et al. Mutational inactivation of transforming growth factor beta receptor type II in microsatellite stable colon cancers. **Cancer Res** 1999;59(2):320-4.
97. van Schaik RH, Wierix CD, Timmerman MA, Oomen MH, van Weerden WM, van der Kwast TH, et al. Variations in activin receptor, inhibin/activin subunit and follistatin mRNAs in human prostate tumour tissues. **Br J Cancer** 2000;82(1):112-7.
98. Su GH, Bansal R, Murphy KM, Montgomery E, Yeo CJ, Hruban RH, et al. ACVR1B (ALK4, activin receptor type 1B) gene mutations in pancreatic carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001;98(6):3254-7.
99. Matzuk MM, Finegold MJ, Mather JP, Krummen L, Lu H, Bradley A. Development of cancer cachexia-like syndrome and adrenal tumors in inhibin-deficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994;91(19):8817-21.
100. Kumar TR, Wang Y, Matzuk MM. Gonadotropins are essential modifier factors for gonadal tumor development in inhibin-deficient mice. **Endocrinology** 1996;137(10):4210-6.
101. Mellor SL, Richards MG, Pedersen JS, Robertson DM, Risbrider GP. Loss of the expression and localization of inhibin alpha-subunit in high-grade prostate cancer. **J Clin Endocrinol Metab** 1998;83(3):969-75.
102. Ala-Fossi SL, Aine R, Punnonen R, Maenpää J. Is potential to produce inhibins related to prognosis in ovarian granulosa cell tumors? **Eur J Gynaecol Oncol** 2000;21(2):187-9.
103. Gebhart JB, Roche PC, Keeney GL, Lesnick TG, Podratz KC. Assessment of inhibin and p53 in granulosa cell tumors of the ovary. **Gynecol Oncol** 2000;77(2):232-6.
104. Arola J, Liu J, Heikkilä P, Ilvesmäki V, Salmenkivi K, Voutilainen R, et al. Expression of inhibin alpha in adrenocortical tumours reflects the hormonal status of the neoplasm. **J Endocrinol** 2000;165(2):223-9.
105. Longui CA, Lemos-Marini SH, Figueiredo B, Mendonça BB, Castro M, Liberatore R Jr, et al. Inhibin alpha-subunit (INHA) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from TP53 R337H mutation heterozygote carriers. **J Med Genet** 2004;41(5):354-9.
106. Lefrançois-Martinez AM, Bertherat J, Val P, Tournaire C, Gallo-Payet N, Hyndman D, et al. Decreased expression of cyclic adenosine monophosphate-regulated aldose reductase (AKR1B1) is associated with malignancy in human sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2004;89(6):3010-9.
107. Brigstock DR. The connective tissue growth factor/cysteine-rich 61/nephroblastoma overexpressed (CCN) family. **Endocr Rev** 1999;20(2):189-206.
108. Martinerie C, Huff V, Joubert I, Badzioch M, Saunders G, Strong L, et al. Structural analysis of the human nov proto-oncogene and expression in Wilms tumor. **Oncogene** 1994;9(9):2729-32.
109. Martinerie C, Gicquel C, Louvel A, Laurent M, Schofield PN, Le Bouc Y. Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. **J Clin Endocrinol Metab** 2001;86(8):3929-40.
110. Perbal B, Martinerie C, Sainson R, Werner M, He B, Roizman B. The C-terminal domain of the regulatory protein NOVH is sufficient to promote interaction with fibulin 1C: a clue for a role of NOVH in cell-adhesion signaling. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999;96(3):869-74.
111. Liu J, Kahri AI, Heikkilä 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.
112. Bourcigaux N, Gaston V, Logie A, Bertagna X, Le Bouc Y, Gicquel C. High expression of cyclin E and G1 CDK and loss of function of p57KIP2 are involved in proliferation of malignant sporadic adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** 2000;85(1):322-30.
113. Tissier F, Louvel A, Grabar S, Hagnere AM, Bertherat J, Vacher-Lavenu MC, et al. Cyclin E correlates with malignancy

- nancy and adverse prognosis in adrenocortical tumors. **Eur J Endocrinol** **2004**;150(6):809-17.
114. Pilon C, Pistorello M, Moscon A, Altavilla G, Pagotto U, Boscaro M, et al. Inactivation of the p16 tumor suppressor gene in adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab** **1999**;84(8):2776-9.
115. Peri A, Luciani P, Conforti B, Baglioni-Peri S, Cioppi F, Crescioli C, et al. Variable expression of the transcription factors cAMP response element-binding protein and inducible cAMP early repressor in the normal adrenal cortex and in adrenocortical adenomas and carcinomas. **J Clin Endocrinol Metab** **2001**;86(11):5443-9.
116. Rosenberg D, Groussin L, Jullian E, Perlemoine K, Medjane S, Louvel A, et al. Transcription factor 3',5'-cyclic adenosine 5'-monophosphate-responsive element-binding protein (CREB) is decreased during human adrenal cortex tumorigenesis and fetal development. **J Clin Endocrinol Metab** **2003**;88(8):3958-65.
117. Mannelli M, Gelmini S, Arnaldi G, Becherini L, Bemporad D, Crescioli C, 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.
118. Bogenrieder T, Herlyn M. Axis of evil: molecular mechanisms of cancer metastasis. **Oncogene** **2003**;22(42):6524-36.
119. Stetler-Stevenson WG, Yu AE. Proteases in invasion: matrix metalloproteinases. **Semin Cancer Biol** **2001**;11(2):143-52.
120. Benassi MS, Gamberi G, Magagnoli G, Molendini L, Ragazzini P, Merli M, et al. Metalloproteinase expression and prognosis in soft tissue sarcomas. **Ann Oncol** **2001**;12(1):75-80.
121. Schmalefeldt B, Prechtel D, Harting K, Spathe K, Rutke S, Konik E, et al. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMP)-2, MMP-9, and the urokinase-type plasminogen activator is associated with progression from benign to advanced ovarian cancer. **Clin Cancer Res** **2001**;7(8):2396-404.
122. Kjellman M, Enberg U, Hoog A, Larsson C, Holst M, Farnebo LO, et al. Gelatinase A and membrane-type 1 matrix metalloproteinase mRNA: expressed in adrenocortical cancers but not in adenomas. **World J Surg** **1999**;23(3):237-42.
123. Macgregor PF. Gene expression in cancer: the application of microarrays. **Expert Rev Mol Diagn** **2003**;3(2):185-200.
124. Giordano TJ, Thomas DG, Kuick R, Lizyness M, Misek DE, Smith AL, et al. Distinct transcriptional profiles of adrenocortical tumors uncovered by DNA microarray analysis. **Am J Pathol** **2003**;162(2):521-31.
125. de Fraipont F, El Atifi M, Cherradi N, Le Moigne G, Defaye G, Houlgatte R, et al. Gene expression profiling of human adrenocortical tumors using complementary deoxyribonucleic Acid microarrays identifies several candidate genes as markers of malignancy. **J Clin Endocrinol Metab** **2005**;90(3):1819-29.

**Endereço para correspondência:**

Antonio Marcondes Lerario  
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar 155, 2º Andar, bloco 6 -  
Laboratório de Hormônios  
05403-000 São Paulo, SP  
E-mail: amlerario@uol.com.br