

GIOVANNA ASSIS PEREIRA

**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS NA FORMAÇÃO DO
TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL DE CRIANÇAS**

**CURITIBA
2007**

GIOVANNA ASSIS PEREIRA

**MECANISMOS MOLECULARES IMPLICADOS NA
FISIOPATOGÊNESE DO TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL DE CRIANÇAS**

**Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Saúde da Criança e do Adolescente, como requisito
parcial à obtenção do título de Doutor em Saúde da
Criança e do Adolescente, área de concentração
Genética Molecular, Departamento de Pediatria, Setor
de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná**

**Orientador: Prof. Dr. Bonald C. de Figueiredo
Co-orientador: Dr. Enzo Lalli**

**CURITIBA
2007**

*A Deus, por me fazer parte da Criação,
Ao meu amor Fabrício,.
Aos meus pais, Sebastião e Marlene,.
A minha irmã Izabela..*

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-Graduação em Saúde da Criança e do Adolescente pela oportunidade de realização do Curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao *Comité Français d'Evaluation de la Coopération Universitaire avec le Brésil* (COFECUB) pela oportunidade da realização de um estágio na França.

Ao Professor Dr. Bonald C. Figueiredo pela orientação e carinho.

Ao Dr. Enzo Lalli pela orientação, confiança e estímulos durante meu período na França.

A toda a equipe do Dr. Lalli e do *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire* que me acolheram com tanto carinho e paciência.

À professora Dra. Mara Pianovski pelo carinho e pelas inúmeras colaborações e estímulos.

Ao meu amado Fabrício pelo seu amor e atenção.

Aos meus pais e a Izabela, que sempre souberam compreender e aceitar minha ausência.

Aos queridos amigos, sempre dispostos a ajudar no que precisar.

A querida amiga Flávia, que apesar da distância, sempre se fez presente.

Aos colegas do CEGEMPAC Elis, Renato e Sohaila pelos auxílios durante toda a pesquisa, e ao Túlio pela grande colaboração na realização dos imunoenaios.

À Gislaine, à Dra. Ivy e ao Dr. Guilherme pela ajuda na obtenção dos termos de consentimento.

À Dra. Juliana Moura pela amizade, pelo companheirismo e pelo aprendizado.

À professora Dra. Enilze Ribeiro pela atenção e pelo auxílio na dosagem das proteínas.

Ao Luca pelo carinho e pela companhia incondicionais.

A todos que direta ou indiretamente forneceram algum tipo de contribuição.

“Isto é o que haverão de entender em toda sua amplitude. Na Natureza todas as partículas que a configuram colaboram entre si. Daí que seja possível – pelo concurso de todos os elementos da Criação – que surjam os vegetais e dêem formosas flores e frutos”. (Da Sabedoria Logosófica)

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	vi
LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS	vi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	viii
LISTA DE SÍMBOLOS	xi
LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	xii
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 O TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL	3
2.1.1 Considerações gerais	3
2.1.2 Desenvolvimento do córtex adrenal	6
2.1.1 Etiopatogenia.....	8
2.1.2 Expressão das enzimas esteroidogênicas e esteroidogênese durante o desenvolvimento da glândula adrenal	10
2.2 FATOR ESTEROIDOGÊNICO-1 (<i>SF-1</i>).....	17
2.2.1 A estrutura de SF-1	19
2.2.2 A expressão de <i>SF-1</i> nos tecidos adultos.....	20
2.2.3 A expressão de SF-1 nos tecidos embrionários.....	20
2.2.4 Funções de SF-1 <i>in vivo</i>	22
2.2.5 SF-1 e os TCAs	22
2.2.6 Interação de DAX1 com SF-1 e outros fatores de transcrição	23
2.2.7 Mutações de <i>SF-1</i>	25
2.3 Células H295R	30
2.4 FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA	31
2.4.1 Proteínas ancoradas por GPI	31
2.4.2 Fosfatases alcalinas	32
2.4.3 Fosfatase alcalina placentária.....	33
2.4.3.1 Características gerais.....	33
2.4.3.2 Características estruturais.....	35
2.4.3.3 O gene PLAP.....	37
2.4.3.4 PLAP solúvel não tumoral	38
2.4.3.5 PLAP como marcador tumoral.....	40
2.4.3.6 Imunoensaios para determinação da PLAP/PLAP-símile	42
2.5 RNA interferente	44
2.5.1 Mecanismo de ação	45
3 OBJETIVOS	48
3.1 OBJETIVO GERAL	48
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
4 MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS	49
4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PLAP POR MEIO DE IMUNOENSAIO (ICA)	49
4.2.1 Preparo das amostras	49

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas totais	50
4.2.3 Determinação da atividade de PLAP por imunoensaio	50
4.3 Cultivo das células H295R	51
4.4 CLONES MUTANTES SF-1	51
4.4.1 Produção do clone parental e clone que expressa a proteína normal	51
4.4.2 Produção dos clones mutantes SF-1	53
4.4.3 Estudo de proliferação	55
4.5 SILENCIAMENTO DO GENE <i>SF-1</i> via siRNA	56
4.5.1 Estudo de proliferação	57
4.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE E <i>WESTERN BLOTTING</i>	58
4.6.1 Preparo das amostras	58
4.6.2 SDS-PAGE	59
4.6.3 <i>Western blotting</i>	59
4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	60
5 RESULTADOS	61
5.1 DOSAGEM DE PLAP EM TACs	61
5.2 CLONES MUTANTES SF-1 ESTÁVEIS	63
5.2.1 Produção dos clones mutantes	63
5.2.2 Estudo de proliferação dos clones mutantes	67
5.3 SILENCIAMENTO DE SF-1 via siRNA	68
5.3.1 Expressão de SF-1	68
5.3.2 Estudo de proliferação	69
5.3.2.2 Determinação das taxas de apoptose e proliferação celular	69
5 DISCUSSÃO	73
5.1 PRESENÇA DE PLAP EM TACS	73
5.2 GENE <i>SF-1</i> ENVOLVIDO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR	73
CONCLUSÕES	88
REFERÊNCIAS	89
APÊNDICES	126
ANEXOS	138

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1 - ZONAS FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL ADULTO.....	11
QUADRO 2 - EXEMPLOS DE GENES REGULADOS POR <i>SF-1</i>	17
QUADRO 3- FENÓTIPOS RESULTANTES DE ALTERAÇÕES NO GENE <i>SF-1</i>	26
QUADRO 4- FATORES SUPRESSORES E FACILITADORES NA FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO TAC EM CRIANÇAS	87
TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS ESTÁGIOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES DE TAC	5
TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM TAC	5
TABELA 3 - MUTAÇÕES REALIZADAS NO GENE <i>SF-1</i> PARA PRODUÇÃO DOS CLONES ESTÁVEIS	53
TABELA 4 - CONDIÇÕES DE TRANSFEÇÃO DE siRNA	58
TABELA 5- APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS ANALISADAS E OS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE PLAP/PLAP- SÍMILE	64

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

FIGURA 1 - INCIDÊNCIA DE TAC EM DIFERENTES PAÍSES.....	4
FIGURA 2 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL.....	7
FIGURA 3 - VIAS MAIORES DA BIOSÍNTESE DE ESTERÓIDES	13
FIGURA 4 - SEQUÊNCIA DO GENE <i>SF-1</i>	18
FIGURA 5 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SF-1	19
FIGURA 6 - PADRÃO DE <i>SF-1</i> NO DESENVOLVIMENTO ADRENAL E GONADAL.....	21
FIGURA 7 - SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE MAPK EM SF-1	28
FIGURA 8 - DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE <i>SF-1</i>	30
FIGURA 9 - MODELO DOS DÍMEROS DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA...36	
FIGURA 10 - MECANISMO DE AÇÃO DOS siRNAs.....	47

FIGURA 11 - CARACTERÍSTICAS DOS VETORES PLASMIDIAIS pcDNA 6/TR™ E pcDNA4/TO™	52
FIGURA 12 - ETAPAS PARA PRODUÇÃO DOS CLONES <i>SF-1</i> MUTANTES ESTÁVEIS	54
FIGURA 13 - PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DOS CLONES MUTANTES <i>SF-1</i>	56
FIGURA 14 -ESQUEMA DE TRANSFEÇÃO DE siRNA <i>SF-1</i> TESTADO EM CÉLULAS H295R.....	57
FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE PLAP/PLAP-SÍMILE NAS AMOSTRAS DE TCA E CONTROLES	61
FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE SF-1 PELOS CLONES H295R/TR/ <i>SF-1</i> MUTANTES	66
FIGURA 17 - COMPARAÇÃO NA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE SF-1 UTILIZANDO TRÊS siRNAs DIFERENTES.....	68
FIGURA 18 - CONSEQÜÊNCIAS DA TRANSFEÇÃO DE siRNA CONTRA O GENE <i>SF-1</i> SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SF-1	70
FIGURA 19 - MARCAÇÃO BrdU e TUNEL EM CÉLULAS H295R APÓS TRANSFEÇÃO COM siRNAs <i>SF-1</i>	71
FIGURA 20 - QUANTIDADE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA BrdU E TUNEL APÓS TRANSFEÇÃO COM siRNAs ESPECÍFICOS PARA O GENE <i>SF-1</i>	72
FIGURA 21 – HIPÓTESE PARA A FORMAÇÃO DO TAC EM CRIANÇAS	86
GRÁFICO 1 – CURVAS-PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PLAP/PLAP- SÍMILE	62
GRÁFICO 2 - EFEITOS DAS MUTAÇÕES NO GENE <i>SF-1</i> SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A433W	- Alanina na posição 433 substituída por triptofano
ACTH	- Hormônio adrenocorticotrófico
Ad4BP	- Proteína ligante da adrenal 4
AF-1	- Função de ativação 1
AF-2	- Domínio de transativação
AF-2mut	- Mutante <i>SF-1</i> - L451/2A (domínio de transativação)
<i>ALP-1</i>	- Gene que codifica PLAP
<i>ALP-2</i>	- Gene que codifica PLAP-símile
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclico
BrdU	- 5'-bromo-2'-deoxiuridina
C-terminal	- Carboxi-terminal
CYP11	- Citocromo P450, família 11 (11- β hidroxilase)
CYP17	- Citocromo P450, família 17 (17 α -hidroxilase)
CYP19	- Citocromo P450, família 19 (Aromatase)
CYP21	- Citocromo P450, família 21 (21-hidroxilase)
DAX-1	- <i>Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene-1</i>
Dox	- Doxíciclina
DBD	- Domínio de ligação ao DNA
DDD	- 1,1-di-(<i>p</i> -clorofenil)-2,2-dicloroetano
DHEA	- Deidroepiandrosterona
DHEA-S	- Sulfato de deidroepiandrosterona
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
Dox	- Doxíciclina
dsRNA	- RNA de dupla fita
E	- Dia do desenvolvimento embrionário
EDTA	- Ácido etilenediaminotetraacético
FC	- Fosfatidilcolina
FE	- Fosfatidiletanolamina
FG	- Fosfatidilglicerol

FIF	- Fosfatidilinositol fosfato
<i>Ftz-F1</i>	- Gene do fator <i>Fushi tarazu</i>
GM	- Geneticamente modificado
GPI	- Glicofosfatidilinositol
H295R	- Linhagem celular comercial de carcinoma adrenocortical humano
H295R/TR/ <i>SF-1</i>	- Células H295R transfectadas com os plasmídios pcDNA6/TR [®] e pcDNA4/TO [®] contendo o gene <i>SF-1</i>
hPLAP	- PLAP humana
HSD3B2	- 3 beta- hidroxiesteroide desidrogenase beta 2
ICA	- Imunoensaios para detecção da atividade catalítica
ICA-PEP	- ICA desenvolvido com anticorpos purificados com peptídeo sintético
ICA-PLAP	- ICA desenvolvido com anticorpos purificados com hPLAP
Ig	- Imunoglobulina
IGF-II	- Fator de crescimento insulina- <i>like</i> II
ITS	- Insulina, transferrina e selênio
L451/2A	- Leucina 451 e 452 substituídas por alaninas
LBD	- Domínio de ligação ao ligante
<i>LHβ</i>	- Gene do hormônio luteinizante β
LRH-1	- <i>Liver receptor homolog 1</i>
MC2R	- Receptor melanocortina 2 (receptor de ACTH)
N-CoR	- Co-repressor de receptor nuclear
NOV	- <i>Nephroblastoma Overexpressed</i>
nt	- Nucleotídeos
<i>o,p'</i> DDD	- 1-(<i>o</i> -clorofenil)1-(<i>p</i> -clorofenil)-2,2-dicloroetano
p/CIP	- p300/CBP/ <i>cointegrator-associated protein</i>
P450 _{scc}	- Citocromo <i>side chain cleavage</i>
PAG	- Primórdio adreno-gonadal
PBS	- Tampão fosfato salina
PCNA	- Antígeno nuclear de proliferação celular
PEP	- Peptídeo sintético
PKA	- Proteína quinase A
PLAP	- Fosfatase alcalina placentária

PT	- Proteínas totais
PVDF	- polivinilideno fluorado
R337H	- Substituição de arginina por histidina no códon 337
RISC	- Complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	- Ácido ribonucleico
RNAi	- RNA interferente
RNA _m	- RNA mensageiro
S203A	- Serina na posição 203 substituída por alanina
SDS	- Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	- Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio
<i>SF-1</i>	- Gene do Fator esteroideogênico-1
SF-1	- Fator esteroideogênico-1
siRNA	- RNA interferente pequeno
<i>SOX9</i>	- Gene <i>SRY-box 9</i>
SRY	- Fator determinante testicular
StAR	- Proteína reguladora aguda da esteroideogênese
TAC	- Tumor adrenocortical de crianças
TCF/LEF	- <i>T cell factor/Lymphoid enhancing factor</i>
TIF2	- Fator intermediário de transcrição 2
<i>TP53</i>	- Gene que codifica p53
T-REx TM	- Sistema de expressão regulado por tetraciclina
TUNEL	- <i>(Terminal deoxynucleotidyl Transferase)-mediated dUTP-biotin Nick End Labelling.</i>
VMH	- Ventro-medial hipotalâmico
Wnt4	- <i>Wingless-type MMTV integration site family, member 4</i>
<i>WT-1</i>	- Gene supressor do Tumor de Wilms

LISTA DE SÍMBOLOS

µg	-	Micrograma
µL	-	Microlitro
°C	-	Graus Celsius
11p	-	Braço curto do cromossomo 11
17p	-	Braço curto do cromossomo 17
17q13.1	-	Banda 1, região 3.1 do braço longo do cromossomo 17
9q34	-	Banda 3, região 4 do braço longo do cromossomo 9
g	-	Grama
KDa	-	Quilodaltons
L	-	Litro
mg	-	Miligrama
mL	-	Mililitro
p34	-	Braço curto, banda 3, região 4
p36.1	-	Braço curto, banda 3, região 6.1
R337H	-	Substituição de arginina por histidina no códon 337

LISTA DE MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

β -mercaptoetanol	-	<i>Sigma</i>
Ácido acético glacial	-	<i>Merck</i>
Acrilamida	-	<i>Gibco</i>
Anticorpo monoclonal de camundongo anti β -tubulina (clone TUB 2.1)	-	<i>Sigma</i>
Anticorpo de ovelha anti-IgG camundongo	-	<i>Dako - E 0433</i>
Anticorpo de ovelha anti-IgG coelho	-	<i>Dako - E 0432</i>
Aparelho de transferência (<i>western blotting</i>)	-	<i>Bio-Rad (Trans-Blot SD - semi-dry)</i>
Aparelho para dosagem de DNA/RNA/proteínas	-	<i>Eppendorf</i>
Azul de bromofenol	-	<i>Baker Analyzed®</i>
Blasticidina/ Zeocina	-	<i>Cayla-InvivoGen</i>
<i>Brilliant Blue G</i>	-	<i>Acros</i>
<i>Comassie Blue Brilliant</i>	-	<i>Acros</i>
Cuba de eletroforese vertical (<i>western blotting</i>)	-	<i>Pharmacia Biotech</i>
DMEM	-	<i>Gibco</i>
DMEM/F-12	-	<i>Gibco</i>
Filtros de papel	-	<i>Bio-Rad</i>
Glicerol	-	<i>Invitrogen™</i>
Glicina	-	<i>Invitrogen™</i>
Inibidor de protease	-	<i>Roche</i>
ITS Plus	-	<i>Becton Dickinson</i>
Kit para dosagem de proteínas totais	-	<i>Qubit (Invitrogen)</i>
Kit para mutagênese	-	<i>Stratagene (QuickChange)</i>
Kits de <i>Mini e Midi-prep</i>	-	<i>Macherey-Nagel</i>
Kits para análise de proliferação de morte celular	-	<i>Roche</i>

Leitora de microplacas de ELISA	- <i>Spectra (Tecan)</i>
Marcador de peso molecular	- <i>Invitrogen™ (MultiMark® Multi-Colored Standard)</i>
Membrana de PVDF	- <i>Amersham Bioscience (ECL Plus)</i>
Metanol	- <i>Merck</i>
Microplacas	- <i>Nunc</i>
Microscópio de fluorescência	- <i>Zeiss</i>
Microscópio óptico comum	- <i>Zeiss</i>
N-N'-metilenebisacrilamida	- <i>Acros</i>
NuSerum	- <i>Becton Dickinson</i>
Oligonucleotídeos	- <i>Eurogentec</i>
Padrão de PLAP	- <i>Sigma P3895</i>
Penicilina/Estreptomicina	- <i>Gibco™</i>
Persulfato de amônio (APS)	- <i>Gibco</i>
Reagentes de transfecção	- <i>Eurogentec.</i>
Revelação e análise das membranas de <i>western blotting</i>	- <i>Fujifilm LAS-3000 Imaging System</i>
Revelador quimioluminescente	- <i>Amersham Biosciences(ECL Plus)</i>
SDS	- <i>Gibco</i>
Seqüenciador de DNA	- <i>PE Biosystems 310 Genetic Analyser (Perkin Elmer)</i>
Sistema de transfecção (T-REx)	- <i>Invitrogen™</i>
TEMED	- <i>Invitrogen™</i>
Termociclador	- <i>Eppendorf</i>
Tris	- <i>Invitrogen™</i>
Tween 20	- <i>Sigma</i>
Vermelho de Ponceau	- <i>Invitrogen™</i>

RESUMO

O tumor adrenocortical em crianças (TAC) é uma neoplasia rara e sua incidência é cerca de 10 a 15 vezes maior nos estados de São Paulo e Paraná que em qualquer outro lugar do mundo. Nessa região brasileira, os TACs se encontram, em sua grande maioria, associados à mutação na linhagem germinativa do gene *TP53* (R337H). O sintoma mais comum dessa neoplasia é síndrome virilizante, devido à produção tumoral de esteróides androgênicos, que pode estar associada ou não a um excesso de glicocorticóide. A grande maioria dos pacientes com TAC é diagnosticada até os três anos de idade, porém os responsáveis pelas crianças relatam que, normalmente, os sintomas começaram a surgir de 3 meses a 1 ano antes do diagnóstico. Diante dessas observações e de uma série de diferenças entre tumores de crianças e de adultos, existe a hipótese de que o tumor de crianças poderia surgir durante o período embrionário. Uma das evidências que sustenta essa hipótese é a presença do marcador embrionário fosfatase alcalina placentária (PLAP/PLAP-símile) em amostras de TACs. Com base na distribuição etária dos TACs, no padrão de secreção hormonal e seu fenótipo molecular, acredita-se que esse tumor derive da zona fetal da adrenal. As glândulas adrenal e gonadal derivam do mesmo primórdio embrionário e muitos reguladores transcricionais exercem um papel importante na gênese desses dois órgãos. O fator esteroideogênico-1 (Ad4BP/*SF-1*; NR5A1) é um receptor nuclear de especial importância nos TACs devido ao fato de estar amplificado e em quantidades elevadas em quase a totalidade dos TACs brasileiros já estudados. No presente trabalho verificou-se que dentre as nove (9/16) amostras de TCA com aumento na atividade enzimática de PLAP/PLAP-símile, verificou-se que seis (75%) apresentaram concomitante aumento na expressão de *SF-1* e para uma amostra esse dado não estava disponível. Infelizmente, ainda não foi estabelecida linhagem celular derivadas dos TACs e apresentando a mutação R337H do *TP53*. Para verificar as consequências celulares e moleculares do aumento de *SF-1* nas células adrenocorticais, foram construídos clones expressando a proteína *SF-1* normal e mutante [S203A, L451A/L452A (AF-2mut) e A433W] de forma induzida por doxíciclina em células da linhagem de carcinoma adrenocortical H295R. A atividade de transativação de *SF-1* é necessária para a promoção dos efeitos de *SF-1*, uma vez que os dois mutantes AF-2 não foram capazes de induzir a proliferação. Os clones mutantes S203A e A433W foram parcialmente capazes de estimular a proliferação sob indução por doxíciclina. Com o objetivo de verificar como a modulação dos níveis endógenos de *SF-1* influencia na proliferação das células H295R, essas foram transfectadas por dois diferentes RNAs interferentes pequenos (siRNAs) específicos para *SF-1* e com siRNA controle. Verificou-se que ambos siRNA anti-*SF-1* reduziram significativamente a expressão de *SF-1*, promovendo uma redução da proliferação celular e um aumento da taxa de células apoptóticas. O presente estudo demonstra a grande importância da dosagem de *SF-1* na tumorigênese adrenocortical, justificando assim, o desenvolvimento de drogas contra a atividade transcricional de *SF-1* para a terapia de TAC.

Palavras-chave: tumor adrenocortical, fosfatase alcalina placentária, fator esteroideogênico 1, RNA interferente pequeno

ABSTRACT

Adrenocortical tumor is a rare neoplasia in children (ACT) and its incidence is about 10-15 times higher in the states of São Paulo and Paraná than in any other place of the world. In this Brazilian region, the ACTs are found, in its great majority, associated to the germ line *TP53* R337H mutation. The most common clinical manifestation of this neoplasm is a virilizing syndrome, due to tumoral production of steroidal androgens, that can be associated or not to a glucocorticoid excess. The great majority of the patients with ACT in southern Brazil is diagnosed before three years of age, however the children's guardians refer that usually the symptoms had started to appear about six months - two years before diagnosis. Because of these clinical data and a series of differences between children and adults tumors, the hypothesis has been formulated that children's ACT may first arise during the embryonic period. One of the evidences that support this hypothesis is the expression of the embryonic marker placental alkaline phosphatase (PLAP/PLAP-like) in ACT samples. On the basis of the ACTs age distribution, the pattern of hormonal secretion and the molecular phenotype, we suppose that this tumor derives from the fetal zone of the adrenal cortex. The adrenal and gonadal glands derive from the same embryonic primordium and many transcription regulators have great importance in the genesis of these two organs. Steroidogenic Factor-1 (Ad4BP/SF-1; NR5A1) is a nuclear receptor of special importance in the ACTs, because it is amplified and overexpressed in almost all studied Brazilian ACTs. In the present study we report that nine of sixteen studied (9/16) ACT had increased PLAP/PLAP-like enzymatic activity. Six of them (75%) have concomitant increase in SF-1 expression and for one sample data were not available. Unfortunately, cell lines derived from childhood ACTs and bearing the *TP53* R337H mutation are lacking. Consequently, to dissect the cellular and molecular consequences of increased levels of SF-1 in human adrenal cells we overexpressed wild-type and mutant [S203A, A433W and L451A/L452A (AF-2mut)] SF-1 proteins in an inducible fashion in the H295R adrenal cell line. AF-2 – dependent transactivation activity of *SF-1* is necessary to activate proliferation. S203A and A433W mutants were still partially able to activate proliferation in a doxycycline-dependent manner when overexpressed in H295R cells. With the objective to verify if the modulation of the endogenous levels of *SF-1* influences the proliferation of H295R cells, these were transfected with two different short interfering RNA (siRNAs) specific for *SF-1* and with a siRNA control. It was verified that both anti-*SF-1* siRNAs significantly decrease SF-1 expression, inhibit proliferation and increase apoptosis. The present study demonstrates the pivotal importance of *SF-1* dosage in adrenocortical tumorigenesis, thus justifying the development of drugs against the transcriptional activity of *SF-1* for ACT therapy.

Key-words: adrenocortical tumor, placental alkaline phosphatase, steroidogenic factor 1, short interfering RNA

1 INTRODUÇÃO

O progresso no tratamento do câncer na infância foi espetacular nas últimas quatro décadas. Atualmente, 70% das crianças acometidas de câncer podem ser curadas, se diagnosticadas precocemente e tratadas em centros especializados. A maioria dessas crianças terá vida praticamente normal.

O tumor adrenocortical em crianças (TAC) é uma neoplasia rara, cuja frequência anual mundial é de 0,4/milhão de crianças até os quatro anos de idade. Esse número reduz para 0,1/milhão durante os próximos 10 anos (BERNSTEIN; GURNEY, 1999). Na região sul do Brasil este número aumenta para 3,4/milhão de crianças (PIANOVSKI *et al.*, 2006). Os resultados obtidos até o momento com os protocolos terapêuticos utilizados são insatisfatórios, com a média de sobrevida de 5 anos em apenas 55% dos casos (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

Existe uma hipótese acerca da origem do TAC infantil segundo a qual ele derivaria da zona fetal da adrenal (FIGUEIREDO *et al.*, 2000; FIGUEIREDO *et al.*, 20006). Essa hipótese fundamenta-se também na sua distribuição quanto à idade, no seu padrão de secreção hormonal e no seu fenótipo molecular (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; WILKIN *et al.*, 2000). Durante os primeiros meses da vida neonatal, o córtex adrenal humano passa por um intenso processo de remodelamento e estudos mostram que um processo apoptótico é o responsável pela regressão da zona fetal após o nascimento (SPENCER *et al.*, 1999), o que sugere que os TACs surjam devido à uma falha na apoptose desta zona. Outro fato a favor da origem pré-natal do TAC é a precocidade no aparecimento dos sinais e sintomas, em muitos casos, ainda no primeiro ano de vida (MESIANO; JAFFE, 1997).

As células tumorais expressam algumas proteínas que normalmente são encontradas em outros tecidos ou em outro período da vida. Fosfatases alcalinas placentárias (PLAP/PLAP-símile) são marcadores considerados embrionários. Em condições normais são produzidas em maiores quantidades pelas células sinciotrofoblásticas durante a gestação. PLAP/PLAP-símile são descritas na literatura como ferramenta auxiliar no diagnóstico e/ou monitoramento terapêutico de

certos tumores, como os de órgãos genitais masculino e feminino, cujo tecido normal possui uma função esteroidogênica semelhante ao do córtex adrenal.

PLAP/PLAP-símile presente em TCAs e/ou tumor gonadal pode ser uma manifestação de um fenômeno embrionário onde entram em ação elementos que desempenham papel importante na fase de proliferação, hiperplasia e morte celular programada. As glândulas adrenal e gonadais são derivadas do mesmo primórdio embrionário e vários reguladores transcricionais exercem um papel importante na gênese de ambos os órgãos (Ver Revisão em HAMMER *et al.*, 2005), como o receptor órfão nuclear SF-1 (AD4BP/SF-1; NR5A1), que atua de forma imprescindível nesse processo (PARKER *et al.*, 2002).

Recentemente, relatou-se que o gene *SF-1* está amplificado e sua proteína em quantidades aumentadas em TACs de crianças, o que sugere a atuação desse gene de forma importante na gênese e progressão do tumor em questão (FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PIANOVSKI *et al.*, 2006a).

Um dos objetivos do presente estudo foi verificar se existe relação entre a presença de PLAP/PLAP-símile, por meio de um imunoenensaio que determina sua atividade catalítica, e a expressão aumentada de SF-1 nas amostras teciduais de TAC.

Os experimentos referentes a SF-1 relatados nessa tese foram realizados no *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire* e fazem parte do primeiro estudo mostrando associação entre o gene *SF-1* e a proliferação das células de tumor adrenocortical (linhagem comercial H295R).

Em humanos, são descritas mutações de SF-1 em pacientes com vários graus de disgenesia adrenal e gonadal (ACHERMANN *et al.*, 2002). Os clones estáveis de SF-1 produzidos no presente trabalho fornecem evidências do envolvimento de alguns sítios no gene *SF-1* na proliferação celular.

Esses resultados reunidos indicam que a “dosagem” de *SF-1* é essencial para a tumorigênese adrenal, e sugerem que a modulação da atividade de SF-1 pode representar um importante alvo terapêutico nos TACs em crianças.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 O TUMOR DE CÓRTEX ADRENAL

2.1.1 Considerações gerais

O tumor adrenocortical é uma neoplasia das células do córtex adrenal e apresenta diferenciação histológica e funcional em relação ao tecido de origem (HUTTER *et al.*, 1966).

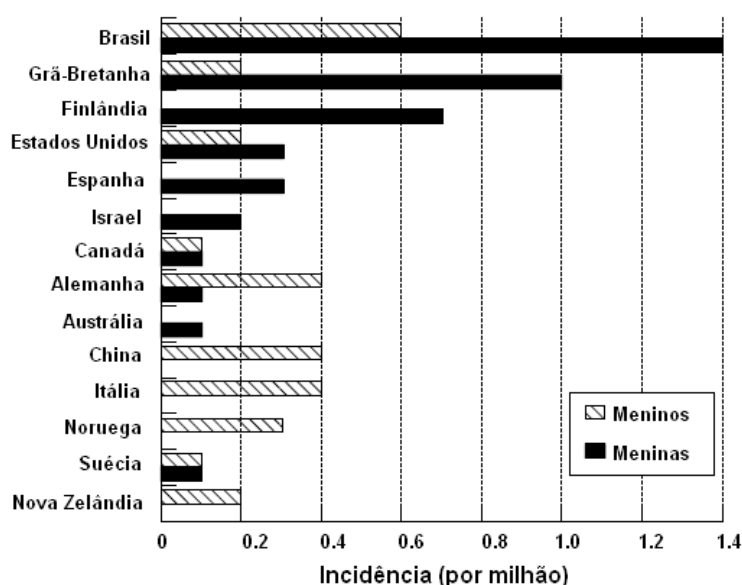
O primeiro registro de tumor adrenocortical de crianças (TAC) aconteceu em 1864 no hospital Saint George em Londres e foi publicado em 1865 pelo Dr. Pitman (PITMAN, 1865). No Paraná, o primeiro caso de TAC foi relatado em 1934 e, em 1969 surgiram as primeiras evidências da alta incidência dessa patologia em São Paulo (MARIGO *et al.*, 1969).

A incidência de TAC difere entre as regiões geográficas no mundo (figura 1). A elevada incidência verificada no Brasil pode ser explicada pela presença da mutação na linhagem germinativa R337H no gene supressor tumoral *TP53* (RIBEIRO *et al.*, 2001; DIGIAMMARINO *et al.*, 2002). Contudo, apesar de diferenças geográficas quanto à incidência do TAC na infância, as características clínicas do tumor, nas casuísticas americanas e européias, são semelhantes àsquelas dos pacientes avaliados em Curitiba. De 42 crianças com TAC tratadas em centros franceses durante um período de 22 anos, a média de idade ao diagnóstico foi de 3,9 anos, houve frequência maior no sexo feminino e 90% dos pacientes apresentavam virilização (LEFEVRE *et al.*, 1984).

MICHALKIEWICZ *et al.* (2004) analisaram 254 casos de TAC entre os anos de 1990 e 2001. A grande maioria dos pacientes (79,5%) era da região sul do Brasil; 13,0% dos Estados Unidos e 7,5% de outros países. Deste total de amostras, 228 obtiveram um laudo histológico de carcinoma (tumor maligno) e os 26 restantes, de adenoma (tumor benigno). O intervalo médio entre o aparecimento dos sintomas e o diagnóstico foi de cinco meses e a faixa etária era entre 0 e 19 anos. Aproximadamente

60% dos pacientes eram menores de quatro anos e somente 14% tinham mais que 13 anos de idade. A proporção entre pacientes femininos:masculinos foi 1,7:1 e os pacientes cujos diagnósticos foram feitos antes dos três anos são na maioria meninas e, no intervalo entre 4 e 12 anos a distribuição sexual do TAC parece ser semelhante. (BERNSTEIN; GURNEY, 1999; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

FIGURA 1: INCIDÊNCIA DE TAC EM DIFERENTES PAÍSES



FONTE: Modificado a partir de RIBEIRO *et al.*, 2006

A apresentação clínica vista em pacientes adolescentes e adultos jovens tende a ser Síndrome de Cushing ou tumores “não-funcionantes” ao passo que, aproximadamente, 90% das crianças apresentam características de síndrome virilizante (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004). Alguns outros dados obtidos com esse trabalho estão listados nas tabelas 1 e 2.

TABELA 1 - DESCRIÇÃO DOS ESTÁDIOS UTILIZADOS PARA CLASSIFICAÇÃO DOS PACIENTES DE TAC

Estágio	Descrição
I	Tumor completamente retirado; peso do tumor até 100g* e ausência de metástases.
II	Tumor completamente retirado; peso do tumor maior que 100g* e ausência de metástases.
III	Tumor residual ¹ ou inoperável
IV	Metástase

FONTE: Modificado a partir de MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004.

NOTA: ¹ Tumor residual é definido como a presença de tecido neoplásico microscópico ou não após a ressecção cirúrgica.

TABELA 2 - CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES COM TAC

Característica	n	(%)
Idade (anos)		
< 4	153	59.8
4 a 12	65	30.0
13 a 20	36	10.2
Sexo		
Feminino	156	61.4
Masculino	98	38.6
Apresentação clínica		
Virilização	140	55.1
Síndrome de Cushing	14	5.5
Misto (clínico e hormonal)*	74	29.2
Tumor não-funcional	26	10.2
Taxa meninas: meninos		
< 4 anos	1.7: 1	
4 anos a 12 anos	0.8: 1	
13 anos a 20 anos	6.2: 1	

FONTE: MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004.

NOTA: Neste estudo foram analisadas 254 amostras de TAC e 79,5% das amostras eram de pacientes da região sul do Brasil

* Indica evidência clínica e/ou histológica de produção anormal de mais de um hormônio, incluindo aldosterona ou estrógeno.

2.1.2 Desenvolvimento do córtex adrenal

A adrenal e as gônadas são derivadas de um precursor comum, o primórdio adrenogenital (PAG), localizado entre o epitélio celômico, a crista urogenital e a aorta dorsal. O PAG é evidenciado aos 11.5 dias do desenvolvimento embrionário (E) em ratos (HATANO *et al.*, 1996) e em camundongos no dia E9 (IKEDA *et al.*, 1994), ao passo que o córtex e a medula adrenais se diferenciam por volta de E16-E16.5 (IKEDA *et al.*, 1994; HATANO *et al.*, 1996). Em humanos, o PAG aparece por volta dos 32 dias após a ovulação.

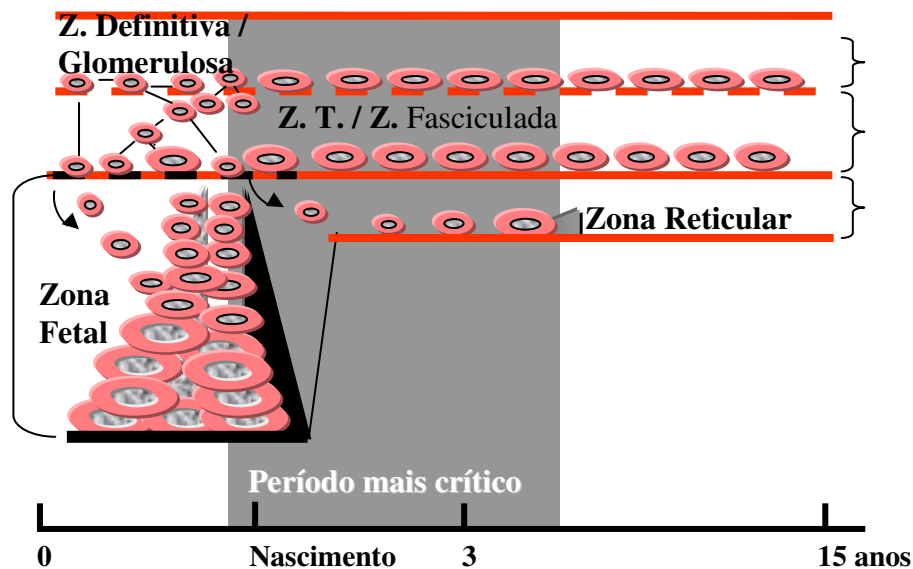
O desenvolvimento da adrenal nos primatas é bastante complexo e, durante a maior parte da vida intrauterina, grande parte do volume da adrenal (80-90%) é representada pela zona fetal, caracterizada por um rápido crescimento e pela elevada produção de sulfato de deidroepiandrosterona (DHEA-S). A outra zona que pode ser distinguida inicialmente na adrenal fetal é a definitiva (WOLKERSDORFER; BORNSTEIN, 1998). Após a metade da gestação, uma terceira região, a zona de transição, desenvolve-se entre a zona fetal e a definitiva. Próximo à trigésima semana, as zonas definitiva e de transição começam a apresentar a aparência da zona glomerulosa e da zona fasciculada do córtex adrenal adulto, respectivamente (figura 2).

A zona fetal, como o próprio nome diz, existe somente durante o período fetal e, logo após o nascimento se inicia um intenso processo de atrofia. Uma camada interna aparece formando, inicialmente, a zona reticular que prolifera e se diferencia até atingir um estágio terminal de desenvolvimento no final da puberdade (MESIANO; JAFFE, 1997).

Ao nascimento, o peso da adrenal é de 10g e em, aproximadamente duas semanas, em virtude do processo de apoptose, diminui para 4g. Há perda de peso durante os próximos sete dias, permanecendo o tamanho constante por aproximadamente dois anos. Ao mesmo tempo, a zona reticular começa a se expandir rapidamente e o tamanho da adrenal, aos quinze anos, é mais que o dobro que o da glândula fetal. Verifica-se, portanto, que o córtex adrenal fetal é um tecido dinâmico

que sofre muitas mudanças, incluindo apoptose intensa seguida por rápida proliferação celular (figura 2).

FIGURA 2 - PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE NO CÓRTEX ADRENAL



FONTE: FIGUEIREDO *et al.*, 2000

NOTA: A figura 2 representa o processo de proliferação das células das zonas definitiva e transitória (Z. T.), em contraste com a intensa programação de morte celular (apoptose) na zona fetal (em preto) e o surgimento de uma camada mais interna (zona reticular). Ocorre uma migração centrípeta das células (setas) para a região mais interna do córtex adrenal precedendo à fase de hipertrofia. O período hipotético mais provável para a formação do TAC (área retangular em cinza escuro), é proposto. Esse período crítico é baseado na faixa etária mais comum de diagnóstico e o tempo em que os sintomas começaram a se manifestar.

A morte celular programada, chamada apoptose, é um processo responsável pela eliminação de células indesejáveis do organismo, seja devido a um remodelamento de tecido durante a embriogênese ou regulação de renovação celular, seja como estratégia de defesa contra determinados patógenos (STRASSER *et al.*, 1997).

2.1.1 Etiopatogenia

Sugere-se que a origem do TAC pode estar relacionada a anormalidades no processo de proliferação celular e/ou programação da morte das células do córtex adrenal durante o seu desenvolvimento embrionário (LEFEVRE *et al.*, 1984; HARTLE *et al.*, 1997; FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

A hiperplasia adrenocortical se constitui em processo policlonal, porém os TAC são geralmente lesões monoclonais (BEUSCHLEIN *et al.*, 1994). Isso indica a necessidade de alterações genéticas em *loci* específicos no genoma para a tumorigênese adrenal. Várias anormalidades cromossômicas são relacionadas a esse processo, incluindo os *loci* genômicos 11p e 17p (HENRY *et al.*, 1989; YANO *et al.*, 1989) que abrigam genes de supressão tumoral ou de função oncogênica do córtex adrenal, dentre eles o *TP53* (em 17q13.1) (MALKIN *et al.*, 1990; LIN *et al.*, 1984). No entanto, nenhum desses genes parece ser específico para a patogênese do TAC.

A proteína p53 é um sensor de estresse celular e responde a uma variedade de condições potencialmente injuriantes, tais como raios ultravioletas, radiação ionizante, hipóxia e hiperproliferação. Diferentes mutações de *TP53* podem causar uma variedade de defeitos funcionais neste gene com diversas expressões clínicas e em 1998, BIRCH *et al.* relataram a associação entre o tipo de mutação de *TP53* e o fenótipo do câncer em pacientes com Síndrome de Li-Fraumeni. A habilidade do mutante *TP53* em conferir potencial tumorigênico está relacionada, em muitos casos, a sua função de transativação (LIN *et al.*, 1995).

A alta incidência de câncer em certas famílias está associada a mutações em células germinativas no gene *TP53*. De fato, KLEIHUES *et al.* (1997) propuseram que o carcinoma de córtex adrenal na infância é “quase um diagnóstico de um alelo de *TP53* mutante que foi herdado”.

Aproximadamente 95% dos TAC no estado do Paraná apresentam mutação idêntica em uma base (CGC→CAC) no exon 10 do gene *TP53* (RIBEIRO *et al.*, 2001). O resultado dessa mutação na linhagem germinativa é a substituição da arginina por uma histidina no aminoácido 337 (R337H). Este alelo mutante foi mostrado ser

deficiente em pH alcalino e em temperaturas supra-fisiológicas (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002; HAINAUT, 2002).

A penetrância estimada do alelo R337H no TAC é aproximadamente 10% (FIGUEIREDO *et al.*, 2006).

No estado do Paraná e, provavelmente, no estado de São Paulo, a incidência de TAC é de 3,4 /milhão (PIANOVSKI *et al.*, 2006). Este número representa um dado estatístico relevante, pois a incidência mundial é 0,3-0,38/milhão de crianças abaixo de 15 anos (GURNEY *et al.*, 1995). A segunda maior incidência de TAC, 0,64/milhão de crianças com idade inferior a 15 anos, foi relatada na região noroeste da Inglaterra entre 1965 e 1986 (BIRCH *et al.*, 1988).

Tem-se sugerido que fatores ambientais poderiam contribuir com o aparecimento de câncer e mutações somáticas (ZAHM *et al.*, 1998). O papel dos compostos agrotóxicos na patogênese do TAC é controverso e aparentemente, não possui relação com a mutação R337H do *TP53*. Essa especulação baseia-se no achado de que mutação no *TP53* e em outros genes pode ser seletivamente induzida por agentes ambientais, como aminas aromáticas, benzopireno e aflatoxina B (NAGAO *et al.*, 1993; SORLIE *et al.*, 1998). No entanto, FIGUEIREDO *et al.* (2000), em um estudo realizado no estado do Paraná, demonstraram por meio de experimentos utilizando pesticidas e herbicidas em animais, que o papel dessas substâncias na tumorigênese adrenocortical ainda não está claro. Embora não se possa afirmar qual é a causa dessa neoplasia infantil, sabe-se que essa mutação surgiu há pelo menos 100 anos (FIGUEIREDO *et al.*, 2006), ou seja, numa época quando não existiam os agrotóxicos atuais. Entretanto, não se pode descartar totalmente a participação dos agrotóxicos, por exemplo, em crianças que já herdaram a mutação *TP53* e estão em processo de perda do alelo normal e evoluindo com outras alterações moleculares.

Muitas das características epidemiológicas e clínicas observadas em tumor adrenocortical são diferentes quando se comparam pacientes infantis e adultos, sugerindo que são entidades diferentes e, provavelmente, causadas por processos etiológicos diferentes (PEREIRA *et al.*, 2004). A apresentação clínica dessa patologia em crianças é caracterizada por marcante predomínio de síndrome virilizante com ou

sem Síndrome de Cushing, ao passo que a grande maioria dos pacientes adultos é assintomática ou apresenta Síndrome de Cushing (HUVOS *et al.*, 1970; KING *et al.*, 1979; PEREIRA *et al.*, 2004). Cerca de 90% dos tumores em adultos são benignos, enquanto que apenas 10% dos pacientes infantis recebem esse mesmo laudo histopatológico (PEREIRA *et al.*, 2004). O principal parâmetro para prognóstico de TAC é o tamanho do tumor, enquanto em adultos é a histologia do tecido (BUGG *et al.*, 1994). FIGUEIREDO *et al.* (1999) estudando amostras de TAC do sul do Brasil relataram a presença de amplificação em 9q34. Nesse *locus* se encontram alguns oncogenes relacionados ao surgimento de várias neoplasias, como hamartoma (VAN SLEGTHENHORST *et al.*, 1997), carcinoma de bexiga (HABUCHI *et al.*, 1995; HORNIGOLD *et al.*, 1999) dentre outros. Em adultos, foi verificado que essa amplificação ocorre menos freqüentemente que em crianças (KJELLMAN *et al.*, 1996; JAMES *et al.*, 1999). Esses achados sugerem também origem diferenciada para tumor adrenocortical em crianças e adultos.

2.1.2 Expressão das enzimas esteroidogênicas e esteroidogênese durante o desenvolvimento da glândula adrenal

Algumas características básicas na expressão de enzimas esteroidogênicas diferenciam a adrenal fetal da pós-natal. A zona fetal, na glândula rudimentar, expressa a enzima esteroidogênica 17 α -hidroxilase (CYP17A1). A zona definitiva, desenvolvida logo após, não apresenta expressão de CYP17A1. A zona fetal expressa também a enzima que cliva a cadeia lateral do colesterol, colesterol 20-22 desmolase (CYP11A1), mas não a 3 β -esteróide delta-isomerase 2 (2HSD3B), indicando que a adrenal fetal produz primariamente DHEA e seus derivados sulfatados. Esses compostos servem como precursores para o estradiol, derivado da placenta, que é fundamental para manter a gestação (ARON; TYRRELL, 1994).

A zona glomerulosa, derivada da zona definitiva, adquire capacidade esteroidogênica no terceiro trimestre e produz principalmente aldosterona, sob o controle do sistema renina-angiotensina (quadro 1).

QUADRO 1 - ZONAS FUNCIONAIS DO CÓRTEX ADRENAL ADULTO

	ZONA GLOMERULOSA	ZONA FASCICULADA	ZONA RETICULAR
LOCALIZAÇÃO	Periférica	Mediana	Central
ESTÍMULO	Angiotensina II (ACTH)	ACTH	ACTH
RECEPTOR DE MEMBRANA PRIMÁRIO	Receptor angiotensina II	MC2R	MC2R
ATIVIDADE ENZIMÁTICA ESPECÍFICA	CYP11 β	CYP17; CYP11 β 1	CYP17(17OH e 17,20 liase)
HORMÔNIO PRODUZIDO	Aldosterona	Cortisol	Esteróides sexuais (DHEA-S)
FUNÇÃO	Regulação do volume intra-vascular	Homeostase da glicose; mobilização de energia dos depósitos	Adrenarca; bem estar
DEFICIÊNCIA	Hiponatremia, hipercalemia, hipotensão	Hipoglicemia, falta de resposta ao stress	Desconhecida

FONTE: Traduzido de KEEGAN E HAMMER, 2002.

NOTA: MC2R – receptor do ACTH

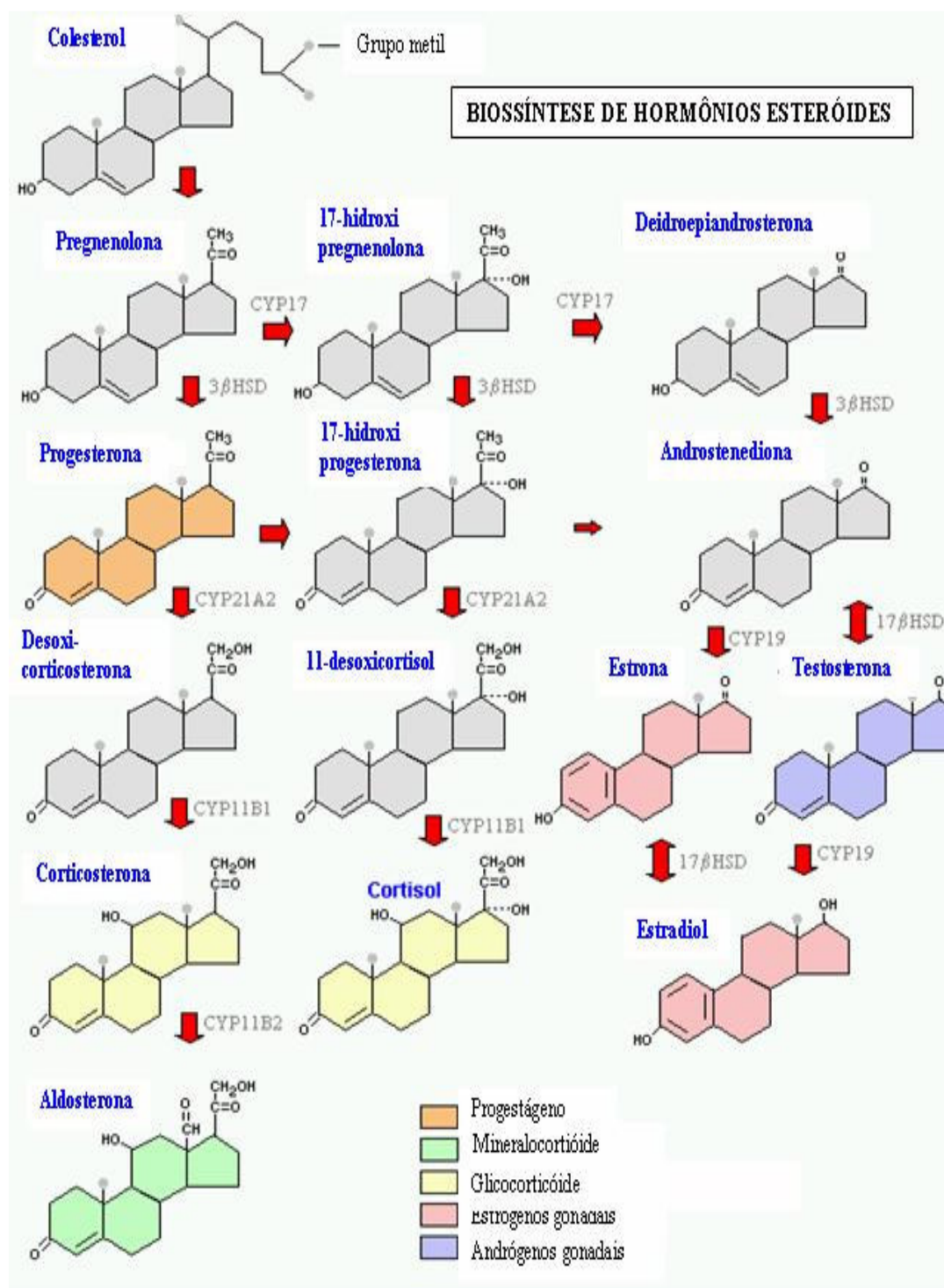
A zona fasciculada secreta glicocorticóides sob estímulo do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), enquanto que a zona reticular secreta DHEA e DHEA-S (quadro 1). As concentrações séricas desses andrógenos declinam quando a zona fetal regride, e depois voltam a aumentar durante a infância com a formação da zona reticular (que surge no lugar da zona fetal), coincidindo com a adrenarca. Embora anatomicamente as três camadas do córtex adrenal sejam distintas, elas compartilham enzimas nas três vias esteroidogênicas. Entre elas, a proteína reguladora aguda da esteroidogênese (StAR), que facilita a transferência do colesterol para a membrana interna da mitocôndria, a CYP11A, a isoenzima HSD3B2 e a 21-hidroxilase esteróide (CYP21A2). Além dessas, presentes em todas as camadas do córtex adrenal, a atividade de certas enzimas chaves que catalisam reações terminais na via de biossíntese dos esteróides, permite que as diferentes zonas produzam diferentes esteróides. Aldosterona sintetase (CYP11 β 2) é expressa exclusivamente na zona glomerulosa e é responsável por três reações sucessivas que convertem corticosterona à aldosterona. A enzima CYP11 β 1 é expressa nas

zonas internas e hidroxila 11-desoxicortisol para produzir cortisol, o glicocorticóide predominante nos seres humanos. As zonas internas também expressam CYP17A1, que é requerida para a biossíntese de cortisol e andrógenos, mas não é utilizada para biossíntese de aldosterona (HAMMER *et al.*, 2004). A figura 3 mostra as três vias de síntese dos esteróides. A análise das enzimas esteroideogênicas permitiu compreender a síntese esteroideogênica adrenal. A maioria dessas enzimas pertence à família das P450 citocromo-oxigenases. Devido às diferenças enzimáticas entre a zona glomerulosa e as duas camadas internas (fasciculada e reticular), o córtex adrenal funciona como duas unidades separadas, com diferentes vias de regulação e produtos secretados.

Os mecanismos que levam às diferenças esteroideogênicas entre a adrenal fetal e a adulta humanas não são bem conhecidos. RAINEY *et al.* (2001), usando microarranjo para comparar os níveis de expressão de vários transcritos (ácido ribonucleico mensageiro - RNAm) entre a adrenal fetal e a humana, mostraram que 69 deles apresentaram uma diferença maior que 2,5 vezes na expressão. As maiores diferenças foram observadas para transcritos do fator de crescimento II insulina-símile (IGF-II) (25 vezes maior na adrenal fetal) e de HSD3B (24 vezes maior na adrenal adulta). Os transcritos relacionados à biossíntese de esteróides ou ao crescimento e desenvolvimento tiveram valores maiores na adrenal fetal. Os relacionados à imunidade celular e à transdução de sinal apresentaram valores maiores na adrenal adulta.

A síntese do cortisol ocorre pela ação da CYP17A1, que leva à 17 α -hidroxilação da pregnenolona dentro do retículo endoplasmático liso, para formar 17 α -hidroxipregnenolona. Esse esteróide é convertido à 17 α -hidroxiprogesterona pela HSD3B. O passo seguinte é a 21-hidroxilação pela CYP21 da 17 α -hidroxiprogesterona, para formar 11-deoxicortisol, o qual é hidroxilado pela CYP11 β 1 para formar cortisol. As zonas fasciculada e reticular também produzem 11-deoxicorticosterona, 18-hidroxideoxicorticosterona e corticosterona.

FIGURA 3 - VIAS MAIORES DA BIOSSÍNTESE DE ESTERÓIDES

FONTE: <http://arbl.cvmb.colostate.edu/>

A produção de androgênios a partir da pregnenolona e progesterona requer a participação da CYP17 e, portanto, não ocorre na zona glomerulosa. A maior produção quantitativa de androgênios é pela conversão da 17 α -hidroxipregnenolona aos esteróides de C19 (DHEA e DHEA-S). Outro androgênio importante é a androstenediona, produzido a partir da 17 α -hidroxiprogesterona pela ação da 17,20-desmolase (ARON; TYRRELL, 1994).

2.1.3 Diagnóstico e tratamento

As hipóteses sobre a origem embrionária do TAC de crianças se baseiam em, pelo menos duas observações. O fato de que crianças mais jovens apresentam manifestações mais precoces, a predominância de tumores virilizantes, juntamente às características histopatológicas da neoplasia (BUGG *et al.*, 1994) indicam que o tumor surgiu na zona fetal do córtex adrenal, no período pré-natal. A zona fetal representa 85% do córtex adrenal durante o desenvolvimento do feto e produz dehidroepiandrosterona, em razão da presença de 17-hidroxilase (KEEGAN; HAMMER, 2002). Em contraste, o TAC que se desenvolve em adolescentes pode se originar da zona definitiva do córtex adrenal. É possível que a presença de *TP53* mutante aumente a penetrância desse tumor na zona fetal, porém, não na definitiva. Essa premissa é consistente com o fato de que em indivíduos com mutações constitucionais no gene *TP53* (Síndrome de Li-Fraumeni), o TAC ocorre durante a primeira década de vida (KLEIHUES *et al.*, 1997).

Aproximadamente 12% dos casos de TAC são diagnosticados durante o primeiro ano de vida e 60%, antes dos quatro anos de idade (MICHALKIEWIECZ *et al.*, 2004). Há anos atrás o diagnóstico, na maioria dos casos era feito tardiamente (estágios III e IV) e, provavelmente a causa desse atraso era multifatorial. A primeira seria em razão da necessidade de um trabalho mais detalhado no sentido de buscar alterações endócrinas ainda quando o tumor está pequeno e produzindo leves manifestações clínicas. A segunda seria que as crianças com TAC não aparentam estar doentes, com exceção das alterações endócrinas. E, finalmente, o crescimento do

tumor pode ser muito lento, o que se observa em casos em que existe um longo espaço de tempo entre as primeiras manifestações clínicas percebidas, na criança ou no adolescente, e a detecção do tumor (MICHALKIEWIECZ *et al.*, 2004). Essa última observação é consistente com o processo multifásico da carcinogênese resultante do acúmulo de várias alterações genéticas (SHIH *et al.*, 2001).

O intervalo entre o surgimento dos sinais e sintomas e o diagnóstico não está relacionado ao prognóstico ou ao tamanho do tumor, por isso, o tamanho do tumor pode refletir a qualidade das anormalidades genéticas adquiridas. Por conseguinte, parece que existe uma fase inicial em que o tumor se desenvolve lentamente, caracterizada, especialmente, pelas manifestações endócrinas e ausência de massa tumoral palpável e, em seguida, uma progressão rápida do tumor (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004).

O início dos sintomas e o tamanho do tumor contribuem para avaliação do tempo de surgimento do TAC, que provavelmente ocorre próximo à fase de intensas transformações do córtex adrenal embrionário (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

A glândula adrenal normal (sem tumor) produz, sob estímulos de ACTH sintetizado no hipófise, cortisol, androgênios, estrogênios e mineralocorticóides (FIGUEIREDO *et al.*, 2003). O diagnóstico de TAC é sugerido pelos exames de imagem (tomografia, ecografia ou ressonância magnética) e os testes laboratoriais utilizados como auxiliares ao seu diagnóstico que revelam, geralmente, aumento de androgênios e/ou cortisol (PEREIRA *et al.*, 2004).

O prognóstico é regido pelo sucesso da cirurgia, forma de tratamento mais eficiente para o TAC (BRENNAN, 1987) e que apresenta maior potencial curativo (CHUDLER; KAY, 1989). Em um registro internacional de TAC foi relatada sobrevida de aproximadamente 55% dos pacientes (MICHALKIEWIECZ *et al.*, 2004).

NELSON E WOODARD (1949) observaram que a administração do inseticida 1,1-di-(p-clorofenil)-2,2-dicloroetano (DDD) a cães produzia necrose seletiva nas zonas reticular e fasciculada do córtex adrenal. Dentre os diversos isômeros do DDD, o isômero *o,p'* é considerado o responsável pela atividade adrenocorticolítica desse inseticida (CUETO *et al.*, 1958). Mitotano é o nome dado ao

composto 1-(o-clorofenil)-1-(p-clorofenil)-2,2-dicloroetano (*o,p'* DDD) que se usa desde 1960 no tratamento de carcinomas adrenocorticais inoperáveis (NICHOLS *et al.*, 1957; BERGENSTAL *et al.*, 1960). LUBITZ *et al.* (1973) foram os primeiros a demonstrarem a resposta de tumores “funcionantes” e “não-funcionantes” ao mitotano.

O mecanismo de ação do mitotano ainda não foi elucidado, mas está bem estabelecido seu ataque seletivo sobre as mitocôndrias das células adrenocorticais, normais ou neoplásicas (KAMINSKY *et al.*, 1962; HART *et al.*, 1973; FANG, 1979).

Como a droga lesa o córtex adrenal, a administração de adrenocorticosteróides é indicada, em particular aos pacientes com evidência de insuficiência adrenal, choque ou trauma grave (HOGAN *et al.*, 1978).

FANG (1979) estudou uma linhagem clonal de células de carcinoma adrenocortical humano e constatou que em alguns estágios do ciclo celular essas células se mostram mais vulneráveis aos efeitos citotóxicos do mitotano. A partir destes achados acredita-se que alguns casos relatados de fracasso no uso de mitotano (LUBITZ *et al.*, 1973) foram conseqüências de dose inadequada da droga.

ZANCANELLA *et al.* (2006) relatam que com o uso de mitotano, etoposídeo, cis-platina e doxorrubicina em pacientes com TAC, é possível conseguir remissão completa e prolongada de lesões metastáticas e/ou pulmonares por períodos que variaram de 6 a 20 meses. Constatou-se neste estudo que pacientes que recidivam após o uso de quimioterapia e cirurgia têm mau prognóstico.

2.2 FATOR ESTEROIDOGÊNICO-1 (*SF-1*)

O *SF-1* é um membro da superfamília de receptores nucleares órfãos, também conhecido como *Adrenal-4-binding protein* (*Ad4BP*) e classificado como NR5A1. O gene *SF-1* localiza-se no cromossomo 9q33 (TAKETO *et al.*, 1995) e apresenta forte homologia ao receptor nuclear *Fushi tarazu factor* (*Ftz-F1*) da *Drosophila* e ao receptor nuclear do camundongo *long terminal repeat-binding protein* (TSUKIYAMA *et al.*, 1992). *SF-1* codifica a transcrição de uma proteína nuclear de aproximadamente 53 kDa, que se liga, monomericamente, às regiões promotoras dos

genes alvos (quadro 2) e reconhece variações da sequência de DNA (ácido desoxirribonucléico) PyCAAGGPyC ou PuPuAGGTCA (WILSON *et al.*,1993). Recebeu o nome de fator esteroideogênico-1 devido ao seu papel chave na regulação das enzimas esteroideogênicas. Os laboratórios de PARKER e de MOROHASHI, clonaram, independentemente, cDNAs codificadores de SF-1 (LALA *et al.*,1992; HONDA *et al.*,1993).

QUADRO 2: EXEMPLOS DE GENES REGULADOS POR SF-1

GLÂNDULA ADRENAL E ESTEROIDOGÊNESE
<ul style="list-style-type: none"> - ACTH - Receptores HDL SR-B1 - StAR - CYP11A1 - 3β-hidroxiesteróide desidrogenase - Aromatase
DIFERENCIAÇÃO SEXUAL
<ul style="list-style-type: none"> - DAX1 - AMH - Receptor do AMH - Produtos do gene Insulina-símile 3
REPRODUÇÃO
<ul style="list-style-type: none"> - Receptor do GnRH - Hormônio glicoprotéico sub-unidade α - LH sub-unidade β - Oxitocina - Inibina sub-unidade α

FONTE: OZISIK *et al.*, 2003

NOTA: HLD SR-B1: receptores *scavenger* B1; LDH: lipoproteína de alta densidade ; AMH: hormônio anti-Müllerian; GnRH: hormônio liberador de gonadotropina , LH: hormônio luteinizante

Em 1996, OBA *et al.* clonaram o gene *SF-1* humano, deduziram que consistia em uma sequência de 1383 nucleotídeos e determinaram a estrutura desse gene (figura 4).

FIGURA 4 : SEQUÊNCIA DO GENE *SF-1*

ORIGEM

```

1  ggaggacgga  cggacagggc  cagcctgctg  tccggctgcc  gcccgccgtg  gtgtgagggg
61  gtttctgcgc  acccacagtc  gccaccgtcc  cacctgggct  gccggagcct  cccctggac
121  ccttgggtgcc  cactgccacc  ctcacccggt  gtgagagcgc  tgcttccgct  tcgcgagcgc
181  cgcgggcatg  gactattcgt  acgacgagga  cctggacgag  ctgtgccccg  tgtgcgggga
241  caaggtgtcc  ggctaccact  acggactgct  cacgtgtgag  agctgcaagg  gcttcttcaa
301  gcgcacgggtg  cagaacaaca  agcactacac  gtgcaccgag  agccagagct  gcaagatcga
361  caagacgcag  cgcaagcgtc  gtcccttctg  ccgcttccag  aaatgcctga  cgggtggggt
421  gcgcctggaa  gccgtgcgcg  ctgaccgtat  gaggggtggc  cggaacaagt  ttgggcccgt
481  gtacaagcgg  gaccggggcc  tgaacacgca  gaagaaggca  cagattcggg  ccaatggctt
541  caagctggag  acagggcccc  cgatgggggt  gccccgcgcg  cccctcccg  caccggacta
601  cgtgctgcct  ccagcctgc  atgggcctga  gcccaaggcg  ctggccgccc  gtccacctgc
661  tgggccactg  ggcgactttg  gggccccagc  actgcccag  gccgtgccg  gtgcccacgg
721  gccactggct  ggctacctct  accctgcctt  tcttggccgt  gccatcaagt  ctgagtacct
781  ggagccttat  gccagcccc  cacagcctgg  gctgccgtac  ggctaccag  agcccttctc
841  tggagggccc  aacgtgcctg  agctcatcct  gcagctgctg  cagctggagc  cggatgagga
901  ccaggtgcgg  gcccgcatct  tgggctgcct  gcaggagccc  accaaaagcc  gccccgacca
961  gccggcgccc  ttggccctcc  tgtgcagaat  ggccgaccag  accttcatct  ccactgtgga
1021  ctgggcacgc  aggtgcatgg  tcttcaagga  gctggaggtg  gccgaccag  tgacgtgct
1081  gcagaactgc  tggagcgagc  tgctgggtgt  cgaccacatc  taccgccagg  tccagcacgg
1141  caaggagggc  agcatcctgc  tggtcaccgg  gcaggaggtg  gagctgacca  cagtggccac
1201  ccaggcgggc  tcgctgctgc  acagcctggt  gttgcgggcg  caggagctgg  tgctgcagct
1261  gcttgcgctg  cagctggacc  ggcaggagtt  tgtctgcctc  aagttcatca  tctcttcag
1321  cctggatttg  aagttcctga  ataaccacat  cctggtgaaa  gacgtcagg  agaaggccaa
1381  cgcgcgccctg  cttgactaca  cctgtgccca  ctaccgcac  tgccgggaca  aattccagca
1441  gctgctgctg  tgcctgggtg  aggtgcgggc  cctgagcatg  caggccaagg  agtacctgta
1501  ccacaagcac  ctgggcaacg  agatgccccg  caacaacctg  ctcacgaaa  tgctgcaagc
1561  caagcagact  tgagcctggg  ccggggcgcg  ggccgggact  gggggcggga  ctggggcgcg
1621  ggccctggcg  gggccgcagc  cacaccgctg  gctctgcctg  gttcattttc  tgatgccac
1681  cgaggagccc  cagccccgtc  ccagaggccg  ctgccccga  gttctgacac  tgtgtgtttg
1741  ggaagtgggt  gaggctgggc  agggcctggc  ggaggtggag  tggccactgg  cacttgctg
1801  ctgcttggag  tgccccaagg  aggtggctgt  taaccaccgc  ccccgcccc  tccctgctcc
1861  cagctctctc  tcttggagtc  tgaagcctgc  aggtccgggg  aggaggttcg  ggattccctg
1921  gtgggcctcg  acgtcccttg  gatcagaggt  catcccttcc  tctctcctg  gaaacagaca
1981  gggagaagtt  gagcaggtat  caactagggt  aggagagagg  gtctccagtg  tccccccat
2041  agagaccagg  agggagagcc  tctgttttgt  aaactaagga  taaccgagtt  tgctaaattg
2101  agaggggcta  ttgggcccct  gaggacacta  ggagactggg  taggacaaaa  agaccttctc
2161  ctagccctt  ctaccccacc  tgacctctgc  aagagggggc  attgatacat  catcgggaaa
2221  aaactttgct  ccaggcatca  ctgattccct  ctcccaccca  aggagaacgt  ttggtacaat
2281  cgacatccta  gccccaccca  gaggtggccc  tcccaggctg  gtatttatct  gcaaggttgt
2341  agtcaagagg  tttttctccc  cgctttttgt  ttttaagctt  ctagacactc  cttgaaatgt
2401  gtgtgtgatg  gagggaagg  gacagatttg  aggactgaag  ctggggcttg  gggattgcc
2461  ctaagtacag  ctgatggttt  ctccccggac  actcgcttac  taagtacct  tggggtgtg
2521  ctgggtcatt  acttctgagc  ccagcccca  atccagagaa  gcgtgttg  ccgccccta
2581  ccactagggt  gaacagcagg  atgccctgtt  gggggcttca  ggtctctgtg  ggtgggaatg
2641  caagtgaact  tgggagggg  cacgggctg  tagatcagg  atagcgtgt  tgatccctc
2701  tctgtggctc  caacccttg  ggtcccttg  tgcaaaccca  tgaagctgg  cctcagctcc
2761  ctgacccct  gtccctagtc  atgaaggaca  ctctgcagg  tgaagacca  gggagaggcc
2821  tcggctgtct  cctgtccccg  gcgggggtgc  tgctgtccgt  cccgcttca  tgttactgtt
2881  gcagcttgtg  ctgagcctgc  ccagttggag  gagactggg  acccctgcct  cctgectccc
2941  gctcccgcc  accctgtctc  agtacctccc  cccccgcgc  cctgaaacat  gtgcccctgc
3001  caaggccgga  gaccacagc  cctgaaacga  gaagtgcct  taaggatcac  cccagcccc
3061  acagccctgg  aataaatttc  gcaattagtt  tccaaaaaaa  aaaaaaaaaa  aaaaaaaaaa

```

//

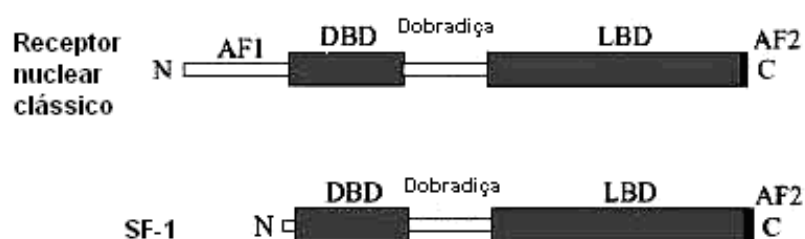
FONTE: OBA *et al.*, 1996.

2.2.1 A estrutura de SF-1

Os receptores nucleares geralmente apresentam características comuns (figura 5), como o domínio de ligação ao DNA (DBD), o domínio de ligação ao ligante (LBD) e dois domínios de ativação, um amino-terminal, chamado função de ativação 1 (AF-1) e um carboxi-terminal, o AF-2 (domínio de transativação), cuja atividade é normalmente dependente da presença de um ligante (MANGELSDORF *et al.*, 1995). Em todas as espécies estudadas, SF-1 apresenta um DBD clássico, caracterizado por duas estruturas em dedos de zinco na região N-terminal, que intermediam sua ligação ao DNA (HAMMER; INGRAHAM, 1999)

A conservação do domínio AF2 sugere que um ligante possa intermediar a transativação por meio de SF-1. Essa proteína tem uma sequência de 461 aminoácidos e é altamente homóloga a de outras espécies incluindo humanos, gado, carneiros, cavalos, camundongos, ratos, porcos, galinhas, tartarugas, salmões e vermes (OBA *et al.*, 1996; PARKER *et al.*, 2002).

FIGURA 5 - ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DA PROTEÍNA SF-1



FONTE: Modificado a partir de VAL *et al.*, 2003

NOTA: Na estrutura de SF-1 se destacam 3 partes, a que se liga ao DNA (DBD), a que se liga ao seu ligante (LBD) e a relacionada com a transativação (AF-2). Nota-se que SF-1 não possui o domínio AF-1.

2.2.2 A expressão de *SF-1* nos tecidos adultos

Em relação aos tecidos esteroideogênicos adultos, IKEDA *et al.* (1993) mostraram que o padrão de expressão de *SF-1*, geralmente, se correlaciona com os papéis a ele propostos na regulação das enzimas responsáveis pela síntese de esteróides (HATANO *et al.*, 1994). Assim, a proteína SF-1 foi detectada nas células do córtex adrenal, células testiculares de Leydig e Sertoli, células da teca e granulosa do ovário, pituitária gonadotrófica, baço e no núcleo ventro-medial hipotalâmico (VMH) (IKEDA *et al.*, 1993; TAKAYAMA *et al.*, 1994; SASANO *et al.*, 1995). SF-1 foi também verificada na placenta, que produz grande quantidade de progesterona a partir do colesterol, e também converte andrógenos adrenais a estradiol (HONDA *et al.*, 1993; BAMBERGER *et al.*, 1996).

2.2.3 A expressão de SF-1 nos tecidos embrionários

Os perfis de expressão de SF-1, espacial e temporal, foram estudados, nos tecidos embrionários de camundongos (IKEDA *et al.*, 1994). Como foi demonstrado por hibridização *in situ*, transcritos de *SF-1* foram detectados no dia 9 de vida embrionária do camundongo (E9), no anel urogenital, que dá origem às células da adrenal, gônadas e mesonéfron. Posteriormente, a proteína SF-1 foi detectada em duas populações de células: um grupo adjacente à aorta dorsal, que representa os precursores adrenocorticais e um grupo maior, adjacente ao epitélio celômico, que representa os precursores gonadais.

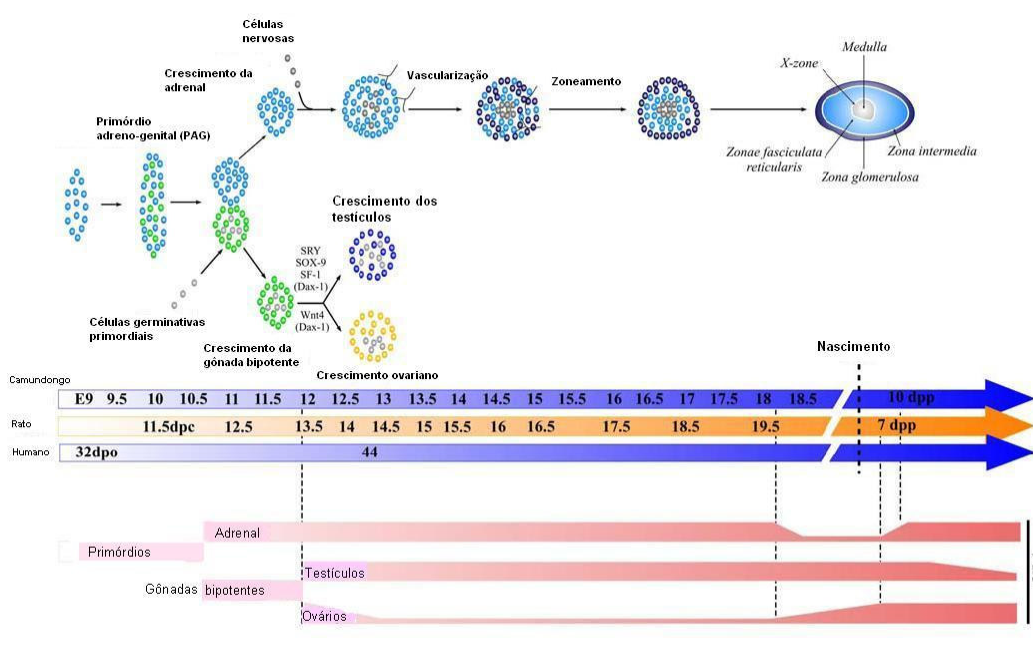
Com respeito ao desenvolvimento adrenocortical, transcritos de *SF-1* foram detectados no primórdio adrenogenital no dia E10-E10.5. Essa expressão precede nitidamente a da enzima citocromo *side chain cleavage* (P450_{scc}), detectada somente em E11, corroborando o conceito de que SF-1 é necessário para a expressão das enzimas esteroideogênicas. Em E12.5-E13.5, a expressão de SF-1 se verifica no córtex adrenal (IKEDA *et al.*, 1994) (figura 6).

Nas gônadas, a expressão de SF-1 precede a de SRY, sendo detectado no E9. Nesse período, testículos e ovários não são distintos histologicamente, constituindo as

gônadas bipotenciais ou indiferenciadas. Em E12.5, coincidindo com a formação dos cordões testiculares, a expressão do *SF-1* persiste e é detectada nas células esteroidogênicas de Leydig e nos cordões testiculares (figura 3).

No ovário, ao contrário, há um aparente declínio dos transcritos do *SF-1* coincidindo com a diferenciação sexual gonadal, sugerindo que a diferenciação sexual feminina normal é facilitada pela diminuição da expressão do *SF-1*. Suas concentrações no ovário permanecem baixas ou indetectáveis até o início do desenvolvimento folicular (figura 6). É quando *SF-1* é detectado nas células da teca e da granulosa, no estágio pré-antral, que precede a expressão da aromatase nas células da granulosa, concordando com o modelo que *SF-1* é um regulador essencial da expressão dessa enzima (MICHAEL *et al.*, 1995).

FIGURA 6: PADRÃO DE SF-1 NO DESENVOLVIMENTO ADRENAL E GONADAL



FONTE: VAL *et al.*, 2003.

NOTA: Os eventos-chaves no desenvolvimento dos tecidos esteroidogênicos em camundongos são mostrados. Aspectos moleculares (SRY, SOX9, SF-1 e DAX1) e determinação sexual (Wnt4, DAX1) estão em destaque. Abreviações: E: dia embrionário; dpc: dias pós coito; dpp: dias pós parto; dpo: dias pós ovulação. Os níveis de SF-1 estão representados, esquematicamente, abaixo da escala temporal.

2.2.4 Funções de SF-1 *in vivo*

Para avaliar o papel de SF-1 *in vivo*, foram estudados camundongos geneticamente modificados (GM) destituídos do gene *SF-1* (PARKER *et al.*, 2002). Confirmando os achados de RICE *et al.* (1991) e LALA *et al.* (1992), os pesquisadores LUO *et al.* (1994) observaram que os animais sem *SF-1* (-/-) morreram, por insuficiência adrenal logo após o nascimento, além de exibirem reversão de sexo masculino para feminino no fenótipo genital, demonstrando a necessidade do gene para esteroidogênese gonadal e adrenal.

Por analogia aos seres humanos com ausência de expressão de enzimas esteroidogênicas, PARKER *et al.* (2002) imaginaram que as glândulas adrenais do camundongo GM *SF-1* -/- poderiam ser hiperplásicas, devido à inabilidade de produzir glicocorticóides, com conseqüente exposição a altas concentrações séricas de ACTH; contudo, verificaram que as gônadas e adrenais estavam ausentes nesses camundongos. Estudos subseqüentes mostraram que na ausência de *SF-1*, as gônadas e adrenais estavam presentes nos estádios iniciais de desenvolvimento, seguidas de regressão. A identificação e análise de mutações em *SF-1* nos seres humanos mostraram comportamento semelhante, com insuficiência adrenal e reversão sexual nos pacientes 46,XY (OZISIK *et al.*, 2003). Embora ainda pouco conhecido, o papel do *SF-1* no sistema nervoso central é também importante, pois os camundongos GM *SF-1* -/- não apresentam VMH, região ligada à regulação do apetite e comportamento reprodutivo (IKEDA *et al.*, 1995).

2.2.5 SF-1 e os TCAs

Recentemente, nosso grupo de pesquisa relatou a presença de um aumento no número de cópias de *SF-1* em seis dos nove casos de TCAs do Paraná em que havia sido detectado um ganho em 9q, sugerindo uma correlação entre o aumento no número de cópias de *SF-1* e tumorigênese adrenocortical (FIGUEIREDO *et al.*, 2005). A amplificação que foi detectada em adenomas e carcinomas, tanto na forma clínica

virilizante quanto na forma mista (virilizante + Cushing), não apresenta diferença quanto à evolução e sexo e não se correlaciona com idade ou estágio do tumor. Com relação à expressão da proteína SF-1, ela se encontrou aumentada em todas as amostras de TAC estudadas. No entanto, não houve correlação entre o número de cópias do gene *SF-1* e sua expressão protéica, indicando diferentes taxas de metabolismo para o transcrito e a proteína ou, ainda, fatores que silenciam parcialmente a expressão gênica. Da mesma forma, a expressão protéica de *SF-1* não foi associada às variáveis: idade, sexo, forma clínica, estadiamento, tipo histológico, concentrações séricas de cortisol e/ou DHEA-S, nem à sobrevida (PIANOVSKI *et al.*, 2006b).

2.2.6 Interação de DAX1 com SF-1 e outros fatores de transcrição

DAX1 (*Dosage-sensitive sex reversal Adrenal hypoplasia congenita, critical region on the X chromosome gene-1*), também descrito como NROB1, é um membro nuclear órfão da superfamília de receptores hormonais. Seu nome vem de seu duplo papel na fisiopatologia em humanos: duplicações no Xp21, que contém o gene *DAX1*, causam reversão sexual fenotípica nos indivíduos XY; por outro lado, mutações do gene *DAX1* são responsáveis pela hipoplasia adrenal congênita, ligada ao cromossomo X, invariavelmente associada com hipogonadismo hipogonadotrófico (BARDONI *et al.*, 1994; MUSCATELLI *et al.*, 1994).

A proteína DAX1 atua como regulador negativo da ativação da transcrição induzida por SF-1, através de um potente domínio de repressão transcricional presente na região carboxi-terminal (ITO *et al.*, 1997; LALLI *et al.*, 1997).

DAX1 pode reprimir a transativação de *SF-1*, seja por se ligar às regiões promotoras dos genes regulados por SF-1 (por exemplo, *StAR* e *DAX1*) (ZAZOPOULOS *et al.*, 1997), seja por interação direta com *SF-1*, através de uma das seqüências LXXLL presentes na região N-terminal do DAX1 (SUZUKI *et al.*, 2003).

A presença de sítios de ligação funcionais de SF-1 na região promotora de *DAX1* (YU *et al.*, 1998) e a expressão reduzida de DAX1 nos camundongos GM sem *SF-1* (KAWABE *et al.*, 1999; HOYLE *et al.*, 2002) sugeriram um mecanismo de retro-alimentação negativa para controlar a atividade de SF-1 nos tecidos esteroideogênicos e reprodutivos.

Segundo LALLI; SASSONE-CORSI (1999), DAX1 se comporta como repressor transcricional em todos os contextos conhecidos. A perda da função silenciadora da transcrição por DAX1 causa impedimento do desenvolvimento do córtex adrenal e disfunção hipofisária e hipotalâmica. É possível, contudo, existirem moléculas que poderiam funcionar como ligantes para DAX1 (como sugere a conservação do domínio similar ao AF-2 na α -hélice da região carboxi-terminal) e alterar sua função, de repressor a ativador transcricional. Isso poderia ocorrer como resultado de modificações pós-transcricionais, em geral fosforilação ou associação com cofatores celulares específicos (LALLI e SASSONE-CORSI, 1999; FOWKES; BURRIN, 2003).

SF-1 e DAX1 são expressos exatamente nos mesmos tecidos, sugerindo que haja interação na função dos dois fatores, o que foi observado *in vitro* (ITO *et al.*, 1997) e também em sistema de duplo híbrido (NACHTIGAL *et al.*, 1998) e em células de mamíferos (CRAWFORD *et al.*, 1998). Já a presença de células expressando DAX1, mas não SF-1 em diferentes órgãos (IKEDA *et al.*, 2001) corrobora a idéia de que a função de DAX1 se estende além da regulação de genes dependentes de SF-1. O papel de DAX1 na regulação pós-transcricional é sugerido pelo seu deslocamento núcleo-citoplasmático, sua atividade de ligação ao RNA e sua associação com polirribossomos (LALLI *et al.*, 2000). CRAWFORD *et al.* (1998) mostraram que DAX1 pode recrutar seletivamente o co-repressor de receptor nuclear (N-CoR) para SF-1, o qual por sua vez recruta desacetilases da histona e induz a cromatina a um estado inativo, diminuindo a expressão do gene.

Domínios de interação com SF-1 foram mapeados entre os aminoácidos 92 e 288 de DAX1 (região compreendendo a segunda e terceira repetições e hélices H1-H3 na região carboxi-terminal) (ITO *et al.*, 1997).

O produto de *SF-1* se liga eficientemente aos elementos de DNA da região promotora de *DAX1* sugerindo que *SF-1* regule diretamente a expressão de *DAX1* e assim, *SF-1* esteja acima de *DAX1* na cascata reguladora que direciona o desenvolvimento de vários tecidos esteroideogênicos e/ou outros componentes do eixo hipotalâmico/hipofisário/adrenal-gonadal (BURRIS *et al.*, 1995).

2.2.7 Mutações de *SF-1*

Vários estudos têm mostrado as consequências de deleções de fragmentos de *SF-1* (*FtzF1*) em camundongos (LUO *et al.*, 1994; LUO *et al.*, 1995; SADOVSKY *et al.*, 1995; SHINODA *et al.* 1995). Camundongos homozigotos para a deleção do gene (-/-) (quadro 3) apresentaram agenesia completa da adrenal e das gônadas, reversão sexual de macho para fêmea e persistência das estruturas de Müller em machos. Falência adrenal se tornou aparente logo após o nascimento e uma ausência virtual do VMH promoveu uma redução nos níveis de gonadotropina na pituitária gonadotrófica (IKEDA *et al.*, 1995; SHINODA *et al.*, 1995). Os camundongos foram mantidos vivos por meio de terapia de reposição de esteróides, sugerindo que a deficiência de *SF-1* não resulta em perda absoluta da produção de gonadotropina pelas células da pituitária anterior (IKEDA *et al.*, 1995).

ACHERMANN *et al.* (1999) demonstraram a presença de uma mutação, de forma heterozigota, no gene *SF-1* em uma paciente com falência adrenal primária, reversão sexual XY e persistência das estruturas de Müller. Essa paciente apresentou insuficiência adrenal durante as primeiras duas semanas de vida e colapso vascular com 17 dias. Essa mutação se localizava na região “P box” (DBD) em que houve a substituição de uma glicina por um ácido glutâmico na posição 35 (G35E). A mutação não foi encontrada nos pais nem em outros 200 alelos controles. Estudos funcionais mostraram que a proteína mutante possui localização nuclear normal, no entanto, ela falha ao tentar se ligar e transativar vários genes alvos como *CYP11A*, *DAX1* ou hormônio luteinizante β (*LH\beta*) (ACHERMANN *et al.*, 1999; ACHERMANN *et al.*, 2001).

QUADRO 3: FENÓTIPOS RESULTANTES DE ALTERAÇÕES NO GENE *SF-1*

GENÓTIPO	CAMUNDONGO		HOMEM
	SF-1 -/-	SF-1 +/-	SF-1 -/- ou SF-1 +/-
Adrenal	– Agenesia	– Defeitos histológicos – Redução na resposta ao estresse – Defeitos no crescimento compensatório	– Insuficiência (agenesia ou disgenesia)
Testículos	– Agenesia – Reversão do sexo		– Reversão do sexo
Ovários	– Agenesia		– Normais
VMH	– Agenesia – Obesidade causada pela ausência de VMH (8 semanas)		
Pituitária	– Células gonadotrópicas defeituosas		

FONTE: VAL *et al.*, 2003.

Além da mutação G35E, em humanos outra mutação sugere a importância de SF-1 na diferenciação sexual masculina, a mutação recessiva R92Q (arginina → glutamina) (ACHERMANN *et al.*, 2002), localizada na região “A box” e importante na estabilidade da ligação de SF-1 com seus elementos responsivos.

Algumas evidências indiretas sugerem que vias extracelulares podem estar exercendo regulação da atividade de SF-1. Essa sugestão surge do fato que muitos genes alvos de SF-1 são estimulados por um hormônio peptídeo que sinaliza, por meio do segundo mensageiro adenosina monofostato cíclico (AMPc). O mais importante nesse achado é que, o aumento na regulação induzido por esses genes alvos é mediado, primeiramente, por SF-1 (LIU; SIMPSON, 1997; ITO *et al.*, 2000; HU *et al.*, 2001). Entretanto, SF-1 não parece ser fosforilado diretamente pela via AMPc/proteína quinase A (AMPc/PKA), mas pela proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) em um único resíduo de serina (S203) situado na grande região da dobradiça (*hinge*) central, entre o domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de ligação ao ligante (LBD) (LUND *et al.*, 1997; HAMMER *et al.*, 1999) (figura 7). A ativação da via MAPK modula a atividade transcricional de SF-1, aumentando o recrutamento de

cofatores, promovendo assim uma forma de regulação da atividade de SF-1 independente de ligante (HAMMER *et al.*, 1999). Nos últimos anos, evidências têm relacionado diretamente AMPc/PKA e Ras-Raf-MEK-ERK/MAPK, via ativação de pequenas GTPases relacionadas a Ras (LIEBMANN, 2001; ROBINSON-RECHAVI *et al.*, 2001), argumentando a favor da hipótese de que uma sinalização do receptor de hormônio peptídeo pode modular a atividade SF-1 via fosforilação Erk2-símile. De fato, pelo menos duas vias de peptídeos hormonais (hormônio que libera gonadotropina e hormônio adrenocorticotrópico) que sinalizam eventos *upstream* de SF-1 são mediadas por MAPK (LENG *et al.*, 1993; REISS *et al.*, 1997).

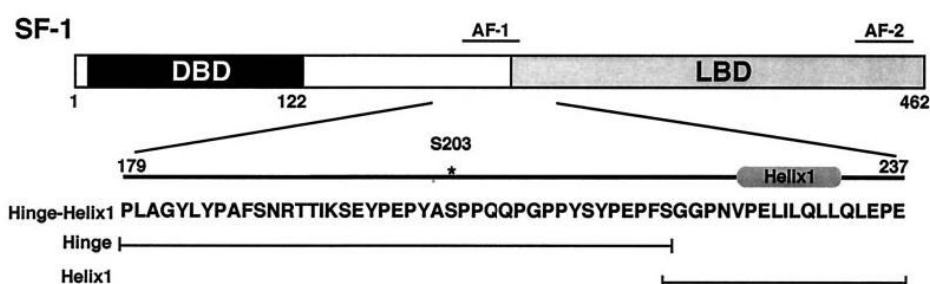
Além da fosforilação de S203, estudos com deleção de SF-1 têm mapeado um domínio da função de ativação próximo à dobradiça e à região N-terminal do LBD (resíduos 185 a 260), que se sobrepõe ao sítio de fosforilação via MAPK (CRAWFORD, 1998; HAMMER *et al.*, 1999). Esse domínio da ativação (denominado região de ativação proximal) junto ao clássico domínio de ativação da função 2 (AF2), localizado na região C-terminal de LBD, é requerido para amplificar a atividade coativadora de SF-1 (CRAWFORD, 1998; JACOB; LUND, 1998; LI *et al.*, 1999; ITO *et al.*, 2000). Em determinados contextos, a região da dobradiça de SF-1 também exibe um domínio independente do repressor (OU *et al.*, 2001), que se assemelha bastante a uma região encontrada no receptor de glicocorticóide, que é responsável pela mediação da repressão de sítios diméricos (INIGUEZ-LUHI; PEARCE, 2000). A grande proximidade entre um domínio da ativação e um sítio de MAPK em SF-1, pode também ser encontrada em outros receptores nucleares dependentes de ligantes em que os sítios AF1 e MAPK estão localizados na região N-terminal do domínio A/B. Para esses receptores nucleares, a fosforilação está envolvida no processo de modulação de ambas as atividades: dependente e independente de ligantes (WEIGEL, 1996; KUMAR E THOMPSON, 1999; SHAO AND LAZAR, 1999).

Outras mutações no gene *SF-1* estão sendo estudadas com o intuito de se compreender melhor o papel de cada domínio da proteína, bem como os mecanismos de sua atuação sobre os genes alvos.

No caso de SF-1 e vários outros receptores nucleares como DAX1 que são receptores órfãos, sem ligantes conhecidos. No entanto, recentemente, vários laboratórios demonstraram que SF-1 é capaz de se ligar a fosfatidilcolina (FC), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilglicerol (FG) e provavelmente a fosfatidilinositol fosfato (FIF) (KRYLOVA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005; ORTLUND *et al.* 2005). Análises de cristalografia revelaram inesperada densidade de elétrons dentro dos bolsos do LBD de SF-1. Posteriormente, estudos estruturais e de espectrometria de massa confirmaram, de forma convincente, que SF-1 se liga a FC e/ou a FE quando expresso em bactérias.

LI *et al.* (2005) mostraram que SF-1 se liga a FC e a FE com alta afinidade e que essa ligação promove o recrutamento de peptídeos co-fatores *in vitro*. Assim, se pode responder à questão sobre a funcionalidade desses ligantes. Eles não somente são funcionais, como também tornam a atividade de SF-1 dependente do tipo de fosfolípido que se liga a ele. Esse achado promove um novo mecanismo fisiológico em resposta às mudanças metabólicas.

FIGURA 7: SÍTIO DE FOSFORILAÇÃO DE MAPK EM SF-1



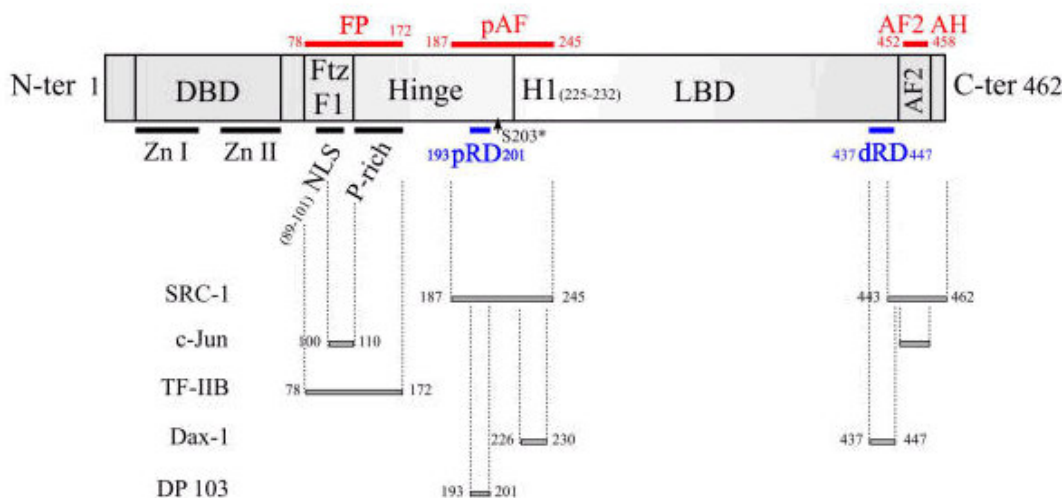
FONTE: DESCLOZEAUX *et al.*, 2002

NOTA: A Hélix 1 de SF-1 contém um domínio de ativação de função AF1. Acima está esquematizado um diagrama dos principais domínios da proteína SF-1 com a sequência de aminoácidos da hélix 1 apresentada abaixo da figura. Está em destaque também a posição do sítio de fosforilação de MAPK (S203)

A ação transcricional exercida por AF-2 requer a hélice H12 localizada na porção C-terminal do LBD, haja vista o fato de que mutações nessa sequência eliminam a atividade de AF-2 (DANIELIAN *et al.* 1992; BARETTINO *et al.* 1994; DURAND *et al.* 1994; TONE *et al.* 1994; COLLINGWOOD *et al.* 1997; HENTTU *et al.* 1997; JURUTKA *et al.* 1997; MASUYAMA *et al.* 1997; SAATCIOGLU *et al.* 1997; FENG *et al.* 1998). Ensaio ligando H12 ao domínio de ligação ao DNA Gal-4 relatam a ativação da transcrição, sugerindo que H12 sozinho corresponde a AF-2 (BARETTINO *et al.* 1994; DURAND *et al.* 1994; MASUYAMA *et al.* 1997; SAATCIOGLU *et al.* 1997). No entanto, mutações pontuais em H12 levaram a diferentes efeitos na ativação de Gal-4 (SAATCIOGLU *et al.* 1997). Posteriormente, outros estudos foram realizados e chegou-se à conclusão que AF-2 corresponde não somente à hélice H12, mas a toda superfície de coativação (BOURGUET *et al.* 1995; RENAUD *et al.* 1995; WAGNER *et al.* 1995; MORAS; GRONEMEYER 1998; HENTTU *et al.* 1997; FENG *et al.* 1998; NORRIS *et al.* 1998).

Receptores nucleares dependentes de ligantes ativam a transcrição de seus genes alvos por meio da interação com coativadores e/ou correpressores que interagem com os receptores e a maquinaria de transcrição. SF-1 apresenta o domínio de ativação AF-2 (figura 8) contendo uma região altamente conservada LLXXL, que é necessária, mas não suficiente para desencadear a transativação exercida por SF-1 (CRAWFORD *et al.*, 1997; ITO *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1998; LI *et al.*, 1999), a qual depende também de duas regiões da proteína, a região FP (região funcional contendo “Ftz-F1 box” e a região rica em prolina) (LI *et al.*, 1999) (figura 8) e o domínio de ativação proximal (CRAWFORD *et al.*, 1997; HAMMER *et al.*, 1999). Mutações em AF-2 de SF-1 apresentam características negativas dominantes com relação à ativação do promotor de CYP17 pela PKA em células Y1 (adrenocorticais de camundongo). Fato esse que pode sugerir uma implicação de AF-2 na transdução de sinais na via AMPc. (JACOB; LUND, 1998; VAL *et al.*, 2003).

FIGURA 8: DOMÍNIOS FUNCIONAIS DE SF-1



FONTE: VAL *et al.*, 2003

NOTA: Zn I e Zn II: anéis de zinco do DBD; Ftz-F1: “Ftz-F1 box”; NLS: sinal de localização nuclear; P: região rica em prolina; FP: região funcional contendo “Ftz-F1 box” e a região rica em prolina; pAF: função de ativação próxima; pRD: região de repressão proximal; H1: hélice 1 de LBD; dRD: domínio de repressão distal; AF-2 AH: ativação da função 2 e ativação de hemâmero; S203* serina na posição 203, implicada na fosforilação de SF-1 por MAPK. São mostrados também fatores de transcrição que interagem com SF-1 o que permite uma delimitação funcional dos domínios.

2.3 CÉLULAS H295R

Em 1980, foi diagnosticado carcinoma adrenocortical em uma mulher de 48 anos de idade. As células desse tumor foram cultivadas *in vitro* e, posteriormente deram origem à linhagem celular H295 (NCI-H295), cujo crescimento se dá em suspensão e o tempo de duplicação é de 5 dias (GAZDAR *et al.*, 1990).

STAELS *et al.* (1993) demonstraram que as células H295 expressam a maioria das enzimas necessárias à esteroidogênese adrenocortical, e que os genes que codificam essas enzimas respondem à estimulação pela mesma via de segundo mensageiro de maneira similar às células adrenais humanas. As células H295, portanto, se apresentam como bom modelo para se estudar a regulação esteroidogênica da adrenal humana.

As condições de cultivo da linhagem H295 foram se modificando, a fim de selecionar as células que crescessem aderidas à superfície e que apresentassem um menor ciclo celular. Estabeleceu-se então a linhagem celular H295R (ATCC CRL-2128), que apresenta algumas vantagens em relação à H295, como menor custo para cultivo, crescimento em monocamadas e tempo de duplicação de 2 dias.

Em análise por cromatografia gasosa foram identificados os esteróides produzidos pelas células H295R e verificou-se que, aparentemente, elas produzem todas as enzimas presentes no tumor original, incluindo CYP11A, HSD3B2, CYP11 β 1, CYP21, CYP17, CYP11 β 2, HSD3B, e baixos níveis de CYP19 (aromatase) (GAZDAR *et al.*, 1990). Portanto, conclui-se que as células H295R podem sintetizar hormônios das três zonas adrenocorticais.

2.4 FOSFATASE ALCALINA PLACENTÁRIA

2.4.1 Proteínas ancoradas por glicofosfatidilinositol

Muitas proteínas constitutivas celulares de eucariotos, desde fungos e protozoários até plantas e mamíferos, estão ancoradas à superfície externa da membrana plasmática por meio de um grupamento glicofosfatidilinositol (GPI) (McCONVILLE, FERGUSON, 1993; HOOPER, 1997; FERGUSON, 1999; ZHOU *et al.*, 2001). As proteínas ancoradas por GPI exercem ampla variedade de funções como adesão celular, antigenicidade, receptores de membrana e enzimas hidrolíticas (5'-nucleotidase, acetilcolinesterase, dipeptidase e fosfatase alcalina) (EISENHABER *et al.*, 2001).

O grupamento GPI parece conferir algumas importantes propriedades às proteínas por ele ancoradas. Dentre essas propriedades inclui-se a liberação da membrana por fosfolipases C e D bacterianas (tanto endógenas quanto exógenas), permitindo a existência da proteína na circulação sem GPI (GRIFFITH *et al.*, 1991; HUANG *et al.*, 1991; METZ *et al.*, 1994; MOVAHEDI, HOOPER, 1997). LISANT *et*

al. (1988) descreveram o papel deste grupamento no endereçamento de proteínas para as regiões apicais da superfície celular, permitindo às proteínas maior mobilidade na membrana plasmática (NODA *et al.*, 1997).

A presença de GPI também direciona a proteína para os *rafts* de lipídios (microdomínios ricos em colesterol e esfingolipídios) que se suspeita serem constituintes da membrana plasmática de células eucariotas (SIMONS, IKONEN, 1997; BROWN, LONDON, 2000). SCHROEDER *et al.* (1994) sugerem que ocorram interações entre as longas cadeias acilas de GPI com colesterol e esfingolipídio, justificando assim a presença das proteínas ancoradas por GPI nestes *rafts*.

As proteínas ancoradas à membrana por meio do grupamento GPI podem ser exclusivamente extracelulares, como PLAP, transmembranas ou ainda possuírem um domínio intracelular. Algumas GPI transmembranas apresentam funções relacionadas a receptores e, embora algumas percam sua porção transmembrana e intracitoplasmática, a interação com estruturas presentes no citoplasma se mantém (MAKIYA; STIGBRAND, 1992a).

2.4.2 Fosfatases alcalinas

As fosfatases alcalinas catalisam a hidrólise de fosfomonoésteres com liberação de fosfato inorgânico e álcool (SCHWARTZ; LIPMANN, 1961). As funções das fosfatases alcalinas ainda não foram bem elucidadas. No entanto, suspeita-se que exista uma relação entre a presença de fosfatases alcalinas e processos de transporte celular, haja vista a presença dessas enzimas em células de órgãos em que a função de transporte é importante, como placenta, rins e intestino (McCOMB *et al.*, 1979).

As quatro isoformas de fosfatase alcalina (monoéster ortofosfórico fosfohidrolase, E.C.3.1.3.1) já descritas diferem entre si na estrutura, função, localização (MILLÁN; FISHMAN, 1995) e quanto ao reconhecimento antigênico (KOSMAS *et al.*, 1988; HAMILTON-DUTOIT *et al.*, 1990).

Essas isoenzimas são nomeadas de acordo com o tecido em que são expressas normalmente. Em humanos, três dessas isoenzimas são chamadas tecido-específicas:

placentária (PLAP), intestinal e de linhagens celulares germinativas. Existe entre elas homologia de 90-98%, e seus genes encontram-se agrupados no cromossomo 2, bandas q34-q37. O quarto tipo de fosfatase alcalina não é específico de um tecido e pode ser expresso em tecido ósseo, hepático e renal. Essa isoenzima possui 50% de homologia com as outras três fosfatases e se localiza no cromossomo 1, bandas p36.1-p34 (MILLÁN *et al.*, 1982; MILLÁN, 1988; HARRIS, 1989; MILLÁN, 1992; NOURI, *et al.*, 2000). Em adultos sadios, aproximadamente 1% da atividade de fosfatase alcalina presente na circulação sanguínea é atribuída à PLAP (HIRANO *et al.*, 1987).

2.4.3 Fosfatase alcalina placentária

2.4.3.1 Características gerais

PLAP humana é uma proteína localizada na superfície externa da membrana celular (McCOMB *et al.*, 1979; TOKUMITSU *et al.*, 1981; JEMMERSON *et al.*, 1985), porém também pode ser encontrada no soro, fluidos e em certos tecidos de indivíduos normais ou pacientes com alguns tipos tumorais (SHINODA *et al.*, 1988; KANG *et al.*, 1989; KOYAMA *et al.*, 1989).

PLAP é expressa normalmente pelas células das microvilosidades do sinciciotrofoblasto a partir da décima segunda semana de gestação (MESSER, 1967; FISHMAN *et al.*, 1976). Essa enzima representa uma porção significativa da proteína total presente na membrana do trofoblasto em placentas a termo (DOELLGAST; BENIRSCHKE, 1979; JOHNSON *et al.*, 1981).

MAKIYA E STIGBRAND (1992a) assim como outros pesquisadores sugerem que PLAP está envolvida na transferência materno-fetal de imunoglobulina (Ig) G através da placenta (MAKIYA; STIGBRAND, 1992a; MAKIYA; STIGBRAND, 1992b; STEFANER *et al.*, 1997). Outra função dessa enzima

seria a participação no processo de divisão celular (CHAN; STINSON, 1986; TELFER; GREEN, 1993a; DABARE *et al.*, 2000; SHE *et al.*, 2000) em células normais e em células tumorais (GREEN, 1993b; CHAN; STINSON, 1986; DABARE *et al.*, 2000; SHE, *et al.*, 2000). Essa hipótese deve-se talvez à atividade fosfatase contra proteínas fosforiladas (TELFER; GREEN, 1993b; BUTIKOFER *et al.*, 1999).

As duas principais formas de PLAP são expressas pela placenta de acordo com o tempo de gestação. Aquela que se encontra na placenta durante as primeiras semanas de gestação é conhecida como PLAP-símile ou isoenzima Nagao (NAKAYAMA *et al.*, 1970). A partir da décima segunda semana de gestação começa a ser expressa um outro tipo de fosfatase alcalina denominada PLAP. Em tecidos normais PLAP e PLAP-símile são expressas, predominantemente, nos pulmões, cérvix, mamas (GOLDESTINE *et al.*, 1982b; McLAUGHLIN *et al.*, 1984b) e no timo e testículos (GOLDESTINE 1982a, MILLÁN *et al.*, 1982; McLAUGHLIN *et al.*, 1984b), respectivamente. Ambas enzimas são expressas em endométrios normais (NOZAWA *et al.*, 1984) e podem estar elevadas em pacientes com câncer.

PLAP-símile se diferencia de PLAP por migrar com menor velocidade em gel, apresentar maior inibição na presença de L-leucina (DOELLGAST; FISHMAN, 1976) e mostrar reatividade a certos anticorpos (McLAUGHLIN; JOHNSON, 1984a). É mais freqüentemente expressa em tumores de linhagens germinativas e em câncer de ovário, servindo como marcador tumoral em pacientes com estes tipos tumorais (STIGBRAND; FISHMAN, 1984a).

Em razão da grande homologia (98%) entre PLAP e a isoenzima derivada das células germinativas, é difícil distingui-las somente pelos métodos tradicionais de análise de proteínas. OTTO *et al.* (1995) separaram-nas utilizando métodos de purificação por cromatografia seguido de eletroforese bidimensional.

2.4.3.2 Características estruturais

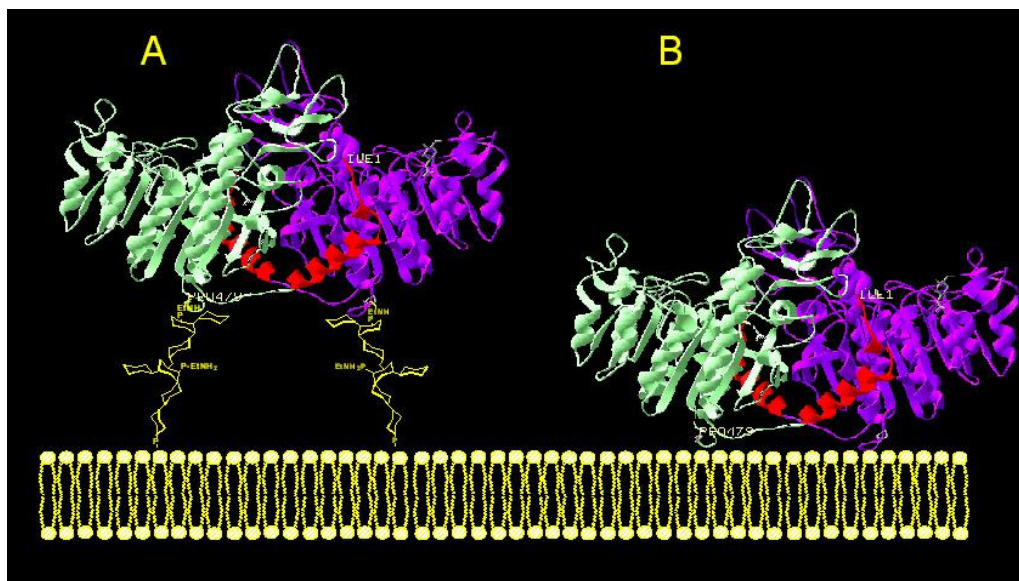
LEHTO E SHAROM (2002) demonstraram que PLAP se localiza muito próxima à região interfacial da bicamada lipídica. Nesse mesmo estudo verificou-se que sua conformação, possivelmente “*flop down*” (figura 9), possibilita modulação da enzima pela membrana celular.

PLAP é uma proteína modificada pós-transcricionalmente assim como outras fosfatases de mamíferos. Dentre essas alterações incluem-se dois sítios de *N*-glicosilação e um sítio para anexar-se à membrana com presença de GPI (LE DU *et al.*, 2001). É uma enzima alostérica e inibida não-competitivamente por alguns aminoácidos: L-fenilalanina, L-triptofano, L-leucina (HOYLAERTS *et al.*, 1982; HUMMER; MILLÁN, 1991; WATANABE *et al.*, 1991). Também é estável ao calor e hidrolisada por neuramidase. Todas essas características são úteis para distinguir PLAP das demais fosfatases alcalinas (FISHMAN, 1974; STINGBRAND; FISHMAN, 1984a; VENGEROV *et al.*, 1988). Todavia, foi relatada recentemente a existência, no linfoma de Hodgkin (DAMLE *et al.*, 1979) e em pacientes com câncer colorretal (HARMENBERG *et al.*, 1989), de uma variante de PLAP que é sensível ao calor.

Estudos cristalográficos em raio-X da estrutura de PLAP revelaram resolução de 1,8 Å (LE DU *et al.*, 2001). Confirmaram também algumas evidências de que PLAP se constitui em um homodímero (DURBIN *et al.*, 1988) (figura 9) e identifica vários resíduos que podem contribuir para sua propriedade alostérica (LE DU *et al.*, 2001).

Uma grande porção C-terminal, resíduos 480-513, e o grupamento GPI, que estariam ligados ao resíduo aspartato carboxi-terminal (C-terminal) (REDMAN *et al.*, 1984), não foram observados na estrutura de raio-X. Este resultado indica alto grau de flexibilidade da região C-terminal (LEHTO 2002).

FIGURA 9 - MODELO DOS DÍMEROS DE PLAP EM RELAÇÃO À BICAMADA LIPÍDICA



FONTE: LEHTO; SHAROM, 2002

NOTA: (A) Modelo da estrutura cristalográfica do dímero de PLAP, mostrando os dois ancoramentos GPI em conformação estendida (modelo *lollipop*), em que o centro da proteína se encontra afastado da superfície. (B) Modelo mais provável do posicionamento de PLAP em relação à bicamada lipídica em conformação *flop down* na qual os dímeros se posicionam bem próximos à membrana da célula, proporcionando contato direto com a bicamada lipídica. Nesse último modelo a atividade de PLAP pode ser modulada por essa bicamada.

A estrutura dimérica apresentada por LE DU *et al.* (2001) mostra que a porção N-terminal de um monômero, se localiza muito mais próxima da região C-terminal do outro monômero do que da região C-terminal dessa mesma sub-unidade. Estes dados são coerentes com a conformação de PLAP próxima à membrana com cada monômero muito próximo à bicamada lipídica (LEHTO; SHAROM, 2002) (figura 4)

O peso molecular de cada monômero da proteína PLAP encontra-se entre 58 KDa e 74 KDa (GOTTLIEB; SUSSMAN, 1968; STIGBRAND; FISHMAN, 1984b; EZRA *et al.*, 1983; ITO; CHOU, 1983; NOURI *et al.*, 2000; ERIKSSON *et al.*, 2001; LE DU *et al.*, 2001; LEHTO; SHAROM, 2002). ERIKSSON *et al.* (2001) por meio de eletroforese por capilar descrevem essa microheterogeneidade no peso molecular de

PLAP, podendo ser explicada pela existência de várias glicoformas e/ou oligômeros da enzima.

2.4.3.3 Gene *PLAP*

A isoenzima Regan, primeira PLAP encontrada em células tumorais apresentava as mesmas características imunológicas, eletroforéticas e enzimáticas que a fosfatase alcalina originalmente expressa na placenta após a 12^a semana de gestação (DE GROOTE *et al.*, 1983). Este fato sugere que PLAP tumoral é um produto do mesmo gene que codifica essa proteína placentária normal. Portanto, a expressão dessa isoenzima em tumores é, provavelmente, resultado da desrepressão do gene PLAP normal, e não a expressão de um gene específico do tumor (LOWE; STRAUSS, 1990).

Cada subunidade de PLAP madura se constitui em um peptídeo glicosilado de 513 aminoácidos (KAM *et al.*, 1985; HENTHORN *et al.*, 1986; MILLÁN, 1986). O precursor possui um peptídeo sinalizador com aproximadamente 22 resíduos que é clivado durante o processamento da enzima (ITO; CHOU, 1983). O gene que codifica este peptídeo sinalizador está no exon 1 e o que codifica o domínio de ancoramento GPI, no exon 11 (KNOLL *et al.*, 1988).

PLAP é codificada pelo gene *ALP-1*, membro de uma pequena família de genes localizados no braço longo do cromossomo 2 (MARTIN *et al.*, 1987). Nessa família estão incluídos os genes que codificam a fosfatase alcalina intestinal e PLAP-símile (ALP-2) (KNOLL *et al.*, 1987). O gene que codifica PLAP, que não é específica de um tecido, está no cromossomo 1 (SWALLOW *et al.*, 1986). A evolução dessa família gênica tem, provavelmente, envolvimento de uma duplicação de um gene primordial de uma fosfatase alcalina (fígado, rim e ossos) para a geração da fosfatase alcalina intestinal. Novas duplicações deram origem aos genes *ALP-1* e 2 (HARRIS, 1982).

Somente homens e símios superiores possuem fosfatase alcalina específica da placenta, os demais mamíferos expressam nas células da placenta o tipo de fosfatase

alcalina não específica (fígado, rim e ossos). Em contraste, todos os mamíferos possuem a fosfatase alcalina específica do intestino e o tipo não específico, ambas muito semelhantes às isoenzimas humanas (DOELLGAST; BENIRSCHKE, 1979; GOLDSTEIN; HARRIS, 1979; GOLDSTEIN *et al.*, 1980; GOLDSTEIN *et al.*, 1982a; HARRIS, 1982; DOELLGAST, 1984). PLAP apresenta polimorfismo, com três variantes comuns e, pelo menos, 15 alelos raros (ROBSON; HARRIS, 1965; ROBSON; HARRIS, 1967; HARRIS *et al.*, 1974; STINGBRAND *et al.*, 1983).

2.4.3.4 PLAP solúvel não tumoral

A liberação de PLAP da membrana pode ocorrer por meio da ação enzimática de fosfolipase C específica para fosfatidilinositol (SLEIN; LOGAN, 1965; IKEZAWA *et al.*, 1976; LOW; FINEAN, 1977; YUSUFI *et al.*, 1983). JEMMERSON E STIGBRAND (1984a) relatam a possibilidade de outro tipo de liberação de PLAP para o meio pela ação da tripsina. Essa enzima faz com que a proteína nativa seja clivada por meio de um único sítio ativo, reduzindo seu peso molecular em 10 KDa. No entanto essa clivagem não afeta a atividade catalítica da fosfatase. A enzima bromelina também é capaz de liberar PLAP da membrana celular, porém ao retirar um fragmento de 2 KDa da região C-terminal faz com que a fosfatase perca sua atividade catalítica (JEMMERSON; STIGBRAND, 1984b).

NEUWALD E BROOKS (1981) a fim de estudar PLAP em células de coriocarcinoma submeteram-nas ao tratamento com tripsina. Percebeu-se que a proteína se tornara menos hidrofóbica e com maior velocidade de migração eletroforética. O peso molecular de PLAP em células não tratadas foi de, aproximadamente 70 KDa ao passo que, após o tratamento com tripsina o peso passou a ser 68 KDa. Portanto, a perda de hidrofobicidade e redução de cerca de 2 KDa no peso molecular da proteína permitiu uma similaridade com a PLAP sérica. Esta observação sugere que a forma solúvel de PLAP, encontrada no soro de pacientes, resulta de uma liberação da membrana celular em razão da ação proteolítica e não por processo secretório.

Relatou-se a existência de um tipo de PLAP que migrava mais lentamente em eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) (GHOSH; FISHMAN, 1968; BERATIS *et al.*, 1971; DOELLGAST *et al.*, 1977) e associou-se este achado à presença de dímeros solúveis de PLAP (NEUWALD; BROOKS, 1981). Segundo BERATIS *et al.* (1971) essa forma mais lenta pode ser convertida em outra mais rápida por autólise da amostra de placenta, por meio de aquecimento a 37° C por longo período de tempo.

LEHTO E SHAROM (2002) purificaram PLAP a partir de amostras de membrana plasmática de microssomas placentários, utilizando um método de extração em que se preservava a porção GPI da proteína. Os resultados nas análises de SDS-PAGE mostram a presença de uma banda de aproximadamente 74 KDa.

Uma pequena quantidade de PLAP alcança o sangue materno, seja devido à liberação direta pelas células, seja pelas microvilosidades sinciciotrofoblásticas que entram em contato com as veias uterinas (JOHNSON *et al.*, 1981). Os níveis sanguíneos de PLAP em mulheres grávidas se elevam progressivamente após o primeiro trimestre de gravidez até o parto (FISHMAN *et al.*, 1968a; SUSSMAN *et al.*, 1968; JACOB; BAGSHAW, 1972).

MCLAUGHLIN *et al.* (1983) estudaram 208 mulheres grávidas e verificaram ampla variação nos níveis plasmáticos de PLAP em todas as idades gestacionais, embora houvesse aumento na média dos valores à medida que se aproximava do parto.

Os níveis séricos de PLAP-símile se encontram elevados em fumantes (MASLOW *et al.*, 1983; TONIK *et al.*, 1983; MCLAUGHLIN *et al.*, 1984c). No entanto, em mulheres que não estão grávidas e indivíduos não-fumantes, a atividade de PLAP é muito baixa, representando menos que 1% da atividade total de fosfatase alcalina (TONIK *et al.*, 1983; MUESCH *et al.*, 1986).

WILLIAMS *et al.* (1986) demonstraram que a principal fonte de PLAP-símile no soro de pacientes fumantes de cigarro são as células pulmonares. A liberação da enzima deve-se aos danos causados nos pneumócitos, seja pelas substâncias químicas presentes nos cigarros ou, indiretamente, por meio da ação sistêmica dos metabólicos da nicotina. O ato de fumar parece estimular a liberação da enzima mais que sua

síntese e a quantidade de PLAP-símile detectável no tecido pulmonar é similar em fumantes e não-fumantes.

A liberação de PLAP é seletiva, haja vista a detecção apenas de PLAP-símile no soro de fumantes (MCLAUGHLIN *et al.*, 1984c). No entanto, o tecido pulmonar contém também quantidades substanciais de PLAP. Este fato pode sugerir diferença na distribuição celular de PLAP e PLAP-símile dentro do pulmão ou uma possível modificação estrutural de PLAP pulmonar ao ser liberada para a circulação sanguínea como PLAP-símile (WILLIAMS *et al.*, 1986).

2.4.3.5 PLAP como marcador tumoral

O processo de transformação neoplásica celular pode levar à expressão de proteína(s) específica(s) daquele tumor, ou à elevação no nível de expressão de determinada proteína quando comparado ao tecido normal. As células transformadas podem expressar antígenos normalmente presentes durante as fases embriogênica e fetal (NORGAARD-PEDERSEN *et al.*, 1984). Como exemplo tem-se a α -fetoproteína presente no saco amniótico (GITLIN *et al.*, 1967) e detectável em tumores que se originam deste tecido (TSUCHIDA *et al.*, 1975) e em hepatoma e teratocarcinoma humanos ou experimentais (ABELEV *et al.*, 1971). Outro exemplo de antígeno oncoembriogênico é a gonadotrofina coriônica humana que é produzida em células de coriocarcinoma, mas também em neoplasmas sem origem trofoblásticas, como câncer pulmonar e seminomas. (BRAUNSTEIN *et al.*, 1973).

Algumas fosfatases alcalinas são expressas, abundantemente, em células de certos tumores. PLAP é freqüentemente expressa em células tumorais de origem trofoblástica ou não (FISHMAN, 1987).

FISHMAN *et al.* (1968b) foram os primeiros a estabelecerem a relação entre PLAP e a presença de tumores. Neste estudo, os níveis elevados de PLAP (isoenzima Regan) foram associados ao carcinoma broncogênico. Desde então, vários estudos têm confirmado a produção ectópica dessa isoenzima por vários tumores, como carcinoma broncogênico (DEBORE; POLLET, 1988), câncer colorctal (POLLET *et al.*, 1985), tumores do trato gastrointestinal (NATANSON; FISHMAN, 1971; JACOB; BAGSHAW, 1972; LOOSE *et al.*, 1984), de ovários e de testículos (MCDICKEN *et al.*, 1965; NATANSON; FISHMAN, 1971; EERDEKENS *et al.*, 1985; POLLET *et al.*, 1985; BRIERS *et al.*, 1986; BROE *et al.*, 1986), de células hematopoéticas (DAMLE *et al.*, 1979), de pâncreas (NATHANSON; FISHMAN *et al.*, 1971), da glândula adrenal (NATHANSON; FISHMAN *et al.*, 1971) e de tumor adrenocortical infantil (RODRIGUES, 2004).

Alguns resultados encontrados indicam que PLAP pode ser empregada como marcador de diferenciação, pois em algumas linhagens celulares de seminomas, quanto maior o grau de diferenciação, maior o nível de expressão de PLAP (TELFER; GREEN, 1993a; NOURI *et al.*, 2000). Este fato explicaria as diferenças na resposta clínica ao tratamento de alguns tipos de tumores de testículos (OLIVER, 1998; NOURI *et al.*, 2000).

Sensibilidade de 51% de PLAP para seminoma foi demonstrada por KOSHIDA *et al.* (1996). Neste estudo, não houve diferença significativa entre a taxa de detecção positiva ou nível do marcador entre o grupo de fumantes e o de não-fumantes. A taxa de falsos-positivos encontrada para PLAP foi de 1,8%, valor comparável àqueles encontrados quando se utilizam os marcadores tumorais não influenciados pelo hábito de fumar.

Embora PLAP esteja presente em vários tecidos tumorais, em alguns pacientes com câncer de ovário ela não foi detectada no soro, especialmente nos estágios iniciais da doença (MANO *et al.*, 1986). Entretanto, nesse mesmo estudo foi demonstrada a elevação nos níveis séricos de PLAP de uma paciente com antecedência de dois anos ao diagnóstico.

LOWE E STRAUSS (1990) relataram a existência de isoenzima Nagao em pacientes com coriocarcinoma. No entanto, diferente do que se encontra freqüentemente em pacientes com seminoma, essa enzima não foi detectada no soro. As possíveis explicações para este achado são: (1) a não expressão nas células de coriocarcinoma de uma fosfolipase para clivar especificamente o grupamento GPI dessa isoenzima; (2) menor disponibilidade da isoenzima para a ação da fosfolipase; (3) a fração PLAP solúvel seria produto de outro gene ou o resultado do *splicing* alternativo do ácido ribonucleico (RNA) (FERGUNSON; WILLIAMS, 1988).

STINGHEN *et al.* (2006) desenvolveram dois imunoenaios para detecção da atividade catalítica (ICA) da hPLAP/PLAP-símile com anticorpos anti-hPLAP produzidos em ovelha. Nesse estudo, foi verificado que as atividades de PLAP/PLAP-símile nas amostras de soro da paciente com carcinoma embrionário de ovário diminuiu com a redução do tamanho da massa tumoral no primeiro ciclo de antineoplásicos. Os resultados obtidos por STINGHEN *et al.* (2006) permitem concluir que há alguns tipos de tumores que podem ser precocemente detectados usando soro ou amostras de tecido.

2.4.3.6 Imunoenaios para determinação da PLAP/PLAP-símile

Anticorpos policlonais e monoclonais anti-hPLAP/PLAP-símile podem ser produzidos pela imunização de animais com hPLAP purificada, extraída de placenta humana. Anticorpos policlonais obtidos através da imunização de animais têm afinidade com diferentes epítomos da PLAP/PLAP-símile, e podem ocasionalmente reagir com IAP. A reação cruzada com IAP pode ser evitada por meio da purificação (1) por cromatografia de afinidade com coluna de Sepharose® ligada a IAP (que retém anticorpos inespecíficos) ou Sepharose® ligada a peptídeo sintético correspondente a um epítopo específico da hPLAP, conferindo comportamento de anticorpo monoclonal (MOURA *et al.*, 2004), ou (2) pela inativação das isoformas IAP (e TNAP) pelo calor,

antes de se determinar a atividade catalítica da PLAP/PLAP-símile (MALKIN *et al.*, 1978; MILLÁN; STIGBRAND, 1981).

PLAP e PLAP-símile são enzimas termoestáveis, cuja atividade catalítica pode ser mensurada em soro ou tecido pelo método bioquímico, após inativação das isoformas IAP e TNAP pelo aquecimento das amostras a 65°C por 10 minutos (MALKIN *et al.*, 1978).

Os imunoenaios com anticorpos policlonais e monoclonais são mais sensíveis e específicos que a quantificação de ALPs após inativação pelo calor. PLAP/PLAP-símile podem ser detectadas e quantificadas pelo método de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) (ENGVALL; PERLMAN, 1971; ENGVALL, 1980), radioimunoensaio (RIE) competitivo (MANO *et al.*, 1986), ensaio imunorradiométrico (IRMA) (VERGOTE *et al.*, 1992) e imunoenaios que medem a atividade catalítica (ICA) (NOZAWA *et al.*, 1989).

Nos imunoenaios ELISA e IRMA, a concentração antigênica da PLAP/PLAP-símile é realizada pelo princípio sanduíche. Um anticorpo primário anti-hPLAP fixado em fase sólida (microplacas ou tubos de poliestireno), reage com a enzima. Após lavagem para retirar o excesso de amostra não ligada, um segundo anticorpo marcado (conjugado) com enzima (ELISA) ou com substância radioativa (IRMA) é adicionado, formando um imunocomplexo anticorpo primário-hPLAP/PLAP-símile conjugado.

A leitura é realizada após a lavagem para retirar o excesso de conjugado e a amostra é analisada em contador gama (IRMA) ou, para o ELISA, um substrato para a enzima do conjugado é adicionado juntamente com um cromógeno, formando um produto final colorido que é mensurado em leitora de microplacas com filtro específico. No RIE competitivo, a amostra é adicionada simultaneamente com o conjugado (hPLAP marcada com substância radioativa) e ambas competem pelo anticorpo primário ligado à fase sólida. Após lavagem para retirar excesso de amostra e conjugado não ligado, é realizada leitura em contador gama.

Nos imunoenaios ICA, anticorpos anti-hPLAP fixados em fase sólida (microplaca de poliestireno) reagem com PLAP/PLAP-símile presente na amostra, e

após lavagem para retirada do excesso de amostra não ligada, o substrato *p*-nitrofenilfosfato (em pH alcalino) é adicionado e a cor do produto final da atividade catalítica (*p*-nitrofenol) é mensurada em leitora de microplacas. Esse método tem sensibilidade de 0,1 U/l (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; NOZAWA *et al.*, 1989), boa reprodutibilidade, com coeficientes de variação intra e inter-ensaio inferiores a 10% (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983; HAIJE *et al.*, 1987; DE BROE; POLLET, 1988; FISKEN *et al.*, 1989) e faixa de linearidade de 0 a 20 U/l (McLAUGHLIN; GEE; JOHNSON, 1983).

2.5 RNA interferente

Os níveis de expressão alterados de certos genes exercem um papel fundamental em muitas condições patológicas. Por exemplo, em vários cânceres a expressão aumentada de certos fatores de crescimento ou receptores desses fatores, ou a expressão diminuída de reguladores intracelulares de vias de tradução de sinais, representam elementos importantes no processo de transformação maligna e na progressão de células normais a células tumorais. Por consequência, ocorre proliferação descontrolada e redução na apoptose. Esses processos podem resultar em estimulação local ou à distância e novas estratégias terapêuticas devem ter como objetivo reverter esses efeitos, ou seja, inibir ou estimular certas proteínas (AIGNER, 2006).

A primeira metodologia utilizada para inibir a expressão gênica foi baseada nos oligonucleotídeos *antisense* no final da década de 70 (STEPHENSON; ZAMECNIK, 1978; ZAMECNIK; STEPHENSON, 1978). Após sua introdução na célula, esses oligonucleotídeos são capazes de se hibridizar com o RNA alvo levando a sua degradação (pela ação da RNase H), à inibição da tradução do RNAm alvo devido a impedimento estérico ou conformacional e/ou inibição de *splicing* correto.

No início da década de 80, a descoberta das ribozimas, que ativam cataliticamente a degradação de RNAm alvo de forma específica, veio ampliar as estratégias de silenciamento gênico (CECH *et al.*, 1981; KRUGER *et al.*, 1982; GUERRIER-TAKADA *et al.*, 1983). Posteriormente, esses dois métodos foram exaustivamente estudados e foi desenvolvida, então, uma ferramenta mais eficaz de repressão gênica, bem como sua “entrega” *in vitro* e *in vivo*, denominado *antisense-ODN/ribozima*.

Mais recentemente, outra estratégia natural de silenciamento gênico foi descoberta, o RNA interferente (RNAi). O termo RNAi surgiu após a descoberta que a injeção de RNA de dupla fita (*double-stranded* - dsRNA) em nematodo *Caenorhabditis elegans* promovia o silenciamento específico de genes cujas seqüências eram homólogas àquela do dsRNA (FIRE *et al.*, 1998). Posteriormente à descoberta do RNAi em *C. elegans*, também verificou-se sua presença em insetos (KENNERDELL; CARTHEW, 1998), sapos (OELGESCHLAGER *et al.*, 2000) e em outros animais como camundongos (SVOBODA *et al.*, 2000; WIANNY; ZERNICKA-GOETZ, 2000).

A função natural do RNAi é de supressão, como forma de proteção do genoma contra a invasão de elementos genéticos móveis, tais como transposons e vírus, os quais produzem RNA ou dsRNA aberrantes na célula hospedeira e se tornam ativos (JENSEN *et al.*, 1999; KETTING *et al.*, 1999; RATCLIFF *et al.*, 1999; TABARA *et al.*, 1999; MALINSKY *et al.*, 2000).

2.5.1 Mecanismo de ação

O mecanismo de silenciamento genético foi observado, inicialmente em plantas (petúnias) em 1990 por NAPOLI *et al.* e, mais tarde confirmado por FIRE *et al.* (1998). Novas descobertas levaram ao modelo proposto por ELBASHIR *et al.* (2000) para o mecanismo de ação de RNAi inicia-se com o processamento de dsRNA em fragmentos, predominantemente, de 21-23 nucleotídeos (nt), denominados RNAs

interferentes pequenos (*short interfering RNAs* – *siRNAs*). Extremidades 3' *overhangings* de 2-3 nt, quando presentes em dsRNA, facilitam esse processamento.

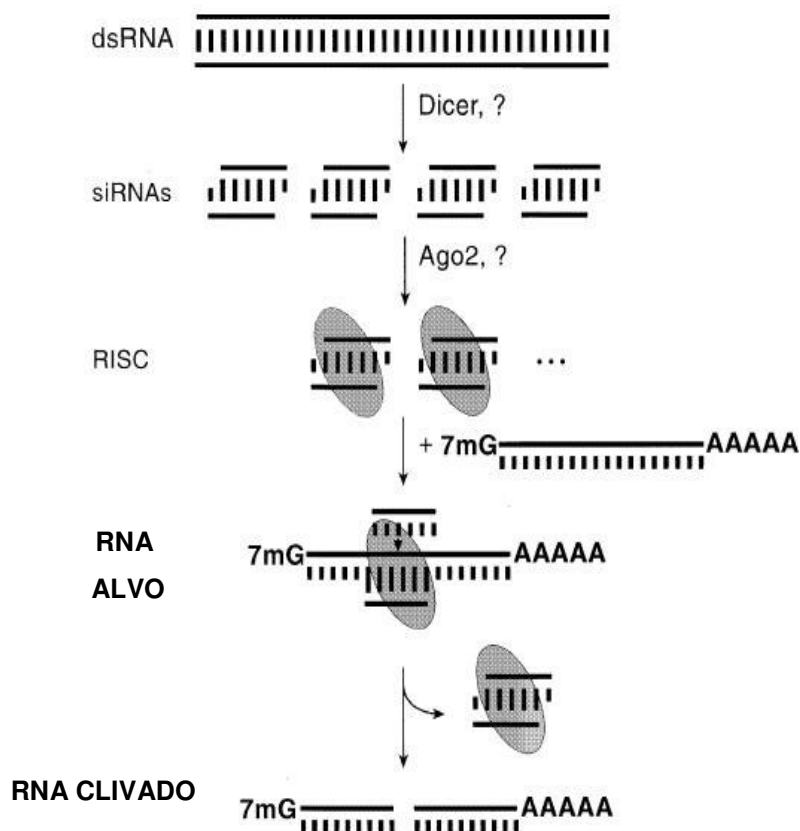
Os siRNAs podem ser eficientes no estudo em mamíferos, em que longas seqüências de dsRNA podem ocasionar silenciamentos inespecíficos (SLEDZ; WILLIAMS, 2204), como a resposta de proteína quinase dependente de dsRNA (CLEMENS, 1997).

Na figura 10 estão representadas as principais etapas do processo do mecanismo de ação de siRNA. A clivagem de dsRNA em siRNA é feita pelo DICER, um enzima multidimérica da família das RNases III. siRNA, DICER e outras proteínas se mantêm ligados e um outro complexo é formado, o complexo protéico denominado complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que auxiliará na orientação, ligação e degradação direta ou repressão transcricional do RNAm alvo (TANG, 2005).

Alterações químicas inseridas nos siRNA sintéticos podem favorecer a atuação de uma ou outra fita do siRNA (PARRISH *et al.*, 2000).

A descoberta do uso de siRNA sintético de 21-23 nt na degradação de RNAm específico, surge como uma nova ferramenta em estudos genômicos e bioquímicos sobre a expressão e a função de genes de interesse.

FIGURA 10: MECANISMO DE AÇÃO DOS siRNAs



FONTE: ELBASHIR *et al.*, 2002.

NOTA: Modelo proposto para RNAi. dsRNA é processado em siRNA de 21-23nt de fita-dupla pela enzima DICER (RNase III) e provavelmente outros fatores. RISC se incorpora ao siRNA, o que promoverá a degradação do gene alvo. Ago2 entra na formação do RISC.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Buscando obter maiores informações sobre o papel de SF-1 em TACs, tanto na tumorigênese quanto no seu desenvolvimento, o presente trabalho tem como objetivos principais (1) verificar se existe relação entre o marcador embrionário PLAP/PLAP-símile e a proteína SF-1, cuja expressão se encontra elevada em TACs com a mutação R337H do *TP53*, e (2) demonstrar a importância de SF-1 na proliferação de células de tumor adrenocortical.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar o nível de atividade de PLAP/PLAP-símile em TAC por método imunoenzimático
2. Verificar se existe correlação entre o nível de atividade de PLAP e a elevada expressão de SF-1 encontrada em TACs;
3. Utilizando linhagem celular comercial de carcinoma adrenocortical (H295R), investigar o papel de SF-1 na proliferação desse tumor, procedendo ao silenciamento do gene via siRNA;
4. Confirmar a redução da expressão de SF-1 em células transfectadas com siRNA por meio de *western blotting*;
5. Investigar se a redução da proteína SF-1 altera os processos de apoptose e proliferação celular, utilizando kits de detecção fluorescente de morte celular *in situ* (TUNEL) e de proliferação *in situ* (BrDU), respectivamente;
6. Construir clones estáveis mutantes H295R/TR/SF-1 (S203A, A433W e L451/2A) a partir de um clone parental H295R/TR.
7. Verificar se as proteínas SF-1 mutantes exercem o mesmo papel sobre a proliferação celular quando comparada à proteína normal, por meio da desrepressão do promotor por doxíciclina.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA E AMOSTRAS

O presente estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná (Anexo 1) e da Liga Paranaense de Combate ao Câncer – Hospital Erasto Gaertner (Anexo 2). As amostras foram utilizadas mediante aprovação e assinatura de Termos de Consentimento Livre e Esclarecido dos pais ou responsáveis (Anexos 3 a 5).

As amostras se constituíram em 16 de TACs (material de descarte de cirurgias) de pacientes com idade inferior ou igual a 15 anos na data do diagnóstico histológico de tumor (adenoma ou carcinoma). Como controles negativo e positivo foram utilizadas uma amostra de córtex adrenal normal e uma de placenta humana a termo, respectivamente.

Para os estudos *in vitro* (silenciamento genético e construção dos clones mutantes SF-1) foi utilizada a linhagem celular de carcinoma adrenocortical humano (NCI-H295R).

Todos os experimentos, com exceção dos relacionados à determinação da atividade enzimática de PLAP nos TACs, foram realizados no *Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire* (Université de Nice Sophia Antipolis, Valbonne, França).

4.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PLAP POR MEIO DE IMUNOENSAIO (ICA)

4.2.1 Preparo das amostras

O protocolo utilizado para preparo das amostras foi adaptado a partir de WILLIAMS *et al.* (1986) e, durante todos os procedimentos as amostras foram mantidas em gelo. As 16 amostras de tecidos de TAC, bem como o controle positivo

(placenta humana) e o negativo (adrenal humana normal) foram homogeneizadas em 1,5 mL de solução gelada de tampão fosfato (PBS) e 0,05% de Tween 20. Em seguida foram centrifugadas a $3000 \times g$ durante 30 minutos e os sobrenadantes estocados a -20°C . Cada amostra foi dividida em 2 tubos que, posteriormente, foram submetidas ou não a aquecimento para inativação das demais fosfatases alcalinas.

4.2.2 Determinação da concentração de proteínas totais

A determinação da concentração de proteínas totais foi feita utilizando um kit específico, devido ao fato dos extratos protéicos conterem detergente (Tween 20), o que interfere nessa determinação quando se utilizam os métodos tradicionais. O protocolo utilizado foi o indicado pelo fabricante do kit.

4.2.3 Determinação da atividade de PLAP por ICA

Cada amostra, como dito anteriormente, foi dividida em 2 tubos. Um deles foi submetido à inativação das demais fosfatases alcalinas, ou seja, aquecimento a 65°C por 10 minutos. Em seguida, essas amostras foram centrifugadas ($3.000 \times g$ por 30 minutos) e os sobrenadantes transferidos para outro tubo. Por meio de um imunoenensaio para determinação da atividade catalítica (ICA), a atividade enzimática de PLAP nas amostras de TACs foi determinada conforme a metodologia descrita por STINGHEN *et al.* (2006). Resumidamente, as amostras, os padrões e os controles foram analisados em duplicata conforme padronização dos ensaios. Para o ensaio ICA-PLAP, a microplaca foi sensibilizada com anticorpos anti-PLAP na diluição 1:1000 (0,16 $\mu\text{g/poço}$), as amostras e o padrão de PLAP foram incubados por uma hora, a 37°C . Após a lavagem, foi adicionado o substrato e a microplaca foi incubada por 5 horas a 37°C . A reação foi bloqueada com NaOH e a microplaca foi lida em leitora automática em filtro 405 nm.

Para o ensaio ICA-PEP, a microplaca foi sensibilizada com anticorpos antipeptídeo na diluição 1:50 (1,84 $\mu\text{g/poço}$) e as amostras e o padrão de PLAP foram

incubados por uma hora a 37°C. Após a lavagem, foi adicionado o substrato e a microplaca foi incubada por 18 horas a 37°C. A reação foi bloqueada com NaOH e a microplaca foi lida em leitora automática em filtro 405 nm.

4.3 CULTIVO DAS CÉLULAS H295R

As células H295R foram utilizadas nos experimentos com siRNA e para produção dos clones estáveis (mutantes SF-1). A linhagem foi mantida em cultura em meio DMEM/F-12 suplementado com 2% Nu-Serum, 1% ITS Plus e antibióticos (penicilina/estreptomicina 1%).

4.4 CLONES MUTANTES SF-1

4.4.1 Produção do clone parental e clone que expressa a proteína normal

Para produção dos clones de células H295R que expressassem SF-1 de forma induzida, foi utilizado o sistema *Tetracycline-Regulated Expression System for Mammalian Cells* (T-REx™). Resumidamente, as células foram transfectadas com plasmídeo de expressão (pcDNA 6/TR™) (figura 11), que codifica um repressor Tet, ou seja, na presença de tetraciclina ou um análogo, como a doxíciclina (dox), o repressor é deslocado do promotor e a expressão do gene é iniciada. Os clones transfectados com esse plasmídeo foram selecionados por meio do tratamento com blasticidina, haja vista o fato de o plasmídeo conferir resistência a esse antibiótico. A partir desse clone parental (H295R/TR), foram produzidos os clones SF-1 (normal e mutantes).

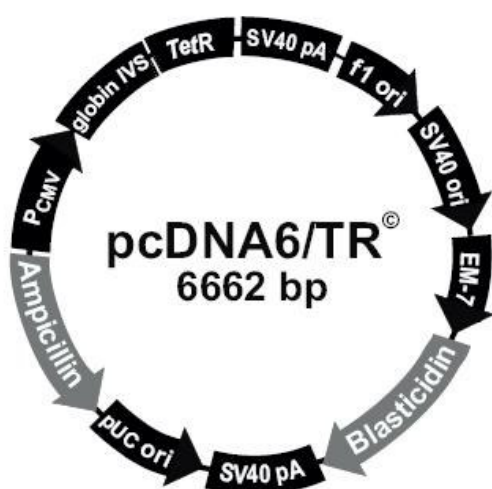
Esse clone foi transfectado com o plasmídeo pcDNA4/TO, em que o cDNA de SF-1 havia sido inserido em sítios de restrição *HindIII-BamHI* do plasmídeo pcDNA4/TO™ (figura 11). A seleção dos clones H295R/TR/SF-1 foi feita com zeocina, isolando-se os que apresentavam uma elevada expressão de SF-1 na presença

de dox. Após transfecção com um plasmídio repórter pcDNA4/TO/lacZ, um clone (H295R/TR/SF-1) foi selecionado baseado na taxa mais elevada entre a atividade de beta-galactosidase e a presença de doxicilina. Esse clone foi usado como referência, pois expressa a proteína SF-1 normal.

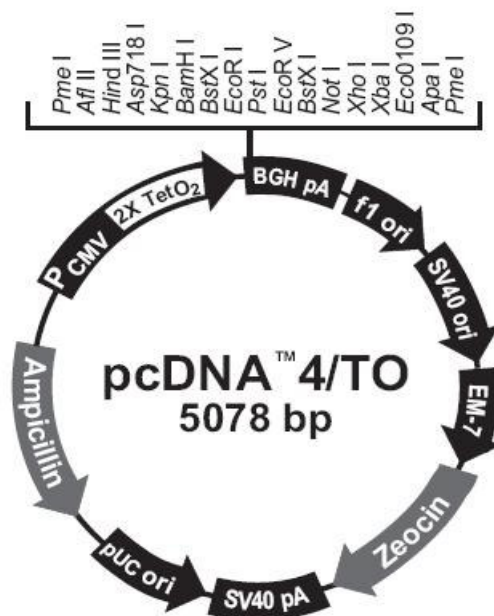
Os plasmídios foram produzidos em bactérias *Escherichia coli* (água LB + ampicilina) e a transformação foi realizada por meio de eletroporação (U1800 V – 5ms). A purificação foi feita por kit Midi e Mini-Prep e, após sequenciamento e confirmação da inserção do gene *SF-1*, a transfecção em células H295R/TR foi feita por meio de reagente JetPITM-Endo (Eurogentec).

FIGURA 11: CARACTERÍSTICAS DOS VETORES PLASMIDIAIS pcDNA 6/TRTM E pcDNA4/TOTM

A



B



FONTE: Manual de Instruções Invitrogen “T-RExTM System

NOTA: Em A pode-se verificar as características de pcDNA 6/TR[®] : Promotor CMV, gene *TetR*, gene de resistência à blastidina e à ampicilina, entre outras. Em B, o vetor pcDNA4/TO[®] é apresentado, contendo o promotor CMV (com a região onde se encontram os operadores TetO₂ para ligação dos repressores Tet), sítio múltiplo de clonagem; gene de resistência à zeocina e à ampicilina, entre outros.

4.4.2 Produção dos clones mutantes SF-1

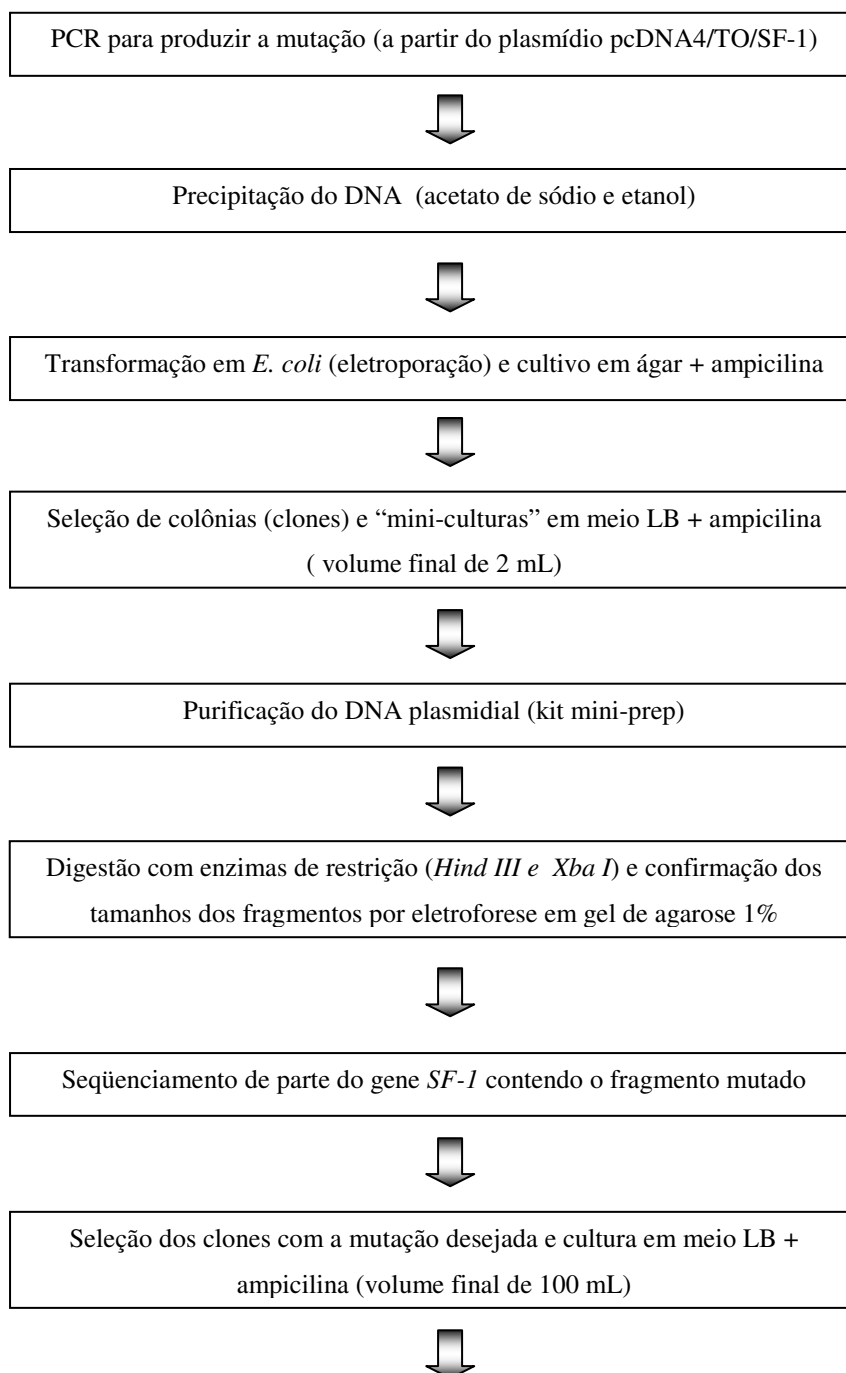
A partir do clone parental H295R/TR foram produzidos três clones mutantes SF-1 de maneira estável. Para gerar as mutações no gene *SF-1* foi utilizado o kit *QuickChange™ Sited directed mutagenesis* (Stratagene). O protocolo utilizado foi o sugerido pelo fabricante e as seqüências dos *primers* e demais informações sobre cada mutação gerada se encontram na tabela 3.

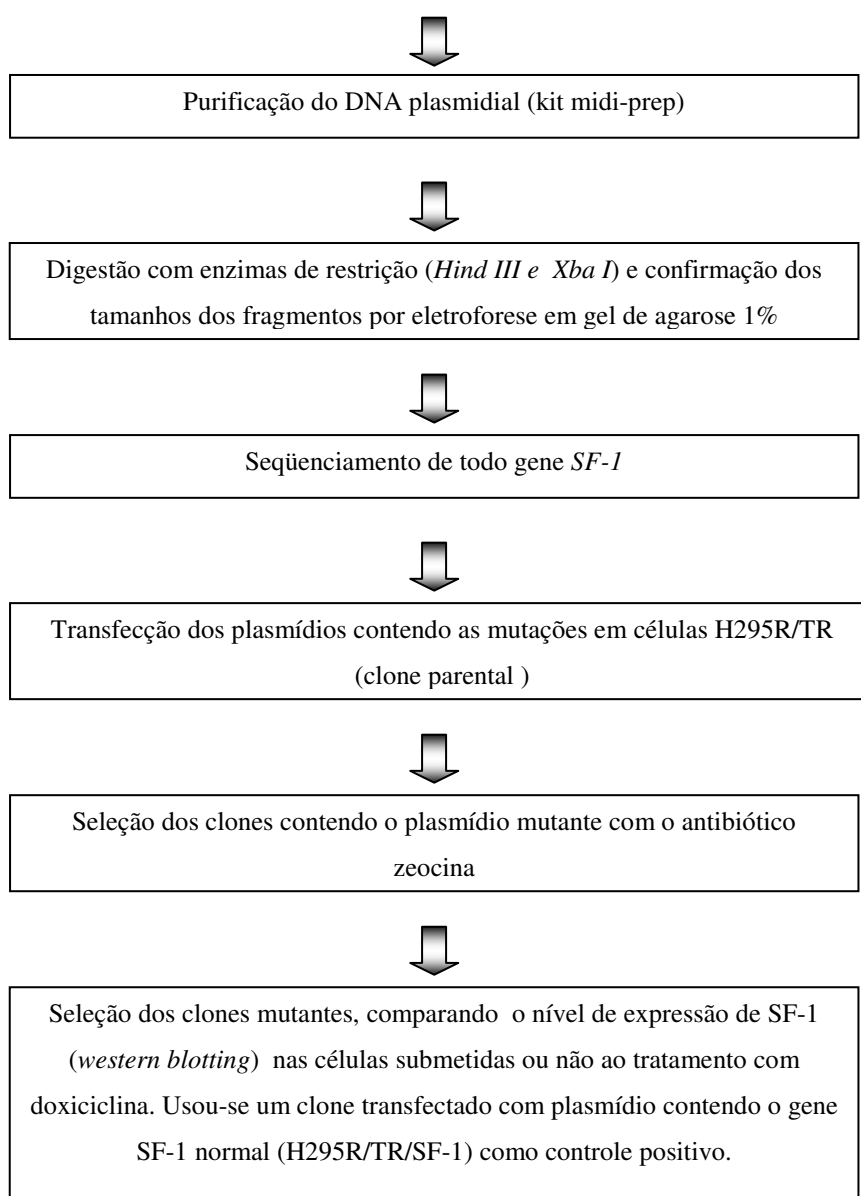
TABELA 3: MUTAÇÕES REALIZADAS NO GENE *SF-1* PARA PRODUÇÃO DOS CLONES ESTÁVEIS

MUTAÇÃO	S203A	A433W	L451/2A
SEQÜÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS ALTERADA	AGC →GCC	GCC→TGG	CTG CTC → GCG GCC
LOCALIZAÇÃO NA PROTEÍNA	Dobradiça (Sítio de fosforilação de MAPK)	LBD (Domínio de ligação ao ligante)	AF-2 (Domínio de transativação)
SEQÜÊNCIA DOS PRIMERS USADOS PARA A MUTAGENÊSE (5' a 3')	CGGAGCCTTATGCCG CCCCCCCACAGCCTG	GCCCTGAGCATGCAG TGGAAGGAGTACCTG TAC	TTGCAGCATTTCGATGGCC GCGTTGTTGCGGGGCAT
SEQÜÊNCIA DOS PRIMERS USADOS PARA O SEQÜENCIAMENTO (5' a 3')	AAGAAGGCACAGATT CGGGC	TAGAAGGCACAGTCG AGG	TAGAAGGCACAGTCGAGG

O esquema abaixo (figura 12) apresenta, resumidamente, as etapas seguidas na produção dos clones mutantes H295R/TR/SF-1. Após a seleção dos dois clones mutantes para cada mutação, foi realizado um estudo de proliferação comparando as células tratadas ou não com dox.

FIGURA 12: ETAPAS PARA PRODUÇÃO DOS CLONES SF-1 MUTANTES ESTÁVEIS



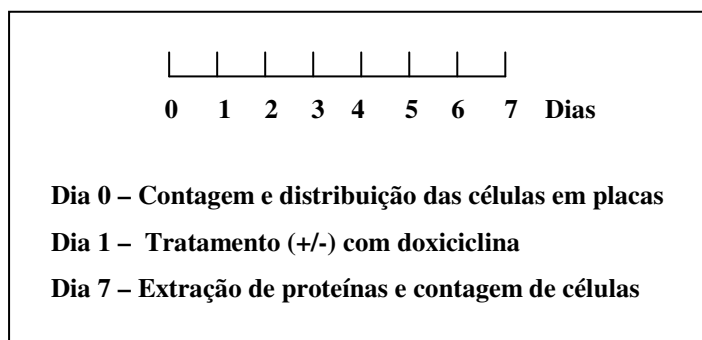


4.4.3 Estudo de proliferação dos clones mutantes

Após seleção de dois clones para cada mutação, foi realizado um estudo de proliferação comparando os mutantes e um clone transfectado com o gene *SF-1* normal, na presença ou ausência de tratamento com doxiciclina (1µg/mL).

A contagem de células, em câmera de Neubauer, foi feita 6 dias após o tratamento com dox, utilizando sempre triplicatas (figura 13).

FIGURA 13: PROTOCOLO DE INVESTIGAÇÃO DOS CLONES MUTANTES SF-1



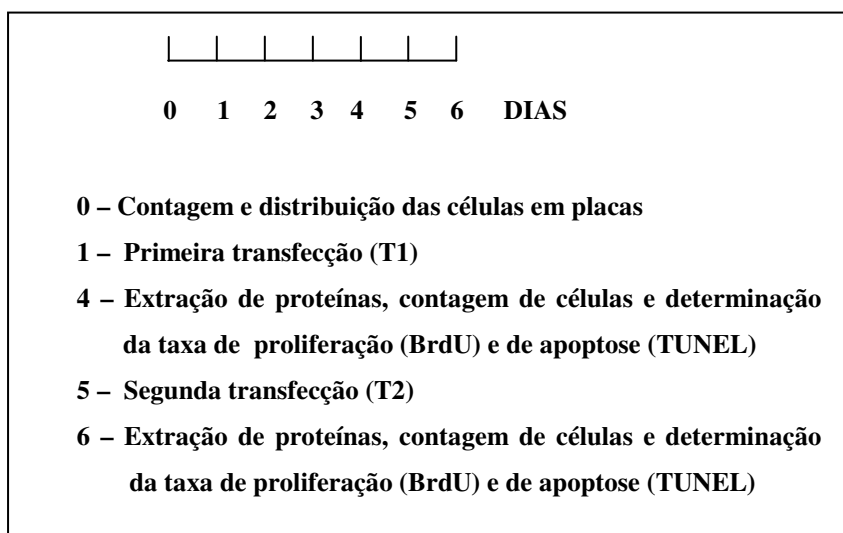
4.5 SILENCIAMENTO DO GENE *SF-1* VIA siRNA

As fitas duplas de siRNA específicas para a hibridização do RNAm do gene *SF-1* (CCCGCAACAACCUGCUCAUCGAAAU e AGAGCCAGAGCUGCAAGAUCGACAA) e o siRNA controle (48% GC – nível médio de GC) foram sintetizados por meio da tecnologia Stealth™ RNAi (Invitrogen). Apresentam, portanto, baixa probabilidade de ocorrência de reações inespecíficas e respostas ao estresse mediada por interferon. O reagente utilizado para transfectar as células H2985R foi JetSI™-Endo (Eurogentec) e seguiu-se o protocolo sugerido pelo fabricante.

Inicialmente, foi realizado um estudo piloto com o objetivo de se estabelecer as melhores condições para a realização do experimento de silenciamento do gene em questão. Primeiramente, transfectou-se as células com três siRNAs diferentes contra o RNAm de SF-1 (siRNA SF-1 #1, #2, #3) e comparou-se o nível de redução na expressão da proteína obtido por meio de uma única transfecção e utilizando dupla transfecção (figura 14). A partir do resultado foi selecionada a condição em que houve maior redução da expressão de SF-1, verificada por *western blotting*. Selecionou-se então, dois siRNAs para continuar os estudos de proliferação e extração de RNA (para posterior análise por micro-arranjo).

Como dito anteriormente, o protocolo seguido para todas as transfecções foi o sugerido pelo fabricante. Na tabela 4 se encontram as condições utilizadas para as transfecções.

FIGURA 14 - ESQUEMA DE TRANSFECÇÃO DE siRNA SF-1 TESTADO EM CÉLULAS H295R



4.5.1 Estudo de proliferação

A contagem de células foi feita em câmara de Neubauer nos dias 0, 4 e 6, utilizando sempre triplicatas. A extração de proteínas foi realizada nos dias 4 e 6 para avaliar os resultados do silenciamento obtido por meio de transfecção simples ou dupla.

A fim de se verificar a taxa de proliferação (em fase S do ciclo celular) e apoptose das células transfectadas com siRNA SF-1, foram utilizados kits de detecção por fluorescência *in situ* 5'-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) (*In situ* Cell Proliferation Kit, FLUOS, Roche) e TUNEL (*In situ* Cell Death Detection kit, Fluorescein, Roche), respectivamente. Os protocolos utilizados foram os sugeridos pelo fabricante. Essas análises também foram realizadas nos dias 4 e 6.

TABELA 4 - CONDIÇÕES DE TRANSFEÇÃO DE siRNA

Formato da cultura	24 poços
Número de células por poço	30.000
siRNA (controle, siRNA SF-1 #1, #2, #3)	25 pmoles
Quantidade de siRNA por poço	0,35µg
Volume de meio de cultura (sem soro) para diluição de siRNAs e de JetSI™-Endo	50µL
Volume de JetSI™-Endo	1µL
Meio de cultura completo em cada poço (antes da transfeção)	500µL
Concentração do siRNA durante as primeiras 4 horas	50nM
Meio completo acrescentado às culturas após 4 horas	500 µL

4.6 ANÁLISE DE PROTEÍNAS: SDS-PAGE E *WESTERN BLOTTING*

O método de eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) descrito por LAEMMLI (1970) proporcionou uma migração de proteínas dependente apenas de seu peso molecular, haja vista a presença de SDS, detergente carregado negativamente que se liga às regiões hidrofóbicas das proteínas. Assim, surgem longas cadeias polipeptídicas com a neutralização da carga intrínseca das proteínas. A utilização de β -mercaptoetanol, um agente redutor, rompe as ligações dissulfeto dessas cadeias permitindo assim que as subunidades protéicas sejam analisadas independentemente.

4.6.1 Preparo das amostras

As amostras que foram analisadas por *western blotting* foram as células H295R transfectadas por siRNA e os clones mutantes H295R/TR/SF-1. Foram utilizadas placas de 24 poços e acrescidos 200 µL de tampão Laemmli (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 50% glicerol, 2% SDS, 0.02% azul de bromofenol contendo 5% de β -mercaptoetanol) aquecido a 100° C em banho-maria por 4 minutos, em cada cultura. Após homogeneização exaustiva, os extratos protéicos foram transferidos para tubos e

aquecidos a 100° C em banho-maria por 5 minutos. Em seguida, foram submetidos a uma rápida centrifugação e armazenados a -20° C.

4.6.2 SDS-PAGE

A separação das proteínas foi feita por SDS-PAGE descrito por LAEMMLI (1970). As amostras foram aplicadas no gel de poliacrilamida/bisacrilamida 10%. O volume aplicado variou entre 10 e 40µL de extrato protéico, dependendo da quantidade de células presentes no momento da extração. O método utilizado neste estudo foi modificado a partir do descrito por DELMAS *et al.* (1993). As condições de corrida eletroforética e de transferência para a membrana seguiram as indicações do fabricante.

4.6.3 Western blotting

Os géis de poliacrilamida/bisacrilamida permaneceram mergulhados em tampão de transferência por cerca de 10 minutos a fim de evitar alterações no tamanho do gel e de remover os excessos de sais e detergentes do tampão de corrida. As membranas de PVDFs foram recortadas do tamanho do gel e incubadas em metanol, água e tampão de transferência. As incubações com solução de bloqueio, anticorpos e lavagens foram realizadas segundo instruções do fabricante da membrana.

Os anticorpos primários utilizados foram: anticorpo policlonal de coelho anti-AD4BP/SF-1 (diluição 1:1000, cedido gentilmente pelo Dr. K. Morohashi), dirigido contra o domínio de ligação de SF-1 ao DNA, cujo peso molecular é 53 kDa e anticorpo monoclonal de camundongo anti β -tubulina (diluição 1:1000), proteína humana de carácter constitutivo, de peso molecular igual a 50 kDa. Os anticorpos secundários anti-coelho e anti-camundongo utilizados estavam acoplados a *horseradish peroxidase* e foram utilizados a uma diluição de 1:10000.

A detecção foi feita pelo sistema quimioluminescente e as imagens analisadas em aparelho Las 3000.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a diferença entre as médias relacionadas à proliferação dos clones mutantes SF-1 e do controle foi utilizado o teste t de student com correção de Bonferroni para comparações múltiplas.

A diferença de crescimento celular entre as culturas transfectadas com siRNA SF-1 e com siRNA controle foi analisada por Kruskal-Wallis ANOVA. Este teste foi proposto para avaliar se três ou mais amostras são iguais (procedentes de uma mesma população) ou diferentes.

Já os resultados obtidos no ensaio de apoptose (TUNEL) e proliferação (BrdU) foi empregado o Teste Exato de Fisher, que permite calcular a probabilidade de associação das características que estão em análise, ou seja, de elas serem independentes.

As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas com um nível mínimo de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

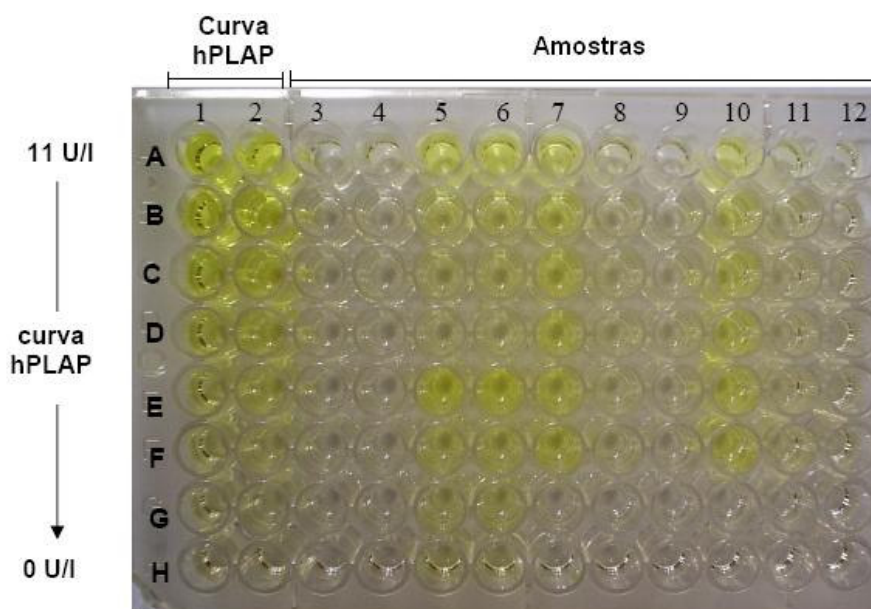
5 RESULTADOS

5.1 DOSAGEM DE PLAP EM TACS

Após preparo e dosagem da concentração de proteínas totais (PT) nas amostras e controles, realizou-se o imunoensaio com o objetivo de determinar a atividade enzimática de PLAP/PLAP-símile.

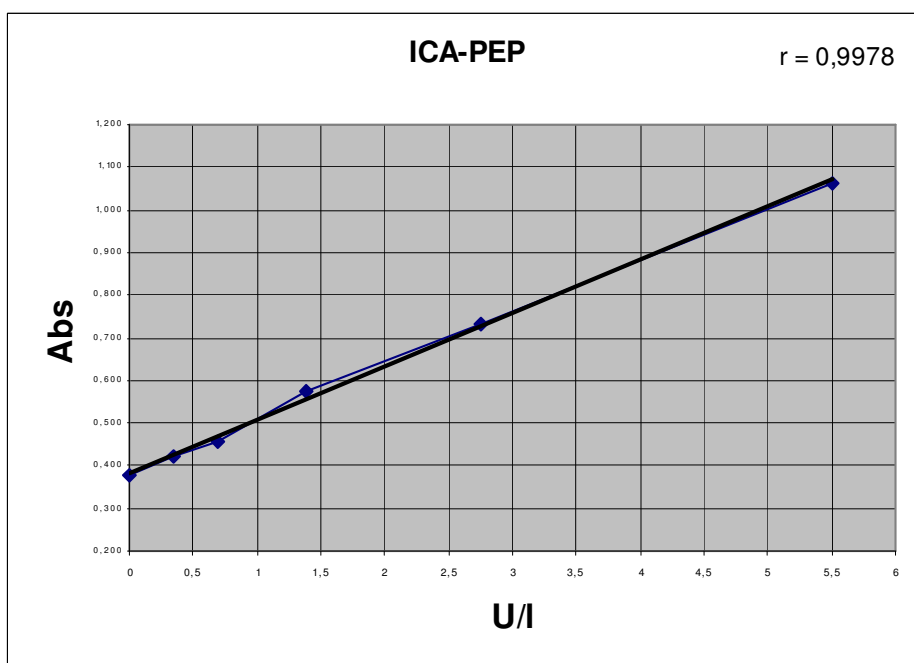
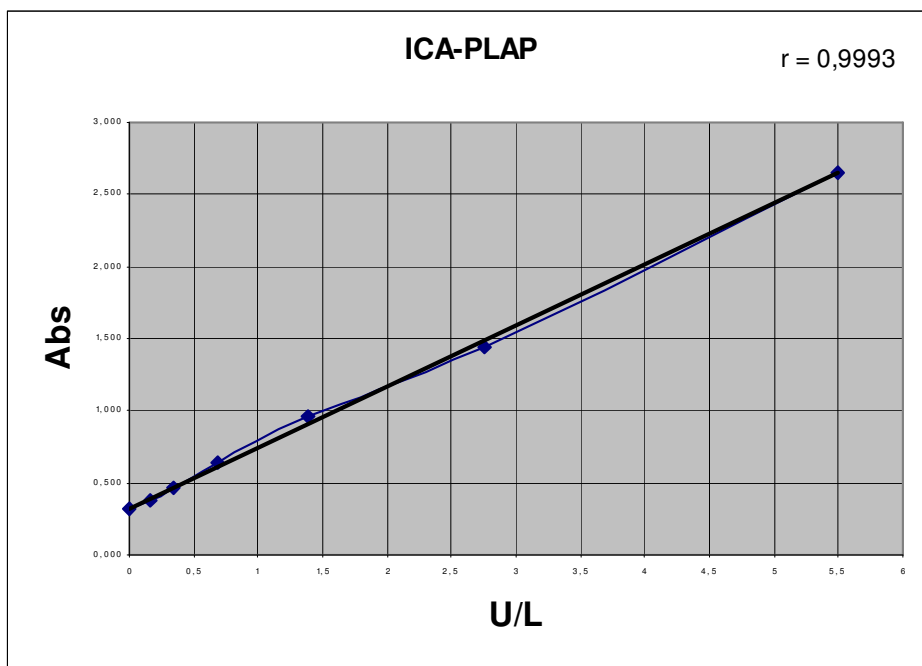
Os ensaios (figura 15) foram realizados em duplicatas e, tendo por base a quantidade máxima de amostra de adrenal normal disponível (controle negativo), ou seja, 18 μ g de PT/poço. Entretanto, para uma amostra de TAC, a quantidade de tecido foi insuficiente para alcançar essa quantidade de PT, sendo assim, foi utilizada a totalidade da amostra (6,3 μ g de PT/poço). Para o controle positivo, a quantidade de PT/poço foi 0,18 μ g para que os resultados estivessem dentro da curva padrão (gráfico 1).

FIGURA 15 - DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE PLAP/PLAP-SÍMILE NAS AMOSTRAS DE TAC E CONTROLES



NOTAS: Amarelo - cor do produto final (*p*-nitrofenol), cuja intensidade é proporcional à atividade catalítica da PLAP/PLAP-símile; colunas 3 a 9 – amostras de TCAs; colunas 10, 11 e 12 – controles

GRÁFICO 1 – CURVAS-PADRÕES PARA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DE PLAP/PLAP- SÍMILE



Os resultados da determinação da atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile pelos métodos ICA-PLAP e ICA-PEP estão apresentados na tabela 5. Pode-se verificar que em 9 das 16 (56,25%) amostras de TAC analisadas, a atividade das enzimas PLAP ou PLAP-símile estavam acima dos valores encontrados para o controle negativo (adrenal normal), que apresentou leituras iguais ou inferiores a 0,1 U/L.

Comparando os resultados obtidos neste experimento com aqueles encontrados por PIANOVSKI *et al.* (2006a), percebe-se que das 9 amostras com atividade de PLAP elevada, 6 também possuem um aumento na expressão de SF-1. Para uma amostra de TCA essa determinação da expressão de SF-1 não foi realizada no estudo citado.

Dentre as amostras com atividade enzimática de PLAP/PLAP-símile normal, 3 apresentaram expressão elevada de SF-1 e para as 4 outras amostras não havia dados disponíveis relacionados à expressão da proteína em questão.

5.2 CLONES MUTANTES SF-1 ESTÁVEIS

5.2.1 Produção dos clones mutantes

A partir da seleção de 12 colônias bacterianas transfectadas com o plasmídio pcDNA4/TO™ (resistente à zeocina) contendo as mutações de interesse, chegou-se a um único clone bacteriano contendo o plasmídio com a mutação desejada. Após seqüenciamento do gene *SF-1* para cada mutante produzido (Apêndice 1), transfectou-se as células H295R contendo o plasmídio pcDNA6/TR™ (H295R/TR - clone parental – resistente à blasticidina), com esse novo plasmídio contendo a mutação de interesse. Após 72 horas da transfecção (placa de 6 poços), era acrescentado ao meio de cultura o antibiótico zeocina para selecionar os clones celulares contendo o plasmídio mutante.

TABELA 5- APRESENTAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DAS AMOSTRAS ANALISADAS E OS RESULTADOS DA DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CATALÍTICA DE PLAP/PLAP-SÍMILE

AMOSTRA	CONDIÇÃO	TIPO CLÍNICO	ESTÁDIO	SF-1	p53 mutante	PESO DA AMOSTRA DE TUMOR (g)	PT/poço (mg)	AE (ICA-PLAP) - U/L	AE (ICA-PEP) - U/L
1	TAC-NI	V	II	-	positivo	0,4	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
2	TAC-NI	C + hiperald.	IV	aumentado	positivo	0,6	18	1,8	3,4
	TAC-I						18	1,3	2,9
3	TAC-NI	V + C	II	normal	positivo	0,6	18	6,8	7,5
	TAC-I						18	5,9	7,1
4	TAC-NI	V + C	II	aumentado	positivo	0,4	18	3,8	5,3
	TAC-I						18	2,9	4,9
5	TAC-NI	V	I	aumentado	positivo	0,5	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
6	TAC-NI	V	I	-	positivo	0,4	18	2,4	2,9
	TAC-I						18	1,9	2,1
7	TAC-NI	V	III	aumentado	positivo	0,4	6,3	2,1	3,5
	TAC-I						6,3	2	2,9
8	TAC-NI	V	I	normal	positivo	0,2	18	2,8	3,7
	TAC-I						18	2,5	3,1
9	TAC-NI	-	-	-	positivo	0,7	18	0	0
	TAC-I						18	0	0

continua

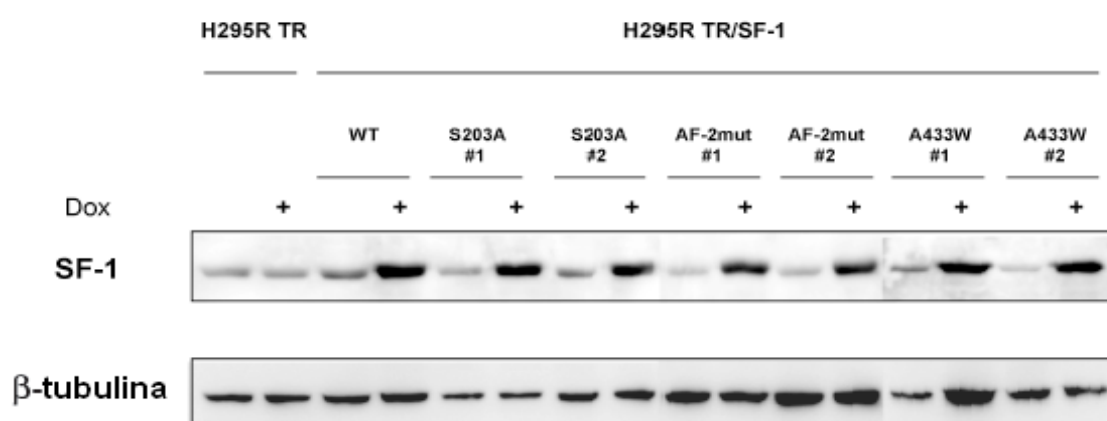
AMOSTRA	CONDIÇÃO	TIPO CLÍNICO	ESTÁDIO	SF-1	p53 mutante	PESO TUMOR (g)	PT/poço (mg)	AE (ICA-PLAP) - U/L	AE (ICA-PEP) - U/L
10	TAC-NI	V + C	II	aumentado	positivo	0,2	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
11	TAC-NI	V	I	aumentado	positivo	0,3	18	3,9	4,2
	TAC-I						18	3,5	3,9
12	TAC-NI	V	II	aumentado	positivo	0,7	18	0,5	0,56
	TAC-I						18	0,4	0,41
13	TAC-NI	V	I	aumentado	positivo	0,6	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
14	TAC-NI	V	IV	-	positivo	0,2	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
15	TAC-NI	V	II	-	positivo	0,7	18	0	0
	TAC-I						18	0	0
16	TAC-NI	V + C	II	aumentado	positivo	0,3	18	4,9	5,2
	TAC-I						18	4,1	5
17	AN-NI	Controle negativo				0,4	18	0	0,1
	AN-I						18	0,1	0,1
18	P-NI	Controle positivo				0,2	0,2	4,8	5,5
	P-I						0,2	4,6	5,1

NOTA: TAC-NI: amostra de TAC não inativada; TAC-I: amostra de TAC inativada pelo calor; AN: adrenal normal (controle negativo); P: placenta (controle positivo); V: virilização; C: Síndrome de Cushing; PT: proteína total; ICA-PLAP: imunoensaio para determinação da atividade enzimática utilizando anticorpo policlonal contra PLAP/PLAP-símile; ICA-PEP: imunoensaio para determinação da atividade enzimática utilizando peptídeo sintético contra PLAP/PLAP-símile.

A partir desse momento, todas as culturas desses clones terão o acréscimo de zeocina e blasticidina no meio de cultivo.

Essa etapa de seleção durou entre três e quatro semanas para cada clone e, após formação de colônias isoladas com quantidade satisfatória de células, foi retirada uma amostra de 12 colônias (clones) por meio de uma lavagem rápida com tripsina/EDTA e transferência para placa de 24 poços (1 clone/poço). Após algumas semanas as células foram novamente tripsinizadas e duas novas culturas (em placas de 24 poços) de cada clone foram obtidas. Após uma semana, cada um dos 12 clones (para cada mutação) foi submetido ao ensaio para verificar a eficiência da transfecção. Decorridas 72 horas do tratamento com doxiclina (dox), as células foram extraídas com tampão Laemmli e a expressão SF-1 foi verificada por *western blotting*. Para dar continuidade aos estudos, foram selecionados dois clones (para cada mutação) que apresentaram as maiores expressões de SF-1 na presença de dox, comparadas às células não tratadas. O controle negativo utilizado foi células H295R/TR (tratadas ou não com dox) e o controle positivo, um clone H295R/TR/SF-1 (contendo gene *SF-1* normal – *wild type*) tratado ou não com dox (figura 16).

FIGURA 16 - EXPRESSÃO DE SF-1 PELOS CLONES H295R/TR/SF-1 MUTANTES



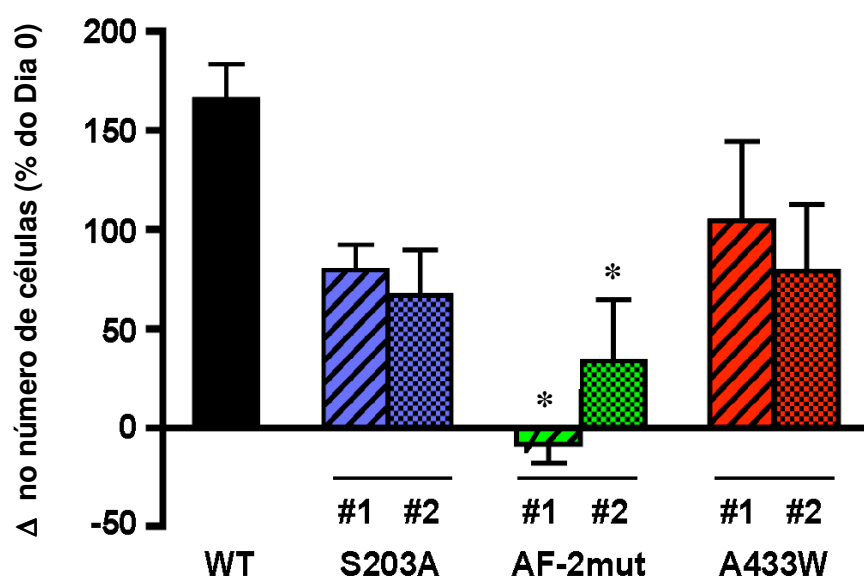
NOTA: A expressão de SF-1 é ativada pelo tratamento com doxiciclina (1 µg/mL por 72 horas) nas células H295R TR/SF-1 WT (SF-1 normal), S203A (clones SF-1 clones #1 e #2), AF-2mut (clones #1 e #2) and A433W (clones #1 e #2). No entanto, não houve ativação nas células H295R TR (clone parental). Os níveis de β-tubulina mostram que a quantidade de proteína aplicada no gel foi similar.

5.2.2 Estudo de proliferação dos clones mutantes

Após contagem em câmara de Neubauer, os clones H295R/TR/SF-1 (*wild type* e mutantes) foram distribuídos em placas de 24 poços (30.000 células/poço) em duplicata (Dia 0) e, após 24 horas as células foram tratadas ou não com dox. As células foram tripsinizadas e contadas no dia 6 e esse ensaio foi repetido 4 vezes (Apêndice 2).

Comparando-se os resultados de SF-1 (normal e mutantes) sobre a proliferação (gráfico 2), Verificou-se que somente os dois clones SF-1AF-2mut ($p=0.0015$ SF-1AF-2mut #1; $p=0.0207$ SF-1AF-2mut #2, teste T com correção de Bonferroni) apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as células tratadas ou não com dox, quando comparadas ao clone SF-1 WT.

GRÁFICO 2 - EFEITOS DAS MUTAÇÕES NO GENE *SF-1* SOBRE A PROLIFERAÇÃO CELULAR.



NOTA: Clones H295R/TR/SF-1 com expressão aumentada de SF-1-S203A, SF-1AF-2mut ou SF-1A433W (dois clones de cada mutação) foram mantidos em cultura por 6 dias na presença ou ausência de dox. O número de células, expresso como porcentagem da diferença entre as células + e - para tratamento com dox, foi comparado ao crescimento das células H295R TR/SF-1 WT (SF-1 normal) nas mesmas condições. Houve uma diferença estatisticamente significativa somente para os dois clones SF-1AF-2mut ($p=0.0015$ SF-1AF-2mut #1; $p=0.0207$ SF-1AF-2mut #2, teste T com correção de Bonferroni).

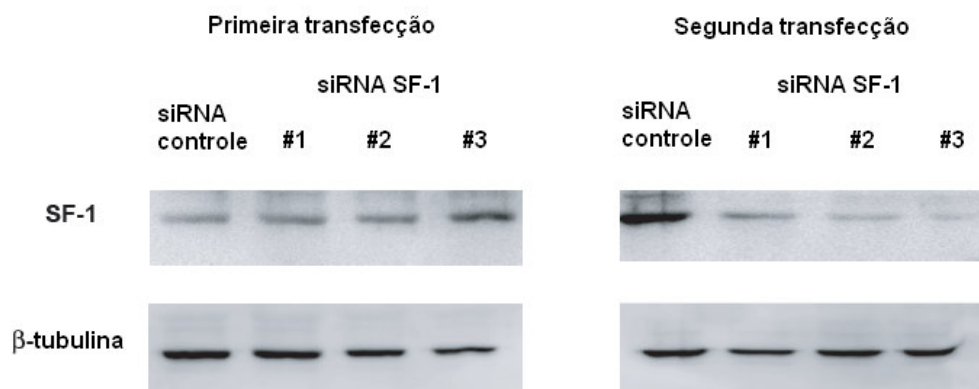
5.3 SILENCIAMENTO DE SF-1 VIA siRNA

5.3.1 Expressão de SF-1

Inicialmente, foram testados três siRNAs contra o gene *SF-1* para verificar a eficiência dos oligonucleotídeos, bem como a capacidade de reprodutibilidade do silenciamento. Também foram testados os protocolos com apenas uma transfecção (Dia 1) e uma dupla transfecção (Dias 1 e 4).

A figura 17 mostra os resultados na expressão de SF-1 após transfecção dos três siRNAs em células H295R nas duas condições (transfecção simples e dupla). Verificou-se que os três siRNAs foram capazes de reduzir a expressão de SF-1 somente com o protocolo de dupla transfecção e que, o silenciamento promovido pelo siRNA #1, foi menor quando comparado aos outros dois.

FIGURA 17 - COMPARAÇÃO NA REDUÇÃO DA EXPRESSÃO DE SF-1 UTILIZANDO TRÊS siRNAs DIFERENTES.



NOTA: Perfil de expressão de SF-1 após transfecção com siRNA. Um siRNA inespecífico para as células adrenocorticais foi utilizado como controle negativo. Os níveis de β -tubulina mostram que a quantidade de proteína aplicada no gel foi similar.

5.3.2 Estudo de proliferação

Para dar continuidade aos estudos de proliferação em células transfectadas com siRNA contra SF-1, foram escolhidos os dois oligonucleotídeos que reduziram a expressão de SF-1 de forma mais acentuada (siRNAs #2 e #3) (figura 16).

5.3.2.1 Contagem de células

Após contagem em câmara de Neubauer, as células H295R foram distribuídas em placas de 24 poços, em triplicata para cada condição (siRNA controle, siRNAs SF-1 #2 e #3) (Dia 0) e foram realizadas transfecções com os siRNAs nos Dias 1 e 4.

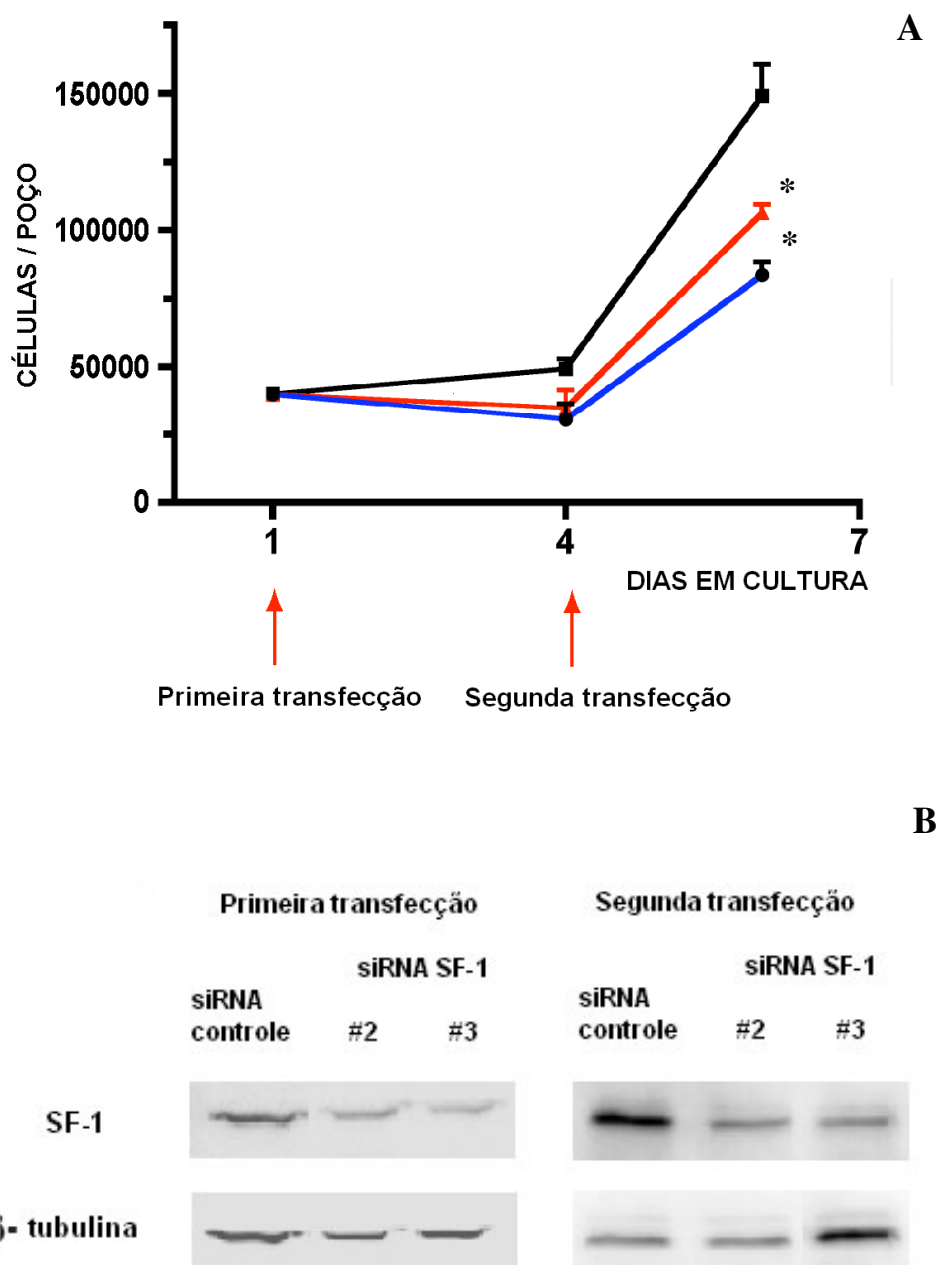
As células foram tripsinizadas e contadas nos Dias 4 e 6 (Apêndice 3). Os resultados obtidos são apresentados na figura 18, em que se pode verificar redução estatisticamente significativa no número de células ($p=0.0273$, Kruskal-Wallis ANOVA) após a dupla transfecção com os dois siRNAs contra *SF-1*, quando comparado ao controle negativo. A quantidade da proteína SF-1 reduziu quando realizadas uma ou duas transfecções. O número de células contadas para as condições teste (siRNA contra SF-1) e controle negativo não foi estatisticamente diferente com apenas uma transfecção.

5.3.2.2 Determinação das taxas de apoptose e proliferação celular

Nos Dias 4 e 6 também foram realizados testes a fim de se determinar a porcentagem de células em apoptose (TUNEL) e em proliferação (fase S do ciclo celular – uso de BrdU) por meio de kits para marcação fluorescente *in situ*.

Foram contadas as células de 5 campos ao acaso para cada lâmina, sendo uma lâmina para cada condição (siRNA controle, siRNA SF-1 #2 e siRNA #3) (Apêndice 4).

FIGURA 18 - CONSEQUÊNCIAS DA TRANSFEÇÃO DE siRNA CONTRA O GENE *SF-1* SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS E A EXPRESSÃO DA PROTEÍNA SF-1



NOTA: Em A: a transfecção com siRNAs específicos (#2 e #3) reduziu a quantidade de células após 6 dias em cultura. A diferença entre o número de células obtidas para esses dois siRNAs é estatisticamente diferente ($p=0.0273$, Kruskal-Wallis ANOVA) dos valores encontrados para o siRNA controle (em preto). O desvio-padrão está indicado. Em B: Confirmação do silenciamento promovido pelos siRNAs (#2 e #3) na redução da proteína SF-1.

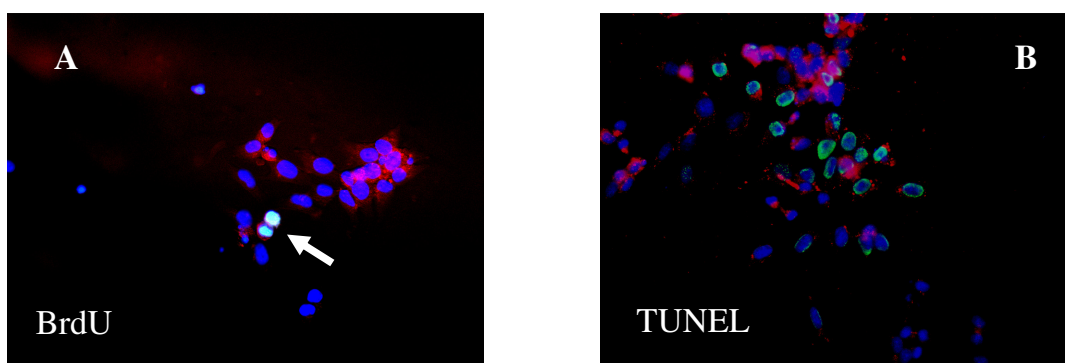
A diferença entre o número de células apoptóticas (marcação positiva para TUNEL) no controle e nos dois siRNAs específicos para SF-1 foi estatisticamente significativa somente para o Dia 6 (siRNA #2 $p=0.0474$; siRNA #3 $p<0.0001$) (figuras 19 e 20).

A transfecção com siRNA SF-1 em células H295R foi capaz de reduzir significativamente o número de células BrdU positivas nos Dias 4 (siRNA #2 $p=0.0036$; siRNA #3 $p<0.0001$) e 6 (siRNA #2 $p=0.0005$; siRNA #3 $p=0.0240$) (figuras 19 e 20).

Para as análises estatísticas de ambos os experimentos foram utilizados os números de células contadas e os resultados foram analisados pelo Teste exato de Fisher.

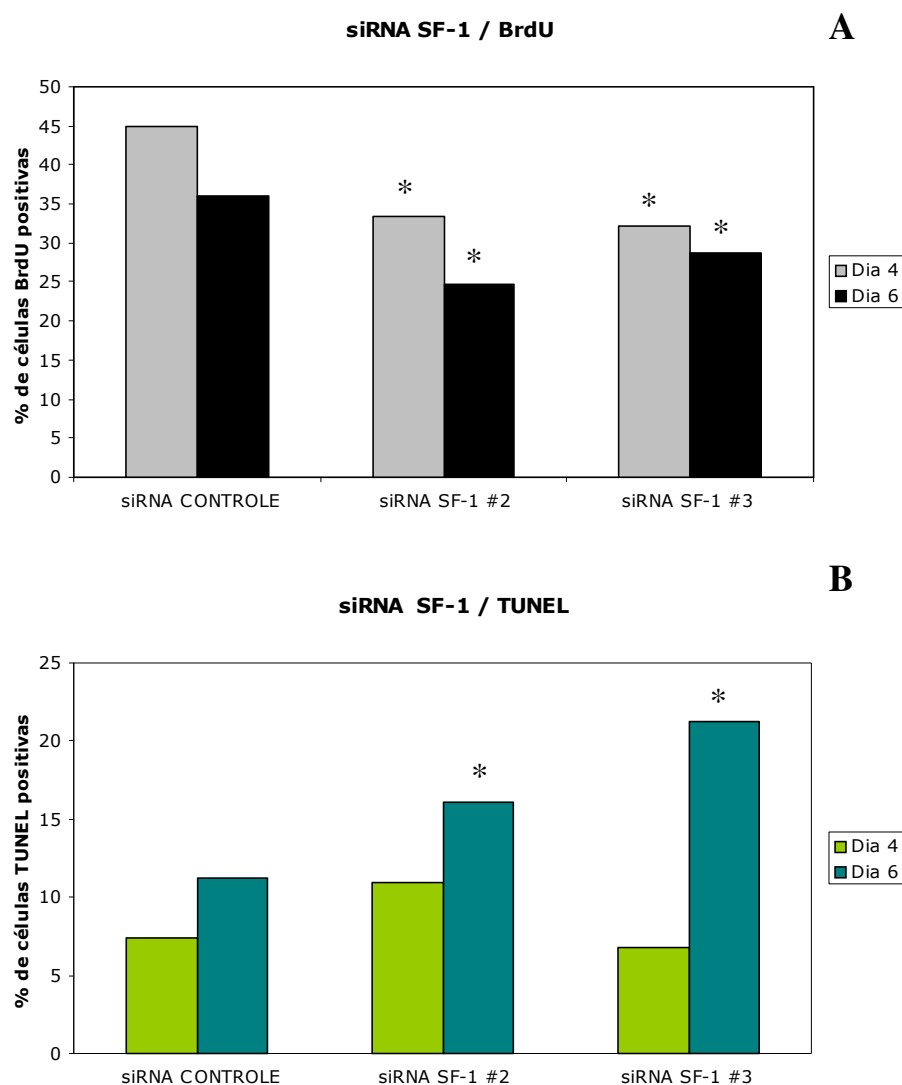
Esses resultados todos em conjunto demonstram que, após a repressão na expressão de SF-1 em células H295R, houve um aumento da taxa de células em apoptose e uma redução da proliferação.

FIGURA 19 - MARCAÇÃO BrdU e TUNEL EM CÉLULAS H295R APÓS TRANSFECCÃO COM siRNAs SF-1



NOTA: Imagens representativas da marcação TUNEL e BrdU em células H295R transfectadas com siRNA SF-1 (#2). Em **A**: observam-se, por meio da sobreposição de imagens, dois núcleos positivamente marcados em verde (seta branca) indicando células em apoptose; em azul os núcleos normais corados com diaminobenzidina (DAPI) e em vermelho o reagente de transfecção fluorescente. Em **B**: os núcleos com marcação em verde são positivos para o anticorpo anti-BrdU, como na figura A, os núcleos de células negativas aparecem corados somente com DAPI e, em vermelho, o reagente de transfecção.

FIGURA 20 - QUANTIDADE DE CÉLULAS POSITIVAS PARA BrdU E TUNEL APÓS TRANSFEÇÃO COM siRNAs ESPECÍFICOS PARA O GENE *SF-1*



NOTA: Células H295R com repressão parcial na expressão de SF-1 apresentam redução na proliferação e aumento na apoptose. Em **A**: porcentagem de positividade para marcação BrdU com diferença significativa entre controle e siRNAs SF-1 nos Dias 4 (siRNA #2 $p=0.0036$; siRNA #3 $p<0.0001$) e 6 (siRNA #2 $p=0.0005$; siRNA #3 $p=0.0240$). Em **B**: porcentagem de células positivas para TUNEL com diferença estatisticamente significativa entre o controle e os siRNAs SF-1 somente para o Dia 6 (siRNA #2 $p=0.0474$; siRNA #3 $p<0.0001$). Os resultados foram analisados pelo Teste exato de Fisher.

5 DISCUSSÃO

5.1 PRESENÇA DE PLAP EM TACs

Métodos imunológicos para a determinação quantitativa e qualitativa de vários tipos de moléculas têm sido utilizados como importantes ferramentas para a confirmação de diagnósticos clínicos. No processo de seleção do imunoensaio, os principais parâmetros considerados são a sensibilidade, a especificidade, os limites de detecção e a praticidade técnica. Os ensaios imunoenzimáticos foram desenvolvidos em meados dos anos 70 (YALOW E BERSON, 1959) e rapidamente ganharam popularidade.

Observa-se que dentre os exames utilizados para confirmar o diagnóstico de TAC, não foi descrito ainda um marcador produzido especificamente por essas células tumorais. Dessa forma, vê-se necessário o estudo de algumas proteínas que, potencialmente possam se apresentar como marcadores tumorais, por exemplo, PLAP. Esta proteína além de indicar a presença de tumores (seminoma, tumor ovariano e provavelmente TAC) por determinação plasmática, poderá ser útil como fator diferencial de outros tipos de tumores de córtex adrenal mais característicos de adultos.

Estudos utilizando técnicas de imunohistoquímica e *western blotting* demonstraram a presença de PLAP/PLAP-símile em células de TAC de crianças (RODRIGUES, 2004). A justificativa central para o estudo de PLAP/PLAP-símile em TCAs se baseia na hipótese sobre a origem embrionária desse tumor. As seguintes razões poderiam justificar essa dedução: (1) a maior parte (80-90%) dos tumores do adulto tem sua caracterização como benigno ou maligno pelo exame histopatológico, o que não é possível para o TAC pediátrico; (2) os tumores benignos do adulto quase sempre são não-funcionais, enquanto que os infantis são malignos, conseguem crescer sem causar manifestações clínicas e geralmente são diagnosticados no estágio avançado (BUGG *et al.*, 1994); (3) o tumor pediátrico apresenta amplificação do locus 9q34 (FIGUEIREDO *et al.*, 1999) que não é encontrado no adulto, e está relacionada

com ganho ou amplificação do gene que codifica SF-1 em 60-80% dos casos (FIGUEIREDO *et al.*, 2005); (4) a maior parte dos tumores da criança é diagnosticada entre 1 e 3 anos de idade, sendo que o aparecimento do tumor é ainda mais precoce, com base em relatos dos pais de que as manifestações clínicas surgem de 3 meses a 1 ano antes, aproximando do nascimento da criança e do período de desenvolvimento do córtex da glândula adrenal (FIGUEIREDO *et al.*, 2000).

No presente estudo foi realizado um teste imunoenzimático (ICA) para estudar a presença do marcador tumoral PLAP/PLAP-símile em amostras de TAC por meio de sua atividade catalítica. Foram considerados positivos, ou seja, com atividade catalítica de PLAP/PLAP-símile acima da normal, quando os valores suplantassem os encontrados para sua atividade na adrenal normal, que foi 0,1 U/L.

A isoenzima chamada PLAP-símile possui 98% de homologia com PLAP (MILLÁN; MANES; 1988), por isso é tão difícil discriminá-las utilizando apenas imunotestes. OTTO *et al.* (1995) descreveram um processo de separação dessas duas isoenzimas, que consiste em uma purificação prévia de “PLAPs” e uma associação de eletroforese bidimensional e imobilização em coluna com gradiente de pH. Ambas enzimas são úteis como marcadores para alguns tipos tumorais. PLAP-símile e PLAP já foram descritas presentes, especialmente, em células de tumores de ovários (LOWE; STRAUSS, 1990) e seminomas (KOSHIDA; WAHREN, 1990).

Possíveis reações cruzadas que tenham ocorrido na pesquisa de PLAP/PLAP-símile nos TACs, não são relevantes para o presente estudo, pois como relatado anteriormente, tanto PLAP como PLAP-símile são encontradas em tumores esteroidogênicos, bem como em placentas (controle positivo).

Apenas uma amostra apresentou quantidade de proteínas totais inferior às demais amostras. No entanto, mesmo assim apresentou elevada atividade catalítica nos testes realizados.

Em 9 (56,25%) das 16 amostras de TACs estudadas, detectou-se a presença de PLAP/PLAP-símile por meio da sua atividade catalítica aumentada. RODRIGUES (2004) por meio de imunohistoquímica detectou a presença de PLAP, nesse mesmo

tipo tumoral em (36,2%) das amostras analisadas. A diferença entre esses valores pode ser justificada pelas sensibilidades desses dois testes.

Os resultados sobre PLAP/PLAP-símile nos TACs poderão contribuir com testes que objetivem rastrear possíveis recidivas, especialmente aqueles do tipo ELISA para PLAP solúvel. Essa proteína sob a forma solúvel pode ser encontrada em amostras de soro e fluidos corporais de pacientes com alguns tumores.

A determinação plasmática de PLAP, em pacientes com outros tipos de tumores originários de tecidos esteroideogênicos, é útil tanto como auxiliar no diagnóstico, como no monitoramento da terapêutica. MANO *et al.* (1986) mostraram que a grande maioria das células de tumores de ovários expressa PLAP em alguma quantidade e há registrado na literatura um caso em que os níveis séricos de PLAP apresentaram-se elevados dois anos antes do diagnóstico de câncer de ovário (BEM-ARIE *et al.*, 1999). Pacientes com seminoma também possuem níveis elevados de PLAP no sangue (LANGE *et al.*, 1882; KOSHIDA *et al.*, 1996; NOURI *et al.*, 2000).

O uso de marcadores tumorais como CA-125, AFP, LDH, f-HCG e PLAP/PLAP-símile, pode aumentar a sensibilidade e especificidade no diagnóstico precoce do tumor de ovário, aumentando os índices de sobrevida em cinco anos de 20% em estádios tardios para 80-90% em estágio precoce (MUNRO *et al.*, 1991; BEREK; BAST, 1995).

Alguns tumores de testículo expressam um tipo de PLAP que não se apresenta sob a forma solúvel. Esse achado está sendo útil na diferenciação desses tumores e pode explicar a diferença na resposta clínica dos tumores de testículos ao tratamento (TELFER; GREEN, 1993; OLIVER, 1998).

NATHANSON E FISHMAN (1971) foram os primeiros a publicar sobre a presença de PLAP em tumor de córtex adrenal. Nesse trabalho foram analisadas amostras de sangue de três pacientes com tumor de córtex adrenal e constatou-se que um paciente (33,3%) apresentou atividade de fosfatase alcalina após aquecimento a 65°C por 5 minutos. O método utilizado não é o mais indicado para esse tipo de análise e sua sensibilidade e especificidade são inferiores à metodologia empregada no presente estudo. Outra observação que deve ser feita sobre o trabalho de

NATHANSON E FISHMAN (1971) é que não foram discriminadas as idades dos três pacientes com tumor de córtex adrenal. Somente é informado que os 253 pacientes que participaram do estudo apresentavam idade entre 1 e 92 anos, com média de 60 anos. Tendo-se como referência a presença de PLAP em amostras de TACs analisadas por imunohistoquímica, *western blotting* e ICA, e o fato de que, é possível que esse tipo tumoral se origine de forma diferenciada em crianças e adultos.

Muitas vezes, o TAC tem crescimento lento e, em 10% dos casos pode não apresentar manifestações de produção hormonal, embora esta forma seja mais comum na idade adulta (RIBEIRO; FIGUEIREDO, 2004), atrasando o diagnóstico e comprometendo o sucesso do tratamento. Frente a isto, a determinação sérica da PLAP (quando TAC é positivo para PLAP) poderia ser utilizada como um possível indicador da presença do TAC (primário ou recidivante), sendo a única possibilidade de detecção precoce (em relação à tomografia), na ausência de evidências clínicas.

Em um estudo recente (PIANOVISKI *et al.*, 2006a), todas as amostras de TACs dos estados de SP e PR analisadas apresentaram aumento na expressão de SF-1, quando comparadas à adrenal normal.

Diante dessas informações, buscou-se relacionar PLAP e SF-1 nesses tumores, e foi constatado que dos 9 TCAs com atividade catalítica de PLAP elevada, 6 (75%) expressavam SF-1 de forma aumentada, e para uma amostra a informação sobre essa expressão não estava disponível. Como grande parte das amostras de TAC apresenta SF-1 elevado e PLAP/PLAP-símile aumentada em apenas 33%, talvez o encontro de PLAP/PLAP-símile e SF-1 elevado no TAC (75%) seja mera coincidência, contudo será necessária reavaliação com maior quantidade de amostras de TAC.

Os novos dados obtidos no presente trabalho confirmam a presença de PLAP em TAC e poderão colaborar como auxiliar na elaboração de um protocolo para determinação sérica de PLAP, útil para diagnóstico de possíveis recidivas e para acompanhamento da terapia antineoplásica.

5.2 GENE *SF-1* ENVOLVIDO NA PROLIFERAÇÃO CELULAR

Durante as últimas décadas, vários estudos têm elucidado algumas alterações genéticas que acompanham a tumorigênese adrenal. BEUSCHLEIN *et al.* (1994) demonstraram que a hiperplasia de córtex adrenal é um processo policlonal, enquanto que os carcinomas são monoclonais, sugerindo que alterações específicas no genoma são necessárias para a formação de TCAs. Rearranjos no cromossomo humano 11 (11p15) e/ou aumento na expressão de IGF-II são freqüentemente associados a neoplasias adrenocorticais. A presença de mutações em *TP53* e deleções no gene do receptor ACTH também são descritas (REINCKE, 1998). KIIVERI *et al.* (2005) mostraram que o fator de transcrição GATA-6 está reduzido em carcinomas quando comparado à adrenal normal e a adenomas.

A elevada incidência de TACs no Brasil, mais especificamente nos estados do Paraná e São Paulo, e sua tumorigênese podem ser explicadas, em parte, pela presença da mutação R337H do *TP53*. Primeiramente, mutações *TP53* em linhagens germinativas, em geral aumentam a predisposição para TACs (VARLEY *et al.*, 1999). E achados laboratoriais sugerem, fortemente, que R337H do *TP53* possui um papel importante na tumorigênese adrenal, como perda da heterozigose com retenção do alelo mutante nas células tumorais, o acúmulo da proteína p53 mutante no núcleo e alterações conformacionais, assim como outras propriedades dessa proteína *in vitro* (RIBEIRO *et al.*, 2006).

Outras alterações genéticas, encontradas com frequências variáveis, em pacientes brasileiros com TAC apresentando a mutação R337H do *TP53*, incluem amplificação da região do cromossomo 9q34 (detectada em oito das nove amostras de TACs analisadas) (FIGUEIREDO *et al.*, 1999), um aumento no número de cópias do gene *SF-1* (em oito dos nove casos com amplificação 9q34) (FIGUEIREDO *et al.*, 2005), mutação *missense* na linhagem germinativa no gene da sub-unidade α da inibina (LONGUI *et al.*, 2004), alterações na expressão de outros fatores de transcrição (SUSUKI *et al.*, 2000; SHIBATA *et al.*, 2001; BARBOSA *et al.*, 2004; FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PIANOVSKI *et al.*, 2006a; KIIVERI *et al.*, 2005). Esses e

tantos outros fatores, que ainda serão determinados, podem contribuir para o processo de transformação neoplásica da adrenal (quadro 4).

Recentemente, nosso grupo de pesquisa demonstrou a presença da amplificação de *SF-1* em TACs com a presença da mutação R337H do *TP53*. Detectou-se também um aumento nos níveis de SF-1, que não está relacionado com gravidade clínica da doença ou estadiamento do tumor (FIGUEIREDO *et al.*, 2005; PIANOVSKI *et al.*, 2006a). Infelizmente, uma linhagem celular desse tumor apresentando a mutação R337H do *TP53* ainda não foi obtida. Conseqüentemente, é necessário desenvolver outras técnicas para estudar as características celulares e moleculares da adrenal humana.

Levando-se em conta a hipótese acerca da origem do TAC infantil em que ele derivaria da zona fetal da adrenal, as células escolhidas para produção dos clones mutantes SF-1 e para os estudos de silenciamento genético com siRNA realizados nesse trabalho foram células H295R (carcinoma adrenocortical), diferenciadas por produzirem um amplo painel de hormônios esteróides, apresentarem fenótipo de adrenal fetal e expressarem SF-1 de maneira endógena (STAELS *et al.*, 1993; LALLI *et al.*, 2000). Além disso, o sequenciamento do gene *TP53* das células H295R revelou a presença de uma mutação F338L (heterozigoto) (DOGHMAN *et al.*, 2007b). Essa mutação influencia o resíduo adjacente R337 no domínio de tetramerização de p53 e é capaz de inativá-lo (KATO *et al.*, 2003).

No presente trabalho foram construídos clones a fim de se estabelecer um modelo celular para o estudo do TAC. Para cada mutante (S203A, L451A/L452A (AF-2mut) e A433W), dois clones diferentes foram produzidos para evitar qualquer tipo de efeito clonal. A partir desses clones, foi constatada uma diferença na indução da proliferação celular quando se comparou o crescimento dos clones H295R/TR/SF-1 normal e mutantes (S203A, AF-2mut e A433W), na presença ou não de dox. As proteínas SF-1 normal e mutantes são expressas de forma aumentada nas células H295R/TR/SF-1 após tratamento com doxiciclina (análogo estável da tetraciclina), ao passo que a expressão da proteína não sofre alteração na presença de dox no clone parental H295R/TR.

O clone AF-2/mut apresentou um comportamento diferente quando comparado ao clone H295R/TR/SF-1 normal, pois houve uma redução, estatisticamente significativa, na ativação da proliferação celular. Entretanto, os outros dois clones S203A e A433W foram, ainda que parcialmente, capazes de induzir a proliferação dependente de dox.

Na maioria dos receptores nucleares, o domínio AF-2 age cooperativamente com AF-1 para ativar a transcrição. A região localizada no resíduo N-terminal de SF-1 é muito curta, não possuindo o domínio clássico AF-1. Como dito anteriormente, AF-2 de SF-1 coopera com dois domínios de ativação localizados *downstream* de DBD e o domínio de ativação proximal (pAF) sobrepõe-se à dobradiça e à hélice H1 de LBD e possui uma região essencial para a atividade de SF-1.

As interações independentes de um ligante exógeno são dependentes de AF-2 e muitas delas são mediadas pela região LXXLL. Esse domínio de SF-1 também é importante para o recrutamento de cofatores, por exemplo, p300/CBP/*cointegrator-associated protein* (p/CIP) e fator intermediário de transcrição 2 (TIF2) (HAMMER *et al.*, 1999; BORUD *et al.*, 2002), que estimulam a atividade transcricional de SF-1 via domínio AF-2.

O resultado encontrado para o clone H295R/TR/SF-1/AF-2mut sugere que a função de transativação é importante para a atividade de SF-1. Esse dado está de acordo com alguns estudos que mostram que o domínio AF-2, embora necessário, não é suficiente para ativar a transativação por SF-1 (BOURGUET *et al.* 1995; RENAUD *et al.* 1995; WAGNER *et al.* 1995; MORAS; GRONEMEYER 1998; RENAUD *et al.* 1995; HENTTU *et al.* 1997; FENG *et al.* 1998; NORRIS *et al.* 1998).

Com objetivo de confirmar a importância de SF-1 no processo de proliferação celular, o crescimento de células H295R foi comparado em culturas transfectadas com siRNA controle e com dois diferentes siRNAs específicos para o gene *SF-1*.

A tecnologia do RNAi tem se tornado nos últimos anos uma ferramenta universalmente aceita para o estudo da função gênica. Graças à descoberta do RNAi em 1998, seus descobridores FIRE e MELO ganharam o prêmio Nobel de Medicina em 2006. Essa poderosa técnica de inibição de genes promove um silenciamento mais

significativo que as técnicas mais usadas anteriormente, como ribozimas e RNA *antisense* (ELBASHIR *et al.*, 2001; HANNON *et al.*, 2002). Atualmente, para estudos em células de mamíferos foi descoberto que os RNAi de tamanho entre 21-23 nt são os mais indicados, pois apresentam um reduzido efeito inespecífico (ELBASHIR *et al.*, 2000).

Os siRNAs utilizados nesse trabalho (StealthTM) apresentam a particularidade de serem capazes de hibridizar com o RNAm específico somente com a fita *sense*, evitando portanto, efeitos inespecíficos de uma forma mais eficiente. Além disso, a ativação das vias interferon, que levam à ativação da morte celular e alteração dos níveis basais de alguns genes, com esse tipo de siRNA não ocorre, facilitando assim a interpretação dos resultados.

Para que os siRNAs possam ser interiorizados na célula e alcançar o citoplasma, o reagente de transfecção os engloba produzindo partículas capazes de interagir com as proteoglicanas aniônicas localizadas na membrana plasmática, permitindo assim que os complexos sejam endocitados. Dessa forma, tanto siRNA controle, quanto siRNAs que hibridizam especificamente com o RNAm de SF-1 (#2 e #3) foram introduzidos nas células H295R. Após realização dos estudos em triplicata, chegou-se ao resultado que ambos os siRNAs específicos foram capazes de (1) silenciar, parcialmente, a expressão de *SF-1* e, (2) reduzir significativamente a proliferação das células estudadas, quando comparados ao siRNA controle.

A redução no número de células promovida por SF-1 poderia ser em virtude de um aumento da taxa de apoptose e/ou redução na proliferação celular.

A detecção de células na fase S do ciclo celular é, potencialmente, a única maneira de determinar a cinética das células que estão em processo de proliferação. A incorporação de um análogo da timidina, BrdU, é utilizada para detectar o DNA em fase de síntese. No presente trabalho, as células submetidas à transfecção com siRNAs (controle e SF-1) foram analisadas quanto à incorporação de BrdU. O resultado obtido indica que a redução na expressão de SF-1 promove uma diminuição da quantidade de células capazes de incorporar BrdU, ou seja, há uma redução na proliferação celular. A diferença entre as culturas transfectadas com siRNA controle e com os siRNAs SF-1

(#2 e #3) foi estatisticamente significativa quando se transfectou as células uma única vez e quando se realizou a dupla transfecção.

Se a inibição de *SF-1* é capaz de reduzir a proliferação celular, ele também seria capaz de aumentar a apoptose? Para verificar essa hipótese, as células submetidas ao tratamento com siRNAs também foram estudadas *in situ* quanto à taxa de apoptose.

Apoptose ou morte celular programada é um tipo de morte celular caracterizado por profundas modificações estruturais e funcionais (WYLLE, 1992). Trata-se de um mecanismo fisiológico de controle da população celular que regula o tamanho dos tecidos, exercendo um papel oposto ao da mitose (VASCONCELOS, 1995).

A quebra do DNA genômico durante a apoptose pode gerar fragmentos de DNA de baixo peso molecular (mono- e oligonucleossomos) e fitas simples de DNA com alto peso molecular. As fitas de DNA fragmentadas podem ser identificadas pela marcação da extremidade terminal livre 3'-OH (DNA fragmentado em processo de morte celular programada) por meio de nucleotídeos em uma reação enzimática. A incorporação de fluoresceína permite a visualização dos fragmentos de DNA presentes nos núcleos. Essa técnica é denominada TUNEL e foi dessa forma que se analisou a taxa de células H295R positivas para a marcação em questão. A diferença entre a taxa de células TUNEL positivas com redução na expressão de SF-1 em relação ao controle, foi significativa apenas quando se realizou o protocolo de dupla transfecção.

Embora a técnica TUNEL seja amplamente utilizada para a determinação de células em apoptose, ela não é específica para a morte celular programada. Por isso, os resultados foram interpretados com precaução e correlacionados com critérios morfológicos de apoptose (ANSARI *et al.*, 1993), como núcleo com condensação da cromatina e fragmentação citoplasmática em corpos apoptóticos (STAUNTON; GAFFNEY, 1998).

Esses achados em conjunto nos permitem dizer que o silenciamento de SF-1 exerce um papel na quantidade das células de tumor adrenocortical, seja pela indução da apoptose, seja pela redução da taxa de proliferação. No entanto, o efeito de SF-1

sobre o ciclo celular pode ser um efeito direto ou indireto, haja vista o fato dele ser um fator envolvido na transcrição de vários genes.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa acrescentou mais um gene que é regulado por SF-1: *NOV (nephroblastoma overexpressed)* (DOGNMAN *et al.*, 2007a). Ainda se conhece pouco sobre essa proteína, mas já se sabe que sua expressão se encontra reduzida nos TACs estudados, comparados à adrenal normal e, sua expressão é reprimida quando SF-1 está aumentado. MARTINERIE *et al.* (2001) demonstraram que a expressão de NOV está negativamente associada à diferenciação celular e à malignidade de tumores adrenocorticais em adultos. Nesse mesmo trabalho, é relatado que, em fibroblastos embrionários de galinhas, um aumento na expressão de NOV leva a uma inibição do crescimento celular. O fato de NOV ser uma proteína que induz à apoptose (ver revisão em PLANQUE *et al.*, 2003), permite hipotetizar que ela possa estar envolvida no processo de surgimento e/ou proliferação dos TACs (quadro 4). Portanto, estudos futuros serão necessários para se verificar o real papel de NOV nas células adrenocorticais que sofrem um processo de transformação tumoral (benigna ou maligna).

Outra proteína envolvida no processo de proliferação celular e que, pode atuar sob influência de SF-1 é a β -catenina. Em 2003, foram publicados vários trabalhos demonstrando um sinergismo entre β -catenina e diversos receptores nucleares, incluindo SF-1 (GUMMOW *et al.*, 2003; HOSSAIN; SAUNDERS *et al.*, 2003; JORDAN *et al.*, 2003), LRH-1 (*liver receptor homolog 1*) (BOTRUGNO *et al.*, 2004), receptor do ácido retinóico (EASWARAN *et al.*, 1999; PAWLOWSKI *et al.*, 2002) e DAX1 (MIZUSAKI *et al.*, 2003).

β -catenina juntamente com os membros da família TCF/LEF (*T cell factor/Lymphoid enhancing factor*) são os mediadores da via de sinalização Wnt, que suscita uma ampla variedade de respostas incluindo regulação da proliferação e sobrevivência celular, remodelamento do citoesqueleto para definir polaridade celular e motilidade celular (ZHURINSKY *et al.*, 2000). Na presença de um sinal Wnt, a fosforilação de β -catenina é bloqueada e ela migra do citosol para o núcleo onde forma heterodímero com um dos membros da família TCF/LEF, esse complexo é capaz de

ativar os genes alvos da via Wnt (MOON *et al.*, 2002). Uma indução anormal na transativação mediada por β -catenina pode contribuir para a progressão de cânceres devido ao aumento na proliferação celular (BEN-ZE'EV, 1997; BEN-ZE'EV; GEIGER, 1998; MORIN, 1999; POLAKIS, 1999; BARKER; CLEVERS, 2000).

Os últimos resultados obtidos pelo nosso grupo de pesquisa complementam e confirmam os dados obtidos neste estudo sobre a importância de SF-1 na tumorigênese adrenocortical. Estes dados mostram que um aumento da expressão de SF-1 aumenta a proliferação, reduz a taxa de apoptose em células adrenocorticais humanas e produz tumor adrenocortical em camundongos (DOGHMAN *et al.*, 2007a) (quadro 4).

Recentemente, BOTRUGNO *et al.* (2004) demonstraram a participação de LRH-1, um homólogo de SF-1, no controle da proliferação celular por meio da indução da expressão das ciclinas da fase G1 (D1 e E1). Essa indução é potencializada pela interação com β -catenina.

A associação entre β -catenina e SF-1 já foi demonstrada em vários estudos (GUMMOW *et al.*, 2003; HOSSAIN; SAUNDERS *et al.*, 2003; JORDAN *et al.*, 2003), portanto, existe a possibilidade de que a via Wnt possa estar envolvida na indução na proliferação promovida por SF-1.

Existem evidências de que SF-1 esteja envolvido na proliferação celular. Estudando o crescimento compensatório da adrenal, em camundongos *SF-1*^{+/-}, BEUSCHLEIN *et al.*, (2002), observaram que a expressão de antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) na adrenal remanescente dos camundongos normais (*SF-1*^{+/+}) foi intensa, demonstrando resposta proliferativa importante, enquanto que nos camundongos haplo-insuficientes nenhuma resposta foi observada. RAMAYYA *et al.*, (1997), encontraram elevada expressão do gene *SF-1*, por hibridização *in situ*, nos nódulos proliferativos da adrenal, sugerindo que tenha um papel na regulação do crescimento e proliferação das células corticais adrenais. Assim, além do estímulo da esteroideogênese, os mecanismos acima referidos para o *SF-1* poderiam também ocorrer nos TCAs da faixa pediátrica do sul do Brasil.

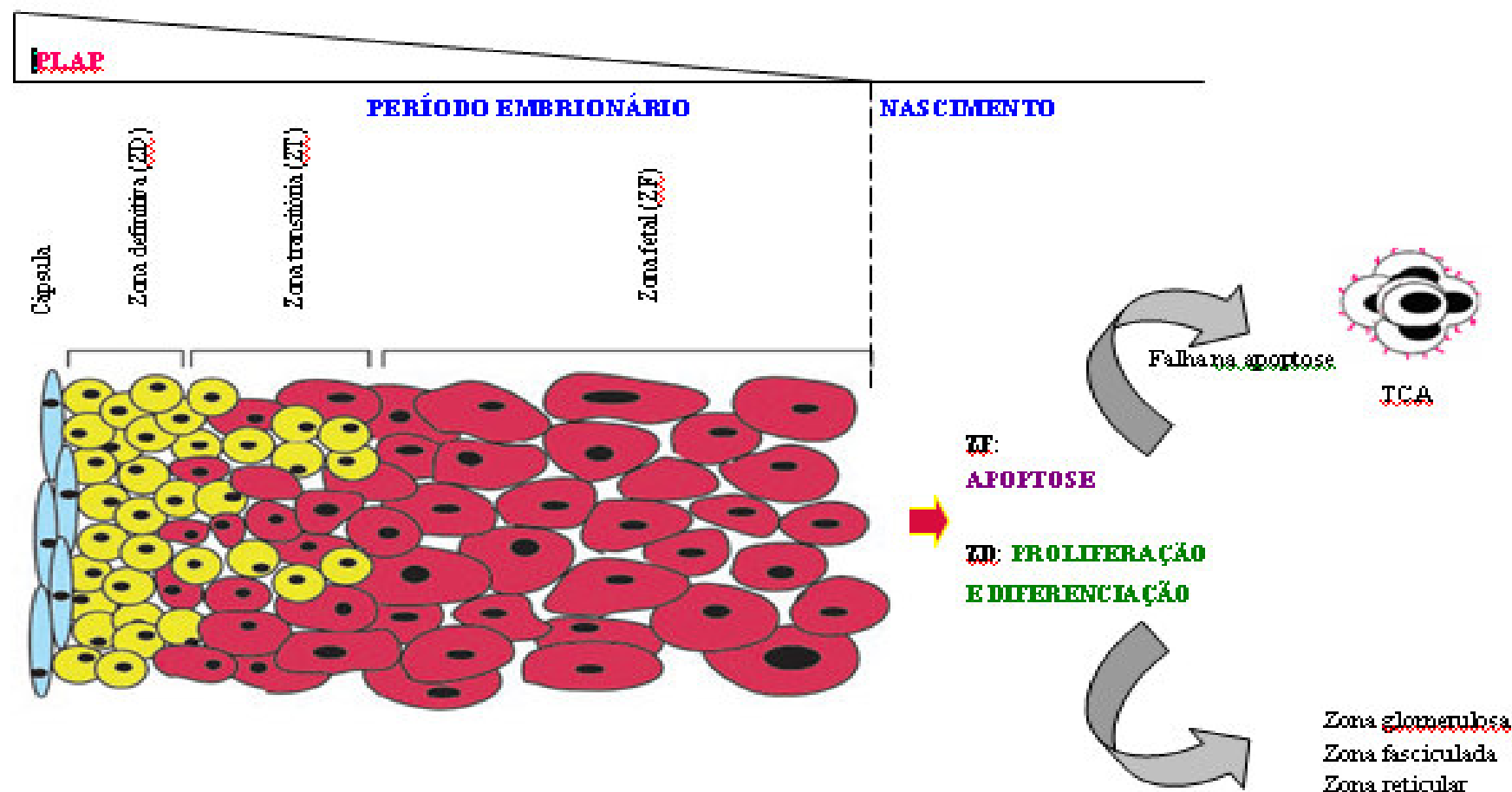
Camundongos *SF-1* heterozigotos apresentaram testículos e ovários menores quando comparados aos normais. A redução no tamanho das gônadas e da adrenal em camundongos *SF-1* +/- e a agenesia completa em -/- ilustram a atuação de *SF-1* de maneira dose-dependente (ACHERMANN *et al.*, 1999). Esse dado foi confirmado pela importância desse gene no crescimento celular adrenocortical não somente no desenvolvimento, mas também quando a deficiência de SF-1 é associada a fenótipos de insuficiência adrenal em camundongos e em humanos (LUO *et al.* 1994; SADOVSKY *et al.*, 1995; BLAND *et al.*, 2000; BEUSCHLEIN *et al.*, 2002; JAMESON, 2004).

Enquanto camundongos e humanos mostram profundas diferenças no desenvolvimento e na fisiologia, em ambas as espécies SF-1 parece possuir um papel crucial na patogenia dos tumores adrenocorticais (DOGHMAN *et al.*, 2007a). Com base em achados recentes e a descrição de ligantes lipídicos para SF-1 (KRYLOVA *et al.*, 2005; LI *et al.*, 2005), uma nova esperança para técnicas terapêuticas em TACs podem surgir futuramente envolvendo drogas antagonistas de SF-1.

Inicialmente, o maior desafio no uso dos siRNAs *in vivo* era a “entrega”, ou seja, levá-lo até o local em que deveria ter a função de silenciamento gênico e fazer com que ele estivesse intacto. Nos últimos anos, várias publicações demonstram métodos para resolver esses problemas como modificações na molécula de siRNA protegendo-a das endonucleases e novas formas de transfecção (injeção na veia da cauda com alta pressão – em camundongos) (SOUTSCHEK *et al.*, 2004; HULLIESKOVAN *et al.*, 2005; MORRISSEY *et al.*, 2005; SONG *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2005). Essas técnicas visam sua utilização, sistêmica ou específica a um tumor, dependendo do alvo terapêutico. No entanto, novos desafios surgem, como tornar as técnicas disponíveis atualmente, viáveis para o uso em humanos, estudar os efeitos tóxicos das doses de siRNAs, verificar as influências do uso de siRNAs sobre os processos fisiológicos normais (OHRT *et al.*, 2006; KUMAR *et al.*, 2007). Com a rapidez em que se desenvolvem os estudos sobre a terapia utilizando RNAi, espera-se que as limitações sejam superadas em breve, e que essa promissora tecnologia possa ser utilizada no tratamento de várias doenças, entre elas o câncer.

Com os resultados obtidos nesse trabalho é possível compreender um pouco mais sobre a biologia do TAC (figura 21; quadro 4). Nas células de TAC contendo a mutação R337H do *TP53*, a expressão de *SF-1* se encontra elevada e a atividade de PLAP/PLAP-símile está presente. Após a instalação das condições adequadas ao surgimento da célula cancerosa esta pode ser eliminada ou poderá se proliferar com velocidade variável. O córtex adrenal fetal desprovido do efeito inibidor de proliferação celular ou da perda do poder de induzir a morte celular, ao perder o alelo normal e ficar apenas com o mutante R337H, menos funcionante em pH proporcionalmente mais alcalino e/ou temperaturas supra-fisiológicas, permite o surgimento de célula cancerosa (DIGIAMMARINO *et al.*, 2002; HAINAUT, 2002) que mantém a expressão de PLAP/PLAP-símile e apresenta aumento de SF-1 (estimulando a proliferação celular). Esse tumor apresenta fenótipo da adrenal fetal, produzindo ou não excesso de hormônios. Outras alterações genéticas, como mutações no gene da α -inibina (LONGUI *et al.*, 2004), expressão aumentada do fator de crescimento e seu receptor (WEST *et al.*, 2007), podem estimular ou acelerar a proliferação celular e, em alguns casos, gerar um tumor maligno. Isto acontece com maior frequência durante o período em que é mais intensa a proliferação celular e deveria haver morte celular fisiológica e de células potencialmente cancerosas, no último trimestre da gestação.

FIGURA 21- HIPÓTESE PARA A FORMAÇÃO DO TCA EM CRIANÇAS



NOTA: Pelo processo natural de remodelamento do córtex adrenal a partir do nascimento, as células da zona definitiva se proliferam e diferenciam nas células que formam o córtex adrenal adulto, composto pelas três zonas: glomerulosa, fasciculada e reticular. Ao mesmo tempo, as células da zona fetal desaparecem por apoptose. No entanto, se esse remodelamento for defeituoso, as células na zona fetal não desaparecem por completo e podem vir a formar um TAC. Vários fatores estão envolvidos no aparecimento e desenvolvimento desse tumor, como a proteína PLAP expressa por alguns tipos de TAC, sugerindo uma origem embrionária para esse tumor.

QUADRO 4 – FATORES SUPRESSORES E FACILITADORES NA FORMAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO TAC EM CRIANÇAS

Aumento defator supressor ou facilitador de câncer	Mediadores	PROLIFERAÇÃO	APOPTOSE	Referências
p53	↑ p21	↓↓↓		
	↑ PUMA		↓↓	JEFFERS <i>et al.</i> , 2003
SF-1	↓ Nov		↑	DOGHMAN <i>et al.</i> , 2007
SF-1 + IGF-I		↑		SIRJANI <i>et al.</i> , 2007
Nov			↑	DOGHMAN <i>et al.</i> , 2007
IGF-II + IGF-I receptor		↑	↓	IMSUNGAN <i>et al.</i> , 2007
IGF-II		↑		LOGIE <i>et al.</i> , 1999
H19	↓↓ IGF-II	↓		GAO <i>et al.</i> , 2002
Sub-unidade α da inibina		↓		LONGUI <i>et al.</i> , 2004

NOTA: Em B: Os seguintes parâmetros (ordenados a partir do que julgamos o mais importante) são levados em consideração nesta hipótese: perda de função do gene *TP53* (herança do mutante R337H e perda somática do gene selvagem); instabilidade cromossômica ocasionado aumento de cópias do gene *SF-1*; perda de *imprinting* para o gene *IGF-II* (ROSATI *et al.* submetido); perda de sub-unidade α da inibina e outras alterações ainda desconhecidas. Esses fenômenos induzem à perda de fatores supressores e seus mediadores (em preto), em desequilíbrio com os fatores **facilitadores** e seus mediadores (em **vermelho**). Todo esse processo acontecendo no período crítico do desenvolvimento do córtex adrenal favorece o aparecimento do TCA. A permanência de células desse período poderá apresentar marcadores do desenvolvimento embrionário (como PLAP), indicando que o TCA é um tumor de origem embrionária.

CONCLUSÕES

A realização desta pesquisa permitiu a identificação de questões importantes para a elucidação de algumas etapas da etiopatogenia e carcinogênese responsáveis pelo aparecimento do TAC em crianças. Assim, concluiu-se que:

- 1 A atividade enzimática de PLAP/PLAP-símile foi superior à encontrada na adrenal normal (0,1 U/L) em 56,25% (9/16) dos TACs analisados;
- 2 Dentre as nove amostras com aumento na atividade enzimática de PLAP/PLAP-símile, verificou-se que seis (75%) apresentaram concomitante aumento na expressão de SF-1 e para uma amostra esse dado não estava disponível. Novos estudos são necessários para tentar elucidar qual o significado biológico desta relação;
- 3 O efeito de SF-1 sobre a proliferação celular requer que seu domínio de transativação AF-2 esteja intacto para que atue na ativação da proliferação celular e/ou redução da apoptose. Mutações no sítio de fosforilação de MAPK (S203A) e no LBD (A433W) de SF-1 promoveram redução
- 4 o parcial na atividade de SF-1 sobre a proliferação celular.
- 5 A redução na expressão de SF-1 ocasiona redução na taxa de incorporação de BrdU e aumento na quantidade de células H295R TUNEL positivas, indicando que a proteína em estudo estimula a proliferação celular e inibe a apoptose, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ABELEV, G. Alpha-fetoprotein in oncogenesis and its association with malignant tumors. **Advan Cancer Res**, v.14, p.295-358, 1971.

ACHERMANN, J. C.; MEEKS, J. J.; JAMESON, J. L. Phenotypic spectrum of mutations in DAX1 and SF-1. **Mol Cell Endocrinol**, v.185, p.17–25, 2001.

ACHERMANN, J. C. *et al.* Genetic causes of human reproductive disease. **J Clin Endocrinol Metab**, v.87, p.1829–1833, 2002.

ACHERMANN, J.C. *et al.* A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. **Nature Genetics**, v.22, n.2, p. 125-126, 1999.

AIGNER, A. Delivery Systems for the Direct Application of siRNAs to Induce RNA Interference (RNAi) In Vivo. **J Biomed Biotechnol**, v.2006(4): p.1-15, 2006.

ALPERT, E. *et al.* Human -fetoprotein. Isolation, characterization, and demonstration of microheterogeneity. **J Biol Chem**, v.247, p.3792-3798, 1972.

ANSARI, B. *et al.* *In situ* end-labelling detects DNA strand breaks in apoptosis and other physiological and pathological states. **J Pathol**, v.170, n.1, p.:1-8, 1993.

ARON, D.C.; TYRRELL, B. Glucocorticoids & adrenal androgens. In: GREENSPAN, F.S.; BAXTER, J.D. **Basic & Clinical Endocrinology**. Connecticut: Appleton & Lange, p. 307-346, 1994.

AUSTGEN, L.; BOWEN, R.A.; ROUGE, M. Pathophysiology of the endocrine system. Disponível em: <http://arbl.cvmbs.colostate.edu/> Acesso em 16 de outubro de 2006.

BAMBERGER, A.M. *et al.* Expression of steroidogenic factor-1 (SF-1) mRNA and protein in the human placenta. **Molecular Human Reproduction**, v.2, n.6, p.457-461, 1996.

BARBOSA, A. S. *et al.* Assessment of the role of transcript for GATA-4 as a marker of unfavorable outcome in human adrenocortical neoplasms. **BMC Endocr Disord**, v.4, n.1, p.3, 2004.

BARDONI, B. *et al.* A dosage sensitive locus at chromosome Xp21 is involved in male to female sex reversal. **Nature Genetics**, v. 7, n. 4, p. 497-501, 1994.

BARETTINO, D. *et al.* Characterization of the ligand-dependent transactivation domain of thyroid receptor. **EMBO J**, v.13, p.3039–3049, 1994.

BARKER, N.; CLEVERS, H. Catenins, Wnt signaling and cancer. **Bioessays**, v.22, n.11, p.961-965, 2000.

BATTIFORA, H. Immunocytochemistry of hormone receptors in routinely processed tissues. The new gold standard **Appl Immunohistochem**, v. 2, p.143, 1994.

BEN-ARIE, A. *et al.* Elevated serum alkaline phosphatase may enable early diagnosis of ovarian cancer. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol, Limerick**, v. 86, p. 69-71, 1999.

BERATIS, N. G.; SEEGRES, W.; HISRCHHORN, K. Properties of placental alkaline phosphatase. II. Interactions of fast-and slow-migrating components. **Biochem Genet**, v.5, p.367-377, 1971.

BEREK, J.S.; BAST, J. R. Ovarian cancer screening: the use of serial complementary tumor markers to improve sensitivity and specificity for early detection. **Cancer Suppl**, v. 75, n. 10, 1995.

BERGENSTAL D. M.; HERTZ, R.; LIPSETT, M. B.; MOY, R. H. Chemotherapy of adrenocortical cancer with *o,p'*-DDD. **Ann Inter Med**, v.53, p. 672-682, 1960.

BERNSTEIN, L; GURNEY, J. G. Carcinomas and other malignant epithelial neoplasms. In: RIES L. A. G.; SMITH, M. A.; GURNEY, J. G. *et al.* (Ed.). **Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States: SEER program 1975-1995**. Bethesda, MD, National Cancer Institute, SEER Program, 1999, p. 139-147

BEUSCHLEIN, F. *et al.* Clonal composition of human adrenocortical neoplasm. **Cancer Res**, v.54, p.4927-4932, 1994.

BEUSCHLEIN, F. *et al.* Steroidogenic factor-1 is essential for compensatory adrenal growth following unilateral adrenalectomy. **Endocrinology**, v. 143, n. 8, p. 3122-3135, 2002.

BIASON-LAUBER, A.; SCHOENLE, E.J. Apparently normal ovarian differentiation in a prepubertal girl with transcriptionally inactive steroidogenic factor-1 (NRA1/SF-1) and adrenocortical insufficiency. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 6, p. 1563-1568, 2000.

BIRCH, J. M. *et al.* Cancer phenotype correlates with constitutional *TP53* genotype in families with the Li-Fraumeni syndrome. **Oncogene**, v.17, p.1061-1068, 1998.

BIRCH, J. M.; BLAIR, V. Increase in childhood carcinomas in north-west England [Letter]. **Lancet**, v.1, p.833, 1988.

BLAND, M.L. *et al.* Haploinsufficiency of steroidogenic factor-1 in mice disrupts adrenal development leading to an impaired stress response. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, n. 26, p. 14488-14493. 2000.

BORUD, B. *et al.* The nuclear receptor coactivators p300/CBP/cointegrator-associated protein (p/CIP) and transcription intermediary factor 2 (TIF2) differentially regulate PKA-stimulated transcriptional activity of steroidogenic factor 1. **Mol Endocrinol**, v.16, p.757-773, 2002.

BOTRUGNO, O.A. *et al.* Synergy between LRH-1 and betacatenin induces G1 cyclin-mediated cell proliferation. **Molecular Cell**, v. 15, n. 4, p. 499-509, 2004.

BOURGUET, W., M. *et al.* Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXRa. **Nature**, v.375, p.377-382, 1995.

BOWEN, B. *et al.* The detection of DNA-binding proteins by protein blotting. **Nucleic Acids Res**, v.8, p.1-20, 1980.

BRAUNSTEIN, G. D. *et al.* Ectopic production of human chorionic gonadotropin by neoplasms. **Ann Internal Med**, v.78, p.39-45, 1973.

BRENNAN, M. F. Adrenocortical carcinoma, CA. **Cancer J Clin.**, v.37, p.348-365, 1987.

BRIERS, T. W. *et al.* Placentaire alkalische fosfatase als tumormarker. **Revue de l'association Belge des technologies de laboratoire**, v.13, p.127-141, 1986.

BROE, M. E. DE, NOUVEN, E. J., POLLET, D. E. Human placental alkaline phosphatase as a tumor marker. **Adv Clin Enzymol**, v.3, p.39-52, 1986.

BROWN, D. A., LONDON, E. Structure and function of sphingolipid- and cholesterol-rich membrane rafts. **J Biol Chem**, v.275, p.17221-17224, 2000.

BUGG, M. F. *et al.* Correlation of pathologic features with clinical outcome in pediatric adrenocortical neoplasia. A study of a Brazilian population. Brazilian Group for Treatment of Childhood Adrenocortical Tumors. **Am J Clin Pathol**, v.101, p.625-629, 1994.

BURRIS, T.P. *et al.* Identification of a putative steroidogenic factor-1 response element in the DAX1 promoter. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 214, n. 2, p. 576-581, 1995.

BUTIKOFER, P. *et al.* Phosphorylation of a major GPI-anchored surface protein of *Trypanosoma brucei* during transport to the plasma membrane. **J Cell Sci**, v.112, p.1785-1795, 1999.

CARTUN, R. W.; PEDERSEN, C. A. An immunocytochemical technique offering increased sensitivity and lowered cost with a streptavidin-horseradish peroxidase conjugate. **J Histochemol**, v.12, p.273, 1989.

CECH, T. R.; ZAUG, A. J.; GRABOWSKI, P. J. In vitro splicing of the ribosomal RNA precursor of *Tetrahymena*: involvement of a guanosine nucleotide in the excision of the intervening sequence. **Cell**, v.27, n.3 (2), p.487-496, 1982.

CHAN, J. R., STINSON, R. A. Dephosphorylation of phosphoproteins of human liver plasma membranes by endogenous and purified liver alkaline phosphatases. **J Biol Chem**, v.261, p.7635-7639, 1986.

CHUDLER, R. M.; KAY, R. Adrenocortical carcinoma in children. **Urol Clin North Am**, v.16, p.469-479, 1989.

CLEMENS, M. J. ; ELIA, A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. **J. Interferon Cytokine Res**, v.17, p.503-524, 1997.

COLLINGWOOD, T. N.. *et al.* A natural transactivation mutation in the thyroid hormone beta receptor: Impaired interaction with putative transcriptional mediators. **Proc Natl Acad Sci**, v.94, p.248–253, 1997.

CONNOLLY, J. L. *et al.* Principles of Cancer Pathology: Role of the Immunohistochemist. In: Bast, R. C.; Kufe, d. W.; Pollock, r. E. *et al.* (Ed.). **Cancer Medicine**. 5 ed. Canadá: BC Decker Inc., 2000. Disponível em <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=cancer%20medicine%20AND%20immunohistochemistry%20AND%2017149\[uid\]&rid=cmed.chapter.6534](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Search&db=books&doptcmdl=GenBookHL&term=cancer%20medicine%20AND%20immunohistochemistry%20AND%2017149[uid]&rid=cmed.chapter.6534)> Acesso em 10 nov. 2003.

CRAWFORD, P.A.; DORN, C.; SADOVSKY, Y. *et al.* Nuclear receptor DAX1 recruits nuclear receptor corepressor N-CoR to steroidogenic factor 1. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 5, p. 2949-5629, 1998.

CROOTE, G DE. *et al.* Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. **Clin Chem**, v.29, p.115-119, 1983.

DABARE, A. *et al.* Profile of placental alkaline phosphatase expression in human malignancies: effect of tumour cell activation on alkaline phosphatase expression. **Urol Int**, v.63, p.168-174, 1999.

DAMLE, S. R. *et al.* Occurrence of heat-stable Regan type of alkaline phosphatase in hematopoietic tumors. **Int J Cancer**, v.24, p.398-401, 1979.

DANIELIAN, P. S. *et al.* Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors. **EMBO J**, v.11, p.1025–1033, 1992.

DE BROE, M.E.; POLLET, D.E. Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. **Clin Chem**, v. 34, n.10, p. 1995-1999, 1988.

DE GROOTE. *et al.* Use of monoclonal antibodies to detect human placental alkaline phosphatase. **Clin Chem**, v.29, p.115-119, 1983.

DEBORE, M. E., POLLET, D. E. Multicenter evaluation of human placental alkaline phosphatase as a possible tumor-associated antigen in serum. **Clin Chem**, v.34, p.1995-1999, 1988.

DELMAS, V. *et al.* Induction of CREM activator proteins in spermatids: down-stream targets and implications for haploid germ cell differentiation. **Mol Endocrinol**, v.7, n.11, p.1502-14, 1993.

DESCLOZEAUX, M. *et al.* Phosphorylation and intramolecular stabilization of the ligand binding domain in the nuclear receptor steroidogenic factor 1. **Mol Cell Biol**, v.22, n.20, p 7193–7203, 2002.

DIGIAMMARINO, E. L. *et al.* A novel mechanism of tumorigenesis involving pH-dependent destabilization of a mutant p53 tetramer. **Nat Struct Biol**, v.9, n.1, p.12-6, 2002.

DOELLGAST, G. H. *et al.* Studies on human placental alkaline phosphatase. Purification by immunoabsorption and comparison of the “A” e “B” forms of the enzyme. **Biochem Biophys Acta**, v.484, p.59-78, 1977.

DOELLGAST, G. H., FISHMAN, W. H. L-Leucine, a specific inhibitor of a rate human placental alkaline phosphatase phenotype. **Nature (London)**, v.259, p.49-51, 1976.

DOELLGAST, G. J. An hypothesis on the evolution of human placental alkaline phosphatase. **Prog Clin Biol Res**, v.166, p.25-46, 1984.

DOELLGAST, G. J., BENIRSCHKE, K. Placental alkaline phosphatase in Hominidae. **Nature**, v.280, p.601-602, 1979.

DOGHMAN. M *et al.* Increased steroidogenic factor-1 dosage triggers adrenocortical cell proliferation and cancer. **Mol Endocrinol**. v.21, n.12, p.2968-2987, 2007a.

DOGHMAN. M. *et al.* NOV/CCN3 is a selective pro-apoptotic factor for adrenocortical cells downregulated in childhood adrenocortical tumors. **Clin Endocrinol Metab**, 2007b

DURAND, B. *et al.* Activation function 2 (AF-2) of retinoic acidreceptor and 9-cis retinoic acid receptor: Presence of a conservedautonomous constitutive activation domain and influenceof the nature of the response element on AF-2 activity. **EMBO J**, v.13, p.5370–5382, 1994.

DURBIN, H. *et al.* Production of monoclonal antibodies to placental alkaline phosphatase: preliminary characterisation includes identification of one antibody reactive with routinely fixed histological preparations. **Int J Cancer**, suppl.2, p.50-58, 1988.

EASWARAN, V. *et al.* Cross-regulation of beta-catenin-LEF/TCF and retinoid signaling pathways. **Curr Biol**, v.9, n.23, p.1415-1418, 1999.

EERDEKENS, M. W. *et al.* Detection and immunohistochemical localization of hPLAP and CA 125 in sera and tissues of patients with ovarian, non-ovarian tumors, and liver disorders. **Proc Protides Biol Fluids**, v.33, p.683-686, 1985.

EISENHABER, B.; BORK, P.; EISENHABER, F. Post-translational GPI lipid anchor modification of proteins in kingdoms of life: analysis of protein sequence data from complete genomes. **Protein Eng**, v.14, p.17-25, 2001.

ELBASHIR, S. M. ; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21-and 22-nucleotide RNAs. **Genes & Development**, v.15, p.188–200, 2000.

ELBASHIR, S. M. *et al.* Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. **Nature**, v.411, 494-498, 2001.

ELBASHIR, S. M.; HARBOTH, J.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. **Methods**, v.26, p.199-213, 2002.

ERICKSON, P. F.; MINIER, L. N.; LASHER, R. S. Quantitative electrophoretic transfer of polypeptides from SDS polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: a method for their re-use in immunoautoradiographic detection of antigens. **J Immunol Methods**, v.51, p.241-249, 1982.

ERIKSSON, H. J. C. *et al.* Characterization of human placental alkaline phosphatase by activity and protein assays, capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. **J Chromatography B**, v.755, p.311-319, 2001.

EVANS, S. C.; LOZANO, G. The Li-Fraumeni syndrome: an inherited susceptibility to cancer. **Mol Med Today**, v. 3, p.390-395, 1997.

EZRA, E.; BLACHER, R.; UDENTFRIEND, S. Purification and partial sequencing of human placental alkaline phosphatase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.116, n.3, p.1076-1083, 1983.

FANG, V. S. Cytotoxic activity of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane (mitotane) and its analogs on feminizing adrenal neoplastic cells in culture. **Cancer Res.**, v. 39, n.1, p.139-45, 1979.

FENG, W. *et al.* Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. **Science**, v.280, p.1747–1750, 1998.

FERGUSON, M. A. J. The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J Cell Sci**, v.112, p.2799-2809, 1999.

FERGUSON, M. A. J.; WILLIAMS, A. F. Cell-surface anchoring of proteins via glycosyl-phosphatidylinositol structures. **Annu Rev Biochem**, v.57, p.285-320, 1988.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline *TP53* R337H mutation. **J Med Genet**, v.43, n.1, p.91-96, 2006.

FIGUEIREDO, B. C.; PIANOVSKI, M. A.; CUSTÓDIO, G. Tumorigêneses do córtex adrenal. In: MONTE, O. *et al.* (Ed.) **Endocrinologia para o Pediatra**. 3. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2006. p.941-953.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Amplification of the steroidogenic factor 1 gene in childhood adrenocortical tumors. **J Clin Endocrin Metab**, v. 90, n. 2, p. 615-619, 2005.

FIGUEIREDO, B. C.; MOURA, J. F. Fisiologia da córtex adrenal humana. In: FIGUEIREDO, B.C.; SANDRINI, R.; RIBEIRO, R. C.; LACERDA, L. de. (Ed.). **Tumores de Córtex Adrenal: Fisiologia, Clínica, Epidemiologia, Patologia, Genética e Tratamento**, Curitiba: Serviço de Infomática da Educação, UFPR, 2003. 1 CD-ROM

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Amplification of 9q34 in childhood adrenocortical tumors: a specific feature unrelated to ethnic origin or living conditions. **Braz J Med Biol Res**, v.33, n.10, p.1217-1224, 2000.

FIGUEIREDO, B. C. *et al.* Comparative genomic hybridization analysis of adrenocortical tumors of childhood. **J Clin Endocrinol Metab**, v.84, n.3, p.1116-1121, 1999.

FIRE, A. *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p.806–811, 1998.

FISHMAN, L. *et al.* Developmental phase-specific alkaline phosphatase isoenzyme of human placenta and occurrence in human cancer. **Cancer Res**, v.36, p.2269-2273, 1976.

FISHMAN, W. H. *et al.* A serum alkaline phosphatase isoenzyme of human neoplastic cell origin. **Cancer Res**, v.28, p.150-154, 1968b.

FISHMAN, W. H. *et al.* Quantitation of placental isoenzyme of alkaline phosphatase in pregnancy sera. **Enzymologia**, v.34, p.317-321, 1968a.

FISHMAN, W. H. Oncotrophoblast gene expression: placental alkaline phosphatase. **Adv Cancer Res**, v.48, p.1-35, 1987.

FISHMAN, W. H. Perspective on alkaline phosphatase isoenzymes. **Amer J Med**, v.56, p.617-650, 1974.

FISKEN, J.; LEONARD, R.C.; SHAW, G. *et al.* Serum placental-símile alkaline phosphatase (PLAP): a novel combined enzyme linked Immunoassay for monitoring ovarian cancer. **J Clin Phatol, London**, v. 42, p. 40-45, 1989.

FISKEN, J. *et al.* Serum placental-símile alkaline phosphatase (PLAP): a novel combined enzyme linked Immunoassay for monitoring ovarian cancer. **J Clin Phatol, London**, v. 42, p. 40-45, 1989.

FOWKES, R. C. *et al.*, Steroidogenic factor-1 and the gonadotrope-specific element enhance basal and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-stimulated transcription of the human glycoprotein hormone α -subunit gene in gonadotropes. **Mol Endocrinol**, v.17, n.11, p.2177-2188, 2003.

FOWKES, R.C.; BURRIN, J.M. Steroidogenic factor-1: a key regulator of gonadotroph gene expression. **J Endocrinol**, v. 177, n. 3, p. 345-350, 2003.

FRANKE, W. W. *et al.* Isolation and characterization of desmosome-associated tonofilaments from rat intestinal brush border. **J Cell Biol**, v.90, n.1, p.116-127, 1981.

GARCIA, R. L.; COLTRERA, M. D.; GOWN, A. M. Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed, embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. **Am J Pathol**, v.134, p.733-739, 1989.

GAZDAR, A. F. *et al.* Establishment and characterization of a human adrenocortical carcinoma cell line that expresses multiple pathways of steroid biosynthesis. **Cancer Res**, v.50, p.5488-5496, 1990.

GERDES, J. *et al.* Growth fractions in breast cancers determined in situ with monoclonal antibody Ki-67. **J Clin Pathol**, v.39, p.977-980, 1986.

GHOSH, N. K.; FISHMAN, W. H. Purification and properties of molecular-weight variants of human placental alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.108, p.779-792, 1968.

GITLIN, D., KITZES, J., BOSEMAN, M. Cellular distribution of serum α -fetoproteins in organs of the fetal rat. **Nature**, v.215, p.534, 1967.

GOLDSTEIN, D. J., HARRIS, H. Human placental alkaline phosphatase differs from that of other species. **Nature**, v.280, p.602-605, 1979.

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. Evolution of alkaline phosphatases in primates. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.79, n.3, p.879-883, 1982(a).

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. Expression of alkaline phosphatase loci in mammalian tissues. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.77, n.5, p.2875-2860, 1980.

GOLDSTEIN, D. J., ROGERS, C. E., HARRIS, H. A search for trace expression of placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissues: demonstration of its occurrence in lung, cervix, testis and thymus. **Clin Chim Acta**, v.125, p.63-75, 1982(b).

GOTTLIEB, A. J.; SUSSMAN, H.H., Human placental alkaline phosphatase: molecular weight and subunit structure. **Biochem Biophys Acta**, v.160, n.2, p.167, 1968.

GREENE, P. J.; SUSSMAN, H. H. Structural comparison of ectopic and normal placental alkaline phosphatase. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.70, n.10, p.2936, 1973.

GRIFFITH, O. H.; VOLWERK, J. J.; CUPE, A. Phosphatidylinositol-specific phospholipases C from *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis*. **Methods Enzymol**, v.197, p.493-502, 1991.

GUERRIER-TAKADA, C. *et al.* The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. **Cell**, v.35(3 pt 2), p.849–857, 1983.

GUMMOW, B. M. ; WINNAY, J. N. ; HAMMER, G. D. Convergence of Wnt signaling and steroidogenic factor-1 (SF-1) on transcription of the rat inhibin alpha gene. **J Biol Chem**, v.278, p.26572– 26579, 2003.

GURNEY, J. G. *et al.* Incidence of cancer on children in the United States. Sex-, race-, and 1-year age-specific rates by histologic type. **Cancer**, v.75, p.2186-2195, 1995.

HABUCHI, T. *et al.* Detailed deletion mapping of chromosome 9q in bladder cancer: evidence for two tumour suppressor loci. **Oncogene**, v.11, p.1671-1674, 1995.

HAIJE, W.G.; VAN DRIEL, J.; VAN DER BURG, M.E.L. Catalytic and immunologic activities of placental-like alkaline phosphatase in clinical studies. The value of PLAP in follow-up of ovarian cancer. **Clin Chim Acta**, v. 165, p. 165-175, 1987.

HAINAUT, P. Tumor specific mutations in p53: The acid test. **Nature Medicine**, v.8, p.21-23, 2002.

HAMILTON-DUTOIT, S., LOU, H., PALLESEN, G. The expression of placental alkaline phosphatases (PLAP) and PLAP-like enzymes in normal and neoplastic human tissues. An immunohistological survey using monoclonal antibody. **APMIS**, v.98, p.797-811, 1990.

HAMMER, G. D., PARKER, K. L. & SCHIMMER, B.P. Minireview: Transcriptional regulation of adrenocortical development. **Endocrinology**, v.146, p.1018-1024, 2005.

HAMMER, G. D.; INGRAHAM, H. A. Steroidogenic factor-1: its role in endocrine organ development and differentiation. **Front Neuroendocrinol**, v.20, n.3, p.199-223, 1999.

HAMMER, G. D. *et al.* Phosphorylation of the nuclear receptor SF-1 modulates cofactor recruitment: integration of hormone signaling in reproduction and stress. **Mol Cell** 3:521–526, 1999.

HANADA, K., NISHIJIMA, M., AKAMATSY, Y.; PAGANO, R. E. Both sphingolipids and cholesterol participate in the detergent insolubility of alkaline phosphatase, a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein, in mammalian membranes. **J Biol Chem**, v.270, n.11, p.6254-6260, 1995.

HANNON, G. J. RNA interference. **Nature (London)**, v.418, 244-251, 2002.

HARMENBERG, U. *et al* Significance of alkaline phosphatase isozymes in the monitoring of patients with colorectal carcinoma. **Tumour Biol**, v.10, n.5, p.225-31, 1989.

HARRIS, H. Multilocus enzyme systems and the evolution of gene expression: the alkaline phosphatases as a model example. **Harvey Lect**, v.76, p.95-124, 1980-81.

HARRIS, H. The human alkaline phosphatases: what we know and what we don't know. **Clin Chim Acta**, v.186, n.2, p.133-150, 1989.

HARRIS, H.; HOPKINSON, D. A.; ROBSON, E. B. The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. **Ann Hum Genet**, v.37, n.3, p.237-253, 1974.

HART, M. M.; REAGAN, R. L.; ADAMSON, R. H. The effect of isomers of DDD on the ACTH-induced steroid output, histology and ultrastructure of the dog adrenal cortex. **Toxicol Appl Pharmacol**, v.24, p.101-113, 1973.

HARTLEY, A. L. *et al.* Adrenal cortical tumours: epidemiological and familial aspects. **Arch Dis Child**, v. 62, p.683-689, 1987.

HATANO, O. *et al.* Identical origin of adrenal cortex and gonad revealed by expression profiles of Ad4BP/SF-1. **Genes Cells**, v.1, p.663-671, 1996.

HATANO, O. *et al.* Sex-dependent expression of a transcription factor, Ad4BP, regulating steroidogenic P-450 genes in the gonads during prenatal and postnatal rat development. **Development**, v. 120, n. 10, p. 2787-2797, 1994.

HAYMAN, E. G. *et al.* Cell attachment on replicas of SDS polyacrylamide gels reveals two adhesive plasma proteins. **J. Cell Biol**, v.95, n.1, p.20-23, 1982.

HENRY, I. *et al.* Molecular definition of the 11p15.5 region involved in Beckwith-Wiedemann syndrome and probably in predisposition of adrenocortical carcinoma. **Hum Genet**, v.81, p.273-277, 1989.

HENTHORN, P. S. *et al.* Products of two common alleles at the locus for human placental alkaline phosphatase differ by seven amino acids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.83, n.15, p.5597-5601, 1986.

HENTTU, P. M. A.; KALKHOVEN, E.; PARKER, M. G. AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. **Mol Cell Biol**, v.17, p.1832-1839, 1997.

HIRANO, K. *et al.* Specific assays for human alkaline phosphatase isoenzymes. **Clin Chim Acta**, v.166, p.263-273, 1987.

HOGAN, T. F. *et al.* o,p'-DDD (mitotane) therapy of adrenal cortical carcinoma. **Cancer**, v. 42, p.2177-2181, 1978.

HOLLSTEIN, M. *et al.* Somatic point mutations in the p53 gene of human tumors and cell lines: updated compilation. **Nucl Acids Res**, v.24, p.141-146, 1996.

HONDA, S. *et al.* Ad4BP regulating steroidogenic P-450 Gene is a member of the steroid receptor superfamily. **J Biol Chem**, v. 268, n.10, p. 7494-7502, 1993.

HOOPER, N. M. Glycosyl-phosphatidylinositol anchored membrane enzymes. **Clin Chim Acta**, v.266, n.1, p.3-12, 1997.

HORNIGOLD, N. *et al.* Mutation of the 9q34 gene TSC1 in sporadic bladder cancer. **Oncogene**, v.18, p.2657-2661, 1999.

HOSSAIN, A. ; SAUNDERS, G. F. Synergistic cooperation between the beta-catenin signaling pathway and steroidogenic factor 1 in the activation of the Mullerian inhibiting substance type II receptor. **J Biol Chem**, v.278, p.26511-26516, 2003.

HOYLAERTS, M. F., MANES, T., MILLÁN, J. L. Molecular mechanism of uncompetitive inhibition of human placental and germ-cell alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.286, pt.1, p.23-30, 1992.

HOYLE, C. *et al.* DAX1 expression is dependent on steroidogenic factor 1 in the developing gonad. **Mol Endocrinol**, v. 16, n. 4, p. 747-756, 2002.

HU, M. C.; HSU, N. C.; PAI, C. I.; Wang, C. K. *et al.* Functions of the upstream and proximal steroidogenic factor 1 (SF-1)-binding sites in the CYP11A1 promoter in basal transcription and hormonal response. **Mol Endocrinol**, v.15, p.812–818, 2001.

HUANG, K. S.; LI, S.; LOW, M. G. Glycosylphosphatidylinositol-specific phospholipase D. **Methods Enzymol**, v.197, p.567-575, 1991.

HU-LIESKOVAN, S. *et al.* Sequence-specific knockdown of EWS-FLI1 by targeted, nonviral delivery of small interfering RNA inhibits tumor growth in a murine model of metastatic Ewing's sarcoma. **Cancer Res**, n.65, p.8984–8992, 2005

HUMMER, C., MILLÁN, J. L. Gly429 is the major determinant of uncompetitive inhibition of human germ cell alkaline phosphatase by L-leucine. **Biochem**, v.274, pt 1, p.91-95, 1991.

HUTTER, A. M. Jr.; KAUHOE, D. E. Adrenal cortical carcinoma. **Am J Med**, v.4, p.576, 1966.

HUVOS A. G. *et al.* Adrenal cortical carcinoma. Clinicopathologic study of 34 cases. **Cancer**, v.25, p.354-361, 1970.

IKEDA, Y. *et al.* Comparative localization of DAX1 and Ad4BP/SF-1 during development of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis suggests their closely related and distinct functions. **Developmental Dynamics**, v. 220, n. 4, p. 363-376, 2001.

IKEDA, Y.; LUO, X.; ABBUD, R *et al.* The nuclear receptor steroidogenic factor 1 is essential for the formation of the ventromedial hypothalamic nucleus. **Mol Endocrinol**, v. 9, n. 4, p. 478-486, 1995.

IKEDA, Y.; SHEN, W. H.; INGRAHAM, H. A. *et al.* Developmental expression of mouse steroidogenic factor-1, an essential regulator of the steroid hydroxylases. **Mol Endocrinol**, v.8, p.654-662, 1994.

IKEDA, Y. *et al.* Characterization of the mouse *FTZ-F1* gene, which encodes a key regulator of steroid hydroxylase gene expression. **Mol Endocrinol**, v. 7, n. 7, p. 852-860, 1993.

IKEZAWA, H. *et al.* Studies on phosphatidylinositol phosphodiesterase (phospholipase C type) of *Bacillus cereus*. I. purification, properties and phosphatase-releasing activity. **Biochem Biophys Acta**, v.450, n.2, p.154-164, 1976.

IND, T. *et al.* Serum concentrations of cancer antigen 126, placental alkaline phosphatase, cancer-associated serum antigen and free beta human chorionic gonadotrophin as prognostic markers for epithelial ovarian cancer. **Br J Obstetr Gynaecol**, v. 104, p. 1024-1029, 1997.

INIGUEZ-LLUHI, J. A.; PEARCE, D. A common motif within the negative regulatory regions of multiple factors inhibits their transcriptional synergy. **Mol Cell Biol**, v.20, p.6040-6050, 2000.

ITO, F.; CHOU, J. Y. Biosynthesis and processing of placental alkaline phosphatase. **Biochem Biophys Res Commun**, v.111, n.2, p.611-618, 1983.

ITO, K. *et al.* High expression of the CD30 molecule in human decidual cells. **Am J Pathol**, v.145, p.276-280., 1994.

ITO, M. *et al.* Synergistic activation of the inhibin α -promoter by steroidogenic factor-1 and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate. **Mol Endocrinol**, v.14, p.66-81, 2000.

ITO, M.; YU, R.; JAMESON, J. L. DAX1 inhibits SF-1-mediated transactivation via a carboxy-terminal domain that is deleted in adrenal hypoplasia congenita. **Mol Cell Biol**, v. 17, n. 3, p. 1746-1483, 1997.

JACOB, A. L.; LUND, J. Mutations in the activation function-2 core domain of steroidogenic factor-1 dominantly suppresses PKA-dependent transactivation of the bovine CYP17 gene. **J Biol Chem**, v.273, p.13391-13394, 1998.

JACOB, B., BAGSHAW, K. D. A radioimmunoassay for placental-like alkaline phosphatase. **Cancer Res**, v.32, p.2413-2420, 1972.

JAMES, L. A. *et al.* Highly consistent genetic alterations in childhood adrenocortical tumours detected by comparative genomic hybridization. **Br J Cancer**, v.81, p.300-304, 1999.

JAMESON, J. L. Editorial: Of mice and men: the tale of steroidogenic factor-1. **J Clin Endocrin Metab**, v.89, p.5927-5929, 2004.

JEMMERSON, R. *et al.* Characterization of the placental alkaline phosphatase-like (Nagao) isozyme on the surface of A431 human epidermoid carcinoma cells. **Cancer Res**, v.45, n.1, p.282-287, 1985.

JEMMERSON, R.; STIGBRAND, T. Monoclonal antibodies block the trypsin cleavage site on human placental alkaline phosphatase. **FEBS Lett**, v.173, n.2, p.357-359, 1984.

JENSEN, S.; GASSAMA, M. P.; HEIDMANN, T. Taming of transposable elements by homology-dependent gene silencing. **Nat Genet**, v.21, p.209–212, 1999.

JOHNSON, P. M. *et al.* The human syncytiotrophoblast microvillous plasma membrane. In: Gkeicher, N., ed. **Reproductive immunology**, New York: Alan R. Liss Inc., p.77-91, 1981.

JORDAN, B. K. *et al.* Wnt4 overexpression disrupts normal testicular vasculature and inhibits testosterone synthesis by repressing steroidogenic factor 1/beta-catenin synergy. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 100, p.10866–10871, 2003.

JURUTKA, P. W. *et al.* Mutations in the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor identifying carboxy-terminal amino acids required for the transcriptional activation that are functionally dissociated from hormone binding, heterodimeric DNA binding, and interaction with basal transcription factor IIb, in vitro. **J Biol Chem**, v.272, p.4592–14599, 1997.

KAM, W. *et al.* Cloning, sequencing, and chromosomal localization of human term placental alkaline phosphatase cDNA. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.82, n. 24, p.8715-8719, 1985.

KAMINSKY, N.; LUSE, S.; HARTROFT, P. Ultrastructure of adrenal cortex of the dog during treatment with DDD. **J Natl Cancer Inst**, v.29, p.265-275, 1951.

KANG, J. O. *et al.* Placental-type alkaline phosphatase in peritoneal fluid of women with endometriosis. **Clin Chim Acta**, v.186, p.285-294, 1989.

KATO, S. *et al.* Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution missense mutation analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.100, p.8424-8429, 2003.

KAUDEWITZ, P. *et al.* Atypical cells in lymphomatoid papulosis express the Hodgkin cell-associated antigen Ki-1. **J. Investing Dermatol**, v. 86, p.350-354, 1986.

KAUFMANN, S. H.; EWING, C. M.; SHAPER, J. H. The Erasable Western Blot. **Anal Biochem**, v.161, p.89-95, 1987.

KAWABE, K. *et al.* DAX1 as one of the target genes of Ad4BP/SF-1. **Mol Endocrinol**, v. 13, n. 8, p. 1267-1284, 1999.

KEEGAN, C. E.; HAMMER, G. D. Recent insights into organogenesis of the adrenal cortex. **Trends Endocrinol Metab**, v.13, p.200-208, 2002.

KEMP, K. *et al.* Increased levels of soluble CD30 in plasma of patients with *Plasmodium falciparum* malaria. **Clin Diagn Lab Immunol**, v.9, n.3, p. 720-722, 2002.

KENNERDELL, J. R.; CARTHEW, R. W. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. **Cell**, v.95, p.1017-1026, 1998.

KETTING, R. F. *et al.* Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. **Cell**, v.99, p.133-141, 1999.

KIIVERI, S. *et al.* Transcription factors GATA-6, SF-1, and cell proliferation in human adrenocortical tumors. **Mol Cell Endocrinol**, v.233, p.47-56, 2005.

KING, D. R.; LACK, E. E. Adrenal cortical carcinoma: a clinical and pathologic study of 49 cases. **Cancer**, v.44, p.239-244, 1979.

KJELLMAN, M. *et al.* Genetic aberrations in adrenocortical tumours detected using comparative genomic hybridization correlate with tumor size and malignancy. **Cancer Res**, v.56, p.4219-4223, 1996.

KLEIHUES P. *et al.* Tumors associated with p53 germline mutations: a synopsis of 91 families. **Am J Pathol**, v.150, p.1-13, 1997.

KNOLL, B. J.; ROTHBLUM, K. N.; LONGLEY, M. A. Two gene duplication events in the evolution of the human heat-stable alkaline phosphatases. **Gene (Amst)**, v.60, n.2-3, p.267-276, 1987.

KNOLL, B. J.; ROTHBLUM, K. N.; LONGLEY, M. Nucleotide sequence of the human placental alkaline phosphatase gene. **J Biol Chem**, v.263, p.12020-12027, 1988.

KOCH, C. A.; PACAK, K. E CHROUSOS, G. P. The molecular pathogenesis of hereditary and sporadic adrenocortical and adrenomedullary tumors. **J Clin Endocrin Metab**, v. 87, p.5367-5384, 2002.

KOSHIDA, K. *et al.* Significance of placental alkaline phosphatase (PLAP) in the monitoring of patients with seminoma. **Br J Urol**, v.77, n.1, p.138-142, 1996.

KOSHIDA, K.; WAHREN, B. Placental-like alkaline phosphatase in seminoma. **Urol Res**, v.18, n.2, p.87-92, 1990.

KOSMAS, C., KALOFONOS, H., HIRD, V., EPENETOS, A. Monoclonal antibody targeting of ovarian carcinoma. **Oncology**, v.55, p.435-446, 1998.

KOYAMA, I.; STENDALH, U.; STIGBRAND, T. Placental-like alkaline phosphatase from ovary and ascites of a patient with a malignant ovary tumour. **Clin Chim Acta**, v.186, p.295-300, 1989.

KRUGER, K. *et al.* Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. **Cell**, v.31, n.1, p.147-157, 1982.

KRYLOVA, I. N. *et al.* Structural analyses reveal phosphatidyl inositols as ligands for the NR5 orphan receptors SF-1 and LRH-1. **Cell**, v.120, p.343-355, 2005.

KUMAR, L. D.; CLARKE, A.R. Gene manipulation through the use of small interfering RNA (siRNA): From *in vitro* to *in vivo* applications. **Adv Drug Deliv Rev**, v.doi:10.1016/j.addr.2007.03.009

KUMAR, R.; THOMPSON, E. B. The structure of the nuclear hormone receptors. **Steroids**, v.64, p.310–319, 1999.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LALA, D.S.; RICE, D.A., PARKER, K.L. Steroidogenic factor I, a key regulator of steroidogenic enzyme expression, is the mouse homolog of *fushi tarazu*-factor I. **Mol Endocrinol**, v. 6, n. 8, p. 1249-1258, 1992.

LALLI, E. E SASSONE-CORSI, P. DAX-1, an unusual orphan receptor at the crossroads of steroidogenic function and sexual differentiation. **Mol Endocrinol**, v.17, p.1445-1453, 2003.

LALLI, E. *et al.* Orphan receptor DAX1 is a shuttling RNA binding protein associated to polyribosomes via messenger RNA. **Mol. Cell. Biol**, v.20, p.4910-4921, 2000.

LALLI, E. *et al.* DAX1 blocks steroid production at multiple levels. **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4237–4243, 1998.

LALLI, E. *et al.* A transcriptional silencing domain in DAX1 whose mutation causes adrenal hypoplasia congenita. **Mol Endocrinol**, v. 11, n. 13, p. 1950-1960, 1997.

LATRONICO, A. C.; CHROUSOS, G. P. Extensive personal experience: adrenocortical tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v.82, p.1317-1324, 1997.

LE DU, M. H. *et al.* Crystal structure of alkaline phosphatase from human placenta at 1.8Å resolution. **J Biol Chem**, v.276, p.9158-9165, 2001.

LEE, C. Y. *et al.* Analysis of sperm antigens by sodium dodecyl sulfate gel/protein blot radioimmunobinding method. **Anal Biochem**, v.123, n.1, p.14-22, 1982.

LEFEVRE, M. *et al.* Adrenal cortical carcinoma in children: 42 patients treated from 1958 to 1980 at Villejuif. In: HUPHERY, G. B.; GRINDLEY, G. B.; DEHNER, L. P.

(Ed.), **Adrenal and Endocrine Neoplasia**, Boston: Martinus Nijhoff Publishers, p.265-276, 1984.

LEHTO, M. T.; SHAROM, F. J. Proximity of the protein moiety of a GPI-Anchored protein to the membrane surface: a FRET study. **Biochem**, v.41, p.8368-8376, 2002.

LEHTO, M. T.; SHAROM, F. J. Release of the glycosylphosphatidylinositol-anchored enzyme ecto-5'-nucleotidase by phospholipase C: catalytic activation and modulation by the lipid bilayer. **Biochem J**, v.332, pt.1, p.101-109, 1998.

LENG, X. H.; TSAI, S. Y.; OMALLEY, B. W.; TSAI, M. J. Liganddependent conformational changes in thyroid hormone and retinoic acid receptors are potentially enhanced by heterodimerization with retinoic X receptor. **J Steroid Biol Mol Biol**, v. 46, p.643-661, 1993.

LI, L. A.; LALA, D.; CHUNG, B. C: Function of steroidogenic factor 1 (SF1) ligand-binding domain in gene activation and interaction with AP1. **Biochem Biophys Res Commun**, v.250, p.318-320, 1998.

LI, Y. *et al.* Crystallographic identification and functional characterization of phospholipids as ligands for the orphan nuclear receptor steroidogenic factor-1. **Mol Cell**, v.17, p.491-502, 2005.

LIEBMANN, C. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. **Cell Signal**, v.13, p.777-785, 2001.

LIN, J.; TERESKY, A.K.; LEVINE, A. Two critical hydrophobic amino acids in the N-terminal domain of the p53 protein are required for the gain of function phenotypes of human p53 mutants. **Oncogene**, v.10, p.2387-2390, 1995.

LIN, S. R.; LEE, Y. J.; TSAI, J. H. Mutations of p53 gene in human functional adrenal neoplasm. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 78, p.483-491, 1994.

LISANTI, M. P. *et al.* Polarized apical distribution of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored proteins in a renal epithelial cell line. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.85, n.24, p.9557-9561, 1988.

LIU, Z. ; SIMPSON, E. R. Steroidogenic factor 1 (SF-1) and SP1 are required for regulation of bovine CYP11A gene expression in bovine luteal cells and adrenal Y1 cells. **Mol Endocrinol**, v.11, p.127–137, 1997.

LONGUI, C.A. *et al.* Inhibin alpha-subunit (*INH*A) gene and locus changes in paediatric adrenocortical tumours from *TP53* R337H mutation heterozygote carriers. **J Med Genet**, v. 41, n. 5, p. 354-359, 2004.

LOOSE, J. H.; DAMJANOV, I.; HARRIS, H. Identity of the neoplastic alkaline phosphatase as revealed with monoclonal antibodies to the placental form of the enzyme. **Am J Clin Pathol**, v.82, n.2, p.173-177, 1984.

LOW, M. G., FINEAN, J. B. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Biochem J**, v.167, n.1, p.281-284, 1977.

LOWE, M. E.; STRAUSS, A. W. Expression of Nagao-type, phosphatidyl-inositol-Glycan Anchored Alkaline Phosphatase in Human Choriocarcinomas. **Cancer Res**, v.50, p.3956-3962, 1990.

LUBITZ, J. A.; FREEMAN, L.; OKUN, R. Mitotane use in inoperable adrenocortical carcinoma. **JAMA**, v.223, p. 1109-1112, 1973.

LUND, J.; BAKKE, M.; MELLGREN, G.. *et al.* Transcriptional regulation of the bovine CYP17 gene by cAMP. **Steroids**, v.62, p.:43–45, 1997.

LUO, X. ; IKEDA, Y. ; PARKER, K. L. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. **Cell**, v.77, p.481–490, 1994.

LUO, X. *et al.* Steroidogenic factor 1 is the essential transcript of the mouse Ftz-F1 gene. **Mol Endocrinol**, v.9, p.1233–1239, 1995.

MAKIYA, R.; STIGBRAND, T. Placental alkaline phosphatase has a binding site for the human immunoglobulin-G Fc protion. **Eur J Biochem**, v.205, p.341-345, 1992a.

MAKIYA, R., STIGBRAND, T. Release of alkaline phosphatase from membranes by a phosphatidylinositol-specific phospholipase C. **Biochem Biophys Res Commun**, v.182, n.1, p.624-630, 1992b.

MALINSKY, S.; BUCHETON, A.; BUSSEAU, I. New insights on homology-dependent silencing of I factor activity by transgenes containing ORF1 in *Drosophila melanogaster*. **Genetics**, v.156, p.1147–1155, 2000.

MALKIN, A. *et al*. Carcinoembryonic antigen (CEA) and other tumor markers in ovarian and cervical cancer. **Cancer**, v. 42, n. 3, p.1452-1455, 1978.

MALKIN, D. *et al.*. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas and another neoplasm. **Science**, v.250, p.1233-1238, 1990.

MANGELSDORF, D.J.; THUMMEL, C.; BEATO, M.; HERRLICH, P.; SCHUTZ, G.; UMESONO, K.; BLUMBERG, B.; KASTNER, P.; MARK, M.; CHAMBON, P. The nuclear receptor superfamily: the second decade. **Cell**, v. 83, n. 6, p. 835–839, 1995.

MANO, H. *et al.* Radioimmunoassay of placental alkaline phosphatase in ovarian cancer sera and tissue. **Obstet Gynecol**, v.68, p.59-764, 1986.

MARIGO, C. *et al.* Survey of cancer in children admitted to a Brazilian charity hospital. **J Natl Cancer Inst**, v.43, n.6, p.1231-1240, 1969.

MARTIN, D. *et al.* The human placental alkaline phosphatase gene and related sequences map to chromosome 2 band q37. **Ann Hum Genet**, v.51, pt.2, p.145-152, 1987.

MARTINERIE, C. *et al.* Altered expression of novH is associated with human adrenocortical tumorigenesis. **J Clin Endocrinol Metab**, v.86, p.3929-3940, 2001.

MASLOW, W. C., MUENSCH, H. A., AZAMA, F *et al.* Sensitive fluorometry of heat stable alkaline phosphatase (Regan enzyme) in serum from smokers and non-smokers. **Clin Chem**, v.29, p.260-263, 1983.

MASUYAMA, H. *et al.* Evidence for ligand-dependent intramolecular folding of the AF-2 domain in vitamin D receptor-activated transcription and coactivator interaction. **Mol Endocrinol**, v.11, p.1507–1517, 1997.

MAURI, F. A. *et al.* Ki-67 antibodies (Ki-S5, MIB-1, and Ki-67) in breast carcinomas. A brief quantitative comparison. **Appl Immunohistochem**, v.2, p.171-176, 1994.

McCOMB, R. B.; BOWES, G. N. Jr.; POSEN, S. **Alkaline phosphatase**, (Plenum Publishing Corp, New York), 1979.

McCONVILLE, M. J.; FERGUSON, M. A. The structure, biosynthesis and function of glycosylated phosphatidylinositols in the parasitic protozoa and higher eukaryotes. **Biochem J**, 294, 305-324. 1993.

McDICKEN, I. W. *et al.* Detection of placental-type phosphatase in ovarian cancer. **Br J Cancer**, v.52, p.59-64, 1965.

McLAUGHLIN, P. J., GEE, H., JOHNSON, P. M. Placental-type alkaline phosphatase in pregnancy and malignant plasma: specific estimation using a monoclonal antibody in solid phase enzyme immunoassay. **Clin Chem Acta**, v.130, p.199-206, 1983.

McLAUGHLIN, P. J., JOHNSON, P. M. **A search for human placental-type alkaline phosphatases using monoclonal antibodies**, New York: Alan R. Liss Inc., p.67-75, 1984(a).

McLAUGHLIN, P. J. *et al.* Demonstration of placental and placental-like alkaline phosphatase in non-malignant human tissue extracts using monoclonal antibodies in an enzyme immunoassay. **Clin Chim Acta**, v.137, p.341-348, 1984(b).

McLAUGHLIN, P. J. *et al.* Serum placental-type alkaline phosphatase in cigarette smokers. **J Clin Pathol**, v.37, p.826-828, 1984(c).

MESIANO, S; JAFFE, R. B. Developmental and functional biology of the primate fetal adrenal cortex. **Endocr Rev**, v.18, n.3, 378-403, 1997.

MESSER, R. H. Heat-stable alkaline phosphatase as an index of placental function. **Am J Obstet Gyn**, v.98, p.459-465, 1967.

METZ, C. N. *et al.* Release of GPI-anchored membrane proteins by a cell-associated GPI-specific phospholipase D. **EMBO J**, v.13, n. 7, p.1741-1751, 1994.

MICHAEL, M.D. *et al.* Ad4BP/SF-1 regulates cyclic AMP-induced transcription from the proximal promoter (PII) of the human aromatase P450 (CYP19) gene in the ovary. **J Biol Chem**, v. 270, n. 22, p. 13561-13566, 1995.

MICHALKIEWICZ E.. *et al.* Clinical and Outcome Characteristics of Children with Adrenocortical Tumors. An Analysis of 254 Cases from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry **J Clin Oncol**, v.22, n.5, p.838-845, 2004.

MILLÁN, J. L. Alkaline phosphatase as a reporter of cancerous transformation. **Clin Chim Acta**, v.209, n.1-2, p.123-129, 1992.

MILLÁN, J. L. Molecular cloning and sequence analysis of human placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, v.261, n.7, p.3112-3115, 1986.

MILLÁN, J. L. Oncodevelopmental expression and structure of alkaline phosphatase genes. **Anticancer Res**, v.8, 5A, p.995-1004, 1988.

MILLÁN, J. L.; ERIKSSON, A., STIGBRAND, T. A possible new locus of alkaline phosphatase expressed in human testis. **Human Genet**, v.62, p.293-295, 1982.

MILLÁN, J. L.; FISHMAN, W. Biology of human alkaline phosphatases with special reference to cancer. **Crit Rev Clin Lab Sci**, v.32, p.1-39, 1995.

MILLER, W. L. Molecular biology of steroid hormone sythesis. **Endocr Rev**, v.9, p.295-318, 1988.

MIZUSAKI, H. *et al.* DAX1 (dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita critical region on the x chromosome, gene 1) gene transcription is regulated by wnt4 in the female developing gonad. **Mol Endocrinol**, v. 17, p.507–519, 2003.

MORAS, D ; GRONEMEYER, H. The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. **Curr Opin Cel. Biol**, v.10, p.384–391, 1998.

MORRISSEY, D. V. *et al.* Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. **Nat Biotechnol**, n.23, p.1002–1007, 2005.

MOVAHEDI, S.; HOOPER, N. M. Insulin stimulates the release of the glycosyl phosphatidylinositol-anchored membrane dipeptidase from 3T3-L1 adipocytes through the action of a phospholipase C. **Biochem J**, v.326, p.531-537, 1997.

MUENSCH, H. A. *et al.* Placental-like alkaline phosphatase. **Cancer**, v.58, p.1689-1694, 1986.

MUNRO, A.J. *et al.* An assessment of combined tumour markers in patients with seminoma: placental alkaline phosphatase (PLAP), lactate dehydrogenase (LD) and f human chorionic gonadotrophin (f-HCG). **Br J Cancer**, v. 64, p. 537-542, 1991

MUSCATELLI, F. *et al.* Mutations in the DAX1 gene give rise to both X-linked adrenal hypoplasia congenita and hypogonadotropic hypogonadism. **Nature**, v. 372, n. 6507, p. 672-676, 1994.

NACHTIGAL, M.W. *et al.* Wilms'tumor 1 and DAX1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. **Cell**, v. 93, n. 3, p. 445-454, 1998.

NAGAO, M.; SUGIMURA, T. Carcinogenic factors in food with relevance to colon cancer development. **Mutat Res**, v.290, p.43-51, 1993.

NAKAYAMA, T., YOSHIDA, M., KITAMURA, M. L-leucine sensitive, heat-stable alkaline phosphatase isoenzyme detected in a patient with pleuritis carcinomatosis. **Clin Chem Acta**, v.30, p.546-548, 1970.

NAPOLI, C.; LEMIEUX, C.; JORGENSEN, R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous gene in trans. **Plant Cell**, v.2, n.4, p.279-289, 1990

NATHANSON, L.; FISHMAN, W. H. New observations on the Regan isoenzyme of alkaline phosphatase in cancer patients. **Cancer**, v.27, p.1388-1397, 1971.

NELSON, A. A.; WOODARD, G. Severe adrenal cortical atrophy (Cytotoxic) and hepatic damage produced in fogs by feeding 2,2-Bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). **Arch Pathol**, v.48, p.387-393, 1949.

NEUWALD, P. D.; BROOKS, M. Altered form of placental alkaline phosphatase produced bu JAR choriocarcinoma cells in culture. **Cancer Res**, v.41, p.1682-1689, 1981.

NEWLANDS, E.S.; HOLDEN, L.; BAGSHAWE, KD. Tumour markers and POMB/ACE chemotherapy in the management of ovarian germ cell tumours (GCTs). **Int J Biol Markers**, v.3, n.3, p.185-92, 1988.

NICHOLS, J.; HENNIGAR, G. R. Studies of DDD, 2,2-Bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane. **Exptl Med Surg**, v. 15, p.310-315, 1957.

NODA, M. *et al* High lateral mobility of endogenous and transfected alkaline phosphatase: a phosphatidylinositol-anchored membrane protein. **J Cell Biol**, v.105, n.4, p.1671-1677, 1987.

NORGAARD-PEDERSEN, B. S. *et al*. Tumour markers in testicular germ cell tumours. Five-year experience from the DATECA Study 1976-80. **Acta Radiol Oncol**, v.23, p.287-294, 1984.

NORRIS, J. D.. *et al*. Enhancement of the estrogen receptor transcriptional activity by the coactivator GRIP1 highlights the role of activation function 2 in determining estrogen receptor pharmacology. **J Biol Chem**, v.273, p.6679–6688, 1998.

NOURI, A. M. E., TORABI-POUR, N., DABARE, A. A. N. P. M. A new highly specific monoclonal antibody against placental alkaline phosphatase: a potential marker for the early detection of testis tumour. **BJU International**, v.86, p.894-900, 2000.

NOZAWA, S. *et al*. The mechanism of placental alkaline phosphatase induction in vitro. **Cell Biochem Funct**, v.7, n.3, p.227-232, 1989.

NOZAWA, S. *et al*. The mechanism of placental alkaline phosphatase induction in vitro. **Cell Biochem Funct**, v.7, n.3, p.227-232, 1989.

NOZAWA, S. *et al*. Heat-stable alkaline phosphatase in normal uterus and deviation of isoenzyme profile during uterine carcinogenesis. In: STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H., Eds. **Human alkaline phosphatases**, New York: Alan R. Liss Inc., p.223-234, 1984.

OBA, K.; YANASE, T.; NOMURA, M.; *et al*. Structural characterization of human Ad4bp (SF-1) gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 226, p.261-267, 1996.

OELGESCHLAGER, M. *et al*. The evolutionarily conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. **Nature**, v.405, p.757–763, 2000.

OHRT, T. *et al*. *In situ* fluorescence analysis demonstrate active siRNA exclusion from the nucleus by Exportin 5. **Nucleic Acids Res**, v.34, n.5, p.1369-1380, 2006.

OLIVER, R. T. D. Germ cell cancer of the testis. **Curr Opin Oncol**, v.10, p.266-272, 1998.

ORTLUND, E. A. *et al.* . Modulation of human nuclear receptor LRH-1 activity by phospholipids and SHP. **Nat Struct Mol Biol**, v.12, n.4, p.357-363, 2005.

OTTO, V. I. *et al.* Separation of the two most closely related isoenzymes of alkaline phosphatase by two-dimensional electrophoresis. **Electrophoresis**, v.16, n.7, p.1284-1288, 1995.

OU, Q. *et al.* The DEAD box protein DP103 is a regulator of steroidogenic factor-1. **Mol. Endocrinol**, v.15, p.69–79, 2001.

OZISIK, G. *et al.* SF-1 in the development of the adrenal gland and gonads. **Hormone Research**, v. 59, n. 1, p. 94-98, 2003.

PALLESEN, G.; HAMILTON-DUTOI, S. J. K. Ki-1 (CD30) antigen is regularly expressed by tumor cells of embryonal carcinoma. **Am J Pathol**, v.133, p.446-450, 1988.

PARKER, K. L. *et al.* Steroidogenic factor 1: an essential mediator of endocrine development. **Recent Progress in Hormone Research**, v. 57, p. 19-36, 2002.

PARRISH, S. *et al.* Functional anatomy of a dsRNA trigger: Differential requirement for the two trigger strands in RNA Interference. **Mol. Cell**, v.6, p.1077–1087, 2000.

PAWLOWSKI, J. E. *et al.* Liganded androgen receptor interaction with beta-catenin: nuclear co-localization and modulation of transcriptional activity in neuronal cells. **J Biol Chem**, v.277, n.23, p.20702-20710, 2002.

PEREIRA, R.M. *et al.* Tumores do Córtex Adrenal na Infância. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, v. 48, n. 5, p. 651-658, 2004.

PERTSCHUK, L. P. *et al.* Immunocytochemical detection of progesterone receptor in breast cancer with monoclonal antibody. Relation to biochemical assay, disease-free survival, and clinical endocrine response **Cancer**, v.62, p.342-349, 1988.

PIANOVSKI, M. A. *et al.* Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatr Blood Cancer**, v. 47, p.56-60, 2006a.

PIANOVSKI, M.D. *et al.* SF-1 gene amplification and protein expression in childhood adrenocortical tumor. **Eur J Cancer**, v.42, p.1040-1043, 2006b.

PITMAN. General melasm and short hair over the entire body of a child of three years, with conversion of the left supra-renal capsule into a large malignant tumor; the external organs of generation resembling that of adult life. **Lancet**, v.1, p.175, 1865.

PLANQUE, N.; PERBAL, B. A structural approach to the role of CCN (CYR61/CTGF/NOV) proteins in tumourigenesis. **Cancer Cell Intern**, v.3, p.1-15, 2003.

POLLET, D. E. *et al.* Enzyme-antigen immunoassay for human placental alkaline phosphatase in serum and tissue extracts as tumor marker. **Clin Chem**, v.31, p.41-45, 1985.

RAINEY, W.E. *et al.* Gene profiling of human fetal and adult adrenals. **J Endocrinol**, v. 171, n. 2, p. 209-215, 2001.

RAMAYYA, M.S. *et al.* Steroidogenic Factor 1 messenger ribonucleic acid expression in steroidogenic and nonsteroidogenic human tissues: northern blot and *in situ* hybridization studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 82, n. 6, p. 1799-1806, 1997.

RATCLIFF, F.G. ; MACFARLANE, S. A. ; BAULCOMBE, D. C. Gene silencing without DNA: RNA-mediated cross-protection between viruses. **Plant Cell**, v.11, p.1207-1216, 1999.

RATHNAM, P.; SAXENA, B. B. Subunits of luteinizing hormone from human pituitary glands. **J Biol Chem**, v.246, p.7087-7094, 1971.

REDMAN, C. A. *et al.* Structure of the glycosylphosphatidylinositol membrane anchor of human placental alkaline phosphatase. **Biochem J**, v.302, pt.3, p.861-865, 1994.

REINCKE, M. Mutations in adrenocortical tumors. **Horm. Metab Res**, v.30, p.447-455, 1998.

REINCKE, M. *et al.*, P53 mutations in human adrenocortical neoplasms: immunohistochemical and molecular studies. **J Clin Endocrinol Metab**, v.78, p.790-794, 1994.

REISS, N. *et al.* Mechanism of mitogen-activated protein kinase activation by gonadotropin-releasing hormone in the pituitary of alphaT3-1 cell line: differential roles of calcium and protein kinase C. **Endocrinology**, v.138, p.1673-1682, 1997.

RENAUD, J. P. *et al.* Crystal structure of the RAR γ ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. **Nature**, v.378, p.681-689, 1995.

RIBEIRO, C. R. *et al.* An inherited p53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n.16, p. 9330-9335, 2001.

RIBEIRO, R. C. *et al.* Pediatric Malignancies : Uncommon Endocrine Tumors in Children and Adolescents. RAGHAVAN, D. ; BRECHER, M. L. ; JOHNSON, D. H. *et al.* (Ed.). **Textbook of Uncommon Cancer**, 3a ed. Nova York : John Wiley & Sons, Ltd., 2006, p.775-790.

ROBINSON-RECHAVI, M. *et al.* How many nuclear hormone receptors are there in the human genome? **Trends Genet**, v.17, p.554-556, 2001.

ROBSON, E. B.; HARRIS, H. Further studies on the genetics of placental alkaline phosphatase. **Ann Hum Genet**, v.30, n.3, p.219-232, 1967.

ROBSON, E. B.; HARRIS, H. Genetics of the alkaline phosphatase polymorphism of the human placenta. **Nature**, v.207, n.3, p.1257-1259, 1965.

RODRIGUES, G.A. Identificação de marcador embrionário em tumor de córtex adrenal de crianças [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2004

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A. The HER2/neu oncoprotein in breast cancer: prognostic factor, predictive factor and target for therapy. **Oncologist**, v.3, p.237-252, 1998.

SAATCIOGLU, F. *et al.* Mutations in the conserved carboxy-terminal sequence in thyroid hormone receptor dissociate hormone-dependent activation from interference with AP-1 activity. **Mol Cell Biol**, v.17, p.4687-4695, 1997.

SADOVSKY, Y. *et al.* Mice deficient in the orphan receptor steroidogenic factor 1 lack adrenal glands and gonads but express P450 side-chain-cleavage enzyme in the placenta and have normal embryonic serum levels of corticosteroids. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.92, p.10939-10943, 1995.

SAKYIAMA, T.; ROBINSIN, J. C.; CHOU, J. Y. Characterization of alkaline phosphatases from human first trimester placentas. **J Biol Chem**, v.254, n.3, p.935-938, 1979.

SANDRINI R.; RIBEIRO R.C.; LACERDA L de. Childhood adrenocortical tumors. **J. Clin. Endocrinol. Metab**, v. 82, p.2027-2031, 1997.

SASANO, H. *et al.* Ad4BP in the human adrenal cortex and its disorders. **J Clin Endocrin Metab**, v. 80, n. 8, p. 2378-2380, 1995.

SCHROEDER, R.; LONDON, E.; BROWN, D. A. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.91, n.25, p.12130-12134, 1994.

SCHWAB, U. *et al.* Production of a monoclonal antibody specific for Hodgkin and Sternberg Reed cells of Hodgkin's disease and a subset of normal lymphoid cells. **Nature**, v.299, p.65-67, 1982.

SCHWARTZ, J. H., LIPMANN, F. Phosphate incorporation into alkaline phosphatase of E. coli. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.47, p.1996-2005, 1961.

SHAO, D. L.; LAZAR, M. A. Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. **J Clin Investig**, v.103, p.1617-1618, 1999.

SHE, Q. *et al.* Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. **FEBS Lett**, v.469, n.2-3, p.163-167, 2000.

SHERWOOD, L. M. **Trans Fifth Rochester Trophoblast Conf**, v.5, p.230-251, 1969.

SHIBATA, H. *et al.* Expression profiles of COUP-TF, DAX1, and SF-1 in the human adrenal gland and adrenocortical tumors: possible implications in steroidogenesis. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 74, n. 1-2, p. 206-216, 2001.

SHIH, I. M. *et al.* Top-down morphogenesis of colorectal tumors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, p.2640-2645, 2001.

SHINODA, J. *et al.* Placental alkaline phosphatase as a tumour marker for primary intracranial germinoma. **J Neurosurg**, v.68, p.710-720, 1988.

SHINODA, K. *et al.* Developmental defects of the ventromedial hypothalamic nucleus and pituitary gonadotroph in the Ftz-F1 disrupted mice. **Dev Dyn**, v.204, p.22–29, 1995.

SIMONS, K.; IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. **Nature**, v.387, n.6633, p.569-572, 1997.

SLAMON, D. J. *et al.* Studies of the her-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v.244, p.4905707-4905712, 1989.

SLEDZ, C. A.; WILLIAMS, B. R. G. RNA interference and double-stranded-RNAactivated pathways. **Biochem Soc Trans**, v.32, n.6, p.952-956, 2004.

SLEIN, M. W.; LOGAN, G. F. Partial purification and properties of two phospholipases of *Bacillus cereus*. **J Bacteriol**, v.85, p.369-381, 1963.

SONG, E.; ZHU, P.; LEE, S. K. *et al.* Antibody mediated in vivo delivery of small interfering RNAs via cell-surface receptors. **Nat Biotechnol**, n.23, p.709–717, 2005.

SOUTSCHEK, J. *et al.* Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. **Nature**, n.432, p.173–178, 2004.

SPENCER, S. J. *et al.* Proliferation and apoptosis in the human adrenal cortex during the fetal and perinatal periods: implications for growth and remodeling. **J Clin Endocrin Metab**, v.84, p.1110-1115, 1999.

STAELS, B.; HUM, D. W.; MILLER, W. L. Regulation of steroidogenesis in NCIH295 cells: a cellular model of the human fetal adrenal. **Mol. Endocrinol**, v.7, p.423-433, 1993.

STAUNTON, M.J.; GAFFNEY, E.F. Apoptosis. Basic concepts and potential significance in human cancer. **Arch Pathol Lab Med**, v. 122, p.310-319, 1998.

STEFANER, I. *et al.* Expression of placental alkaline phosphatase does not correlate with IgG binding, internalization and transcytosis. **Biochem J**, v.327, p.585-592, 1997.

STEIN, H. J. *et al.* The expression of the Hodgkin's disease associated antigen Ki-1 in reactive and neoplastic lymphoid tissue. Evidence that Reed-Sternberg cells and histiocytic malignancies are derived from activated lymphoid cells. **Blood**, v.66, p.848-858, 1985.

STEPHENSON, M. L.; ZAMECNIK, P. C. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.75, n.1, p.285-288, 1978.

STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H. Eds. **Human alkaline phosphatases**, New York: Alan R. Liss, 1984(a).

STIGBRAND, T., FISHMAN, W. H. Eds. **Prog Clin Biol Res**, (Liss, New York) p.166, 1984(b).

STIGBRAND, T., MILLÁN, J., FISHMAN, W. H. The genetic basis of alkaline phosphatase isoenzyme expression. In: Rattazzi, M., Scandalios, J., Whitt, G. Eds. **Isoenzymes: current topics in biological and medical research**, v.6, p.93-117. New York: Academic Press, 1983.

STINGHEN, S. T. *et al.* Specific immunoassays for placental alkaline phosphatase as a tumor marker. **J Biomed Biotechnol.** vol. 2006, Article ID 56087, p. 1-8.

STRASSER, A.; HUANG, D. C.; VAUX, D. L. The role of the bcl-2/ced-9 gene family in cancer and general implications of defects in cell death control for tumorigenesis and resistance to chemotherapy. **Biochim Biophys Acta**, v.1333, n.2, 1997

SUSSMAN, H. H., BOWMAN, M., LEWIS, J. L. Placental alkaline phosphatase in maternal sera during normal and abnormal pregnancy. **Nature**, v.218, p.359-360, 1968.

SUSTER, S. *et al.* Germ cell tumors of the mediastinum and testis: a comparative immunohistochemical study of 120 cases. **Hum Pathol**, v.29, n.7, p.737-742, 1998.

SUZUKI, T. *et al.* LXXLL-related motifs in DAX1 have target specificity for the orphan nuclear receptors Ad4BP/SF-1 e LRH-1. **Mol Cell Biol**, v. 23, n. 1, p. 238-249, 2003.

SUZUKI, Y. *et al.* A primary adrenal steroid, 11beta-hydroxyandrostenedione, has an osteotropic effect and little androgenic activity. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v.74, n.4, p.203-211, 2000.

SVOBODA, P. *et al.* Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. **Development**, v.127, p.4147–4156, 2000.

SWALLOW, D. M. *et al.* Mapping of the gene coding for the human liver/bone/kidney isozyme of alkaline phosphatase to chromosome 1. **Ann Human Genet**, v.50, p.229-235, 1986.

SWCHARTING R.; STEIN, H. Cluster report: CD30, in Leukocyte typing IV (KNAPP, W.; DORKEN, B.; GILKS, W. R. *et al.*, eds.) Oxford University, Oxford, UK, February 21-25, p.419, 1989.

SYMPOSIUM ON ESTROGEN RECEPTOR DETERMINATION WITH MONOCLONAL ANTIBODIES, 1984, Monte Carlo, **Cancer Res.**, v.46, suppl 8, p.4233s-4313s.

TABARA, H. *et al.* The rde-1 gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. **Cell**, v.99, p.123–132, 1999.

TAKAYAMA, K. *et al.* Immunohistochemical localization of Ad4-binding protein with correlation to steroidogenic enzyme expression in cycling human ovaries and sex cord stromal tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, v., 80, p.2815–2821, 1995.

TAKETO, M. *et al.* Homologs of *Drosophila Fushi-Tarazu* factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. **Genomics**, v. 25, n. 2, p. 565-567, 1995.

TANG, G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. **Trends Biochem Sci**, v.30, n.2, p.106-114, 2005.

TELFER, C., GREEN, C. D. Induction of germ cell alkaline phosphatase by butyrate and cyclic AMP in BeWo choriocarcinoma cells. **Biochem J**, v.296, p.59-65, 1993(a).

TELFER, J. F., GREEN, C. D. Placental alkaline phosphatase activity is inversely related to cell growth rate in HeLaS3 cervical cancer cells. **FEBS Lett**, v.329, n.3, p.238-244, 1993(b).

TOKUMITSU, S. I.; TOKUMITSU, K.; FISHMAN, W. H. Immunocytochemical demonstration of intracytoplasmic alkaline phosphatase in HeLa TCRC-1 cells. **J Histochem Cytochem**, v.29, n.9, p.1080-1087, 1981.

TONE, Y. *et al.* Functional analysis of a transactivation domain in the thyroid beta receptor. **J Biol Chem**, v.269, p.31157-31161, 1994.

TONIK, S. E. *et al.* Elevation of serum placental alkaline phosphatase in cigarette smokers. **Int J Cancer**, v.31, p.51-53, 1983.

TSUCHIDA, Y., ENDO, Y., URANO, Y., ISHIDA, M. Alpha-fetoproteins in yolk sac tumors. **Ann N Y Acad Sci**, v.259, p.221-233, 1975.

TSUKIYAMA, T. *et al.* Embryonal long terminal repeat-binding protein is a murine homolog of FTZ-F1, a member of the steroid receptor superfamily. **Mol Cell Biol**, v.12, n.3, p.1286-1291, 1992.

VAL, P. *et al.* SF-1 a key player in the development and differentiation of steroidogenic tissues. **Nucl Recept**, v. 1, n.8, p. 1-23, 2003.

VAN DE VIJVER, M. J. *et al.* Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer. **N Engl J Med**, v.319, p.1239-1245, 1988.

VAN SLEGTENHORST, M. *et al.* Identification of the tuberous sclerosis gene TSC1 on chromosome 9q34. **Science**, v.277, p.805-808, 1997.

VARLEY, J.M. *et al.* Are there low-penetrance *TP53* Alleles? evidence from childhood adrenocortical tumors. **Am J Hum Genet**, v. 65, n. 4, p. 995-1006, 1999.

VASCONCELOS, A.C. Apoptose ou morte celular programada e sua importância em patologia veterinária. In: **ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA**, 7., 1995, Belo Horizonte. Anais... Belo Horizonte, p.69. 1995.

VENGEROV, YU *et al.* Immunochemical studies of human placental alkaline phosphatase in normal and neoplastic tissues. **Adv Enzyme Reg**, v.27, p.345-354, 1988 .

VERGOTE, I.; ONSRUD M.; NUSTAD, K. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarion cancer. *Obstet Gynecol*, v. 69, p. 228-232, 1987.

VERGOTE, I.; ONSRUD M.; NUSTAD, K. Placental alkaline phosphatase as a tumor marker in ovarion cancer. **Obstet Gynecol**, v. 69, p. 228-232, 1987.

VERGOTE, I.B. *et al.* CA125 and placental alkaline phosphatase as serum tumor markers in epithelial ovarian carcinoma. **Tumor Biol**, v. 13, p. 168-174, 1992.

WAGNER, R. L. *et al.* A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor. **Nature**, v.378, p.690–697, 1995.

WATANABE, T. *et al.* Mutation of a single amino acid converts germ cell alkaline phosphatase to placental alkaline phosphatase. **J Biol Chem**, v.266, n.31, p.21174-21178, 1991.

WEIGEL, N.L. Steroid hormone receptors and their regulation, by phosphorylation. **Biochem. J**, v.319, p.657–667, 1996.

WEINSTEIN, R. S. *et al.* P-glycoproteins in pathology: the multidrug resistance gene family in humans. **Hum Pathol**, v.21, p.34-48, 1990.

WEISSBACH, L.; BUSSAR-MAATZ; MANN, K. The value of tumor markers in testicular seminomas. **Eur Urol, Basel**, v. 32, p. 16-22, 1997.

WEISSBACH, L.; BUSSAR-MAATZ; MANN, K. The value of tumor markers in testicular seminomas. **Eur Urol, Basel**, v. 32, p. 16-22, 1997.

WEST, A.N. *et al.* Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. **Cancer Res**, v.67, n.2, p.600-608, 2007.

WIANNY, F.; ZERNICKA-GOETZ, M. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. **Nat. Cell Biol**, v.2, p.70–75, 2000.

WILKIN, F. *et al.* Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression. **J Clin Endocrin Metab**, v. 85, n. 5, p. 2048-2056, 2000.

WILLIAMS, G. H., MCLAUGHKIN, P. J., JOHNSON, P. M. Tissue origin of serum placental-like alkaline phosphatase in cigarette smokers. **Clin Chim Acta**, v.155, p.329-333, 1986.

WILSON, T. E.; FAHRNER, T. J.; MILBRANDT, J. The orphan receptors NGF1-B and steroidogenic factor 1 establish monomer binding as a third paradigm of nuclear receptor-DNA interaction. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 9, p. 5794-5804, 1993.

WOLKERSDORFER, G. W.; BORNSTEIN, S. R. Tissue remodelling in the adrenal gland. **Biochem Pharmacol**, v.56, p.163-171, 1998.

WYLLIE, A.H. Apoptosis and the regulation of cellnumbers in normal and neoplastic tissues: anoverview. **Cancer Metast Rev**, v.11, p.95-103, 1992.

YALOW, R. S.; BERSON, S. A. Assay of plasmoa insulin in human subjects by immunological methods. **Nature**, v.184, p.1648, 1959

YANO, T. *et al.* Genetic changes in human adrenocortical carcinomas. **J Natl Cancer Inst**, v.81, p.518-523, 1989.

YU, R. N.; ITO, M.; JAMESON, J.L. The murine DAX1 promoter is stimulated by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor-regulatory element. **Mol Endocrinol**, v. 12, n. 7, p. 1010-1022, 1998.

YUSUFI, A. N. K. *et al.* Selective removal of alkaline phosphatase from renal brush-border membrane and sodium-dependent brush-border membrane transport. **J Biol Chem**, v.258, n.9, p.5695-5701, 1983.

ZAHM, S. H.; WARD, M. H. Pesticides and childhood cancer. **Environ Health Perspect**, v.106, n.3, p.893-908, 1998.

ZAMECNIK, P. C.; STEPHENSON, M. L. Inhibition of Rous sarcoma virus replication and cell transformation by a specific oligodeoxynucleotide. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.75, n.1, p.280-284, 1978.

ZANCANELLA, P.; *et al.* Mitotane associated with cisplatin, etoposide, and doxorubicin in advanced childhood adrenocortical carcinoma: mitotane monitoring and tumor regression. **J Pediatr Hematol Oncol**, v. 28, n.8, p.513-524, 2006.

ZAZOPOULOS, E. *Et al.* DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroidogenesis. **Nature**, v.390, n.6657, p.311-315, 1997.

ZHANG, W. *et al.* Inhibition of respiratory syncytial virus infection with intranasal siRNA nanoparticles targeting the viral NS1 gene. **Nat Med**, n.11, p.56–62, 2005.

ZHOU, F. X. *et al.* Polar residues drive association of polyleucine transmembrane helices. **Proc Nat Acad Sci USA**, v.98, p.2250-2255, 2001.

ZHURINSKY, J.; SCTUTMAN, M.; BEN-ZE'EV, A. Plakoglobin and β -catenin: protein interactions, regulation and biological roles. **J Cell Science**, v.113, p.3127-3139, 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1- SEQÜENCIAMENTO DO GENE SF-1 PRESENTE NOS PLAMÍDEOS BACTERIANOS – UM CLONE PARA CADA MUTAÇÃO	128
APÊNDICE 2- CONTAGEM CELULAR NORMALIZADA DOS CLONES H295R/SF-1/TR (WT E MUTANTES)	133
APÊNDICE 3- CONTAGEM DE CÉLULAS H295R TRANSFECTADAS COM siRNA	135
APÊNDICE 4- CONTAGEM DE CÉLULAS APOPTÓTICAS (TUNEL) E EM PROLIFERAÇÃO (BrdU) TRANSFECTADAS COM siRNA	137

APÊNDICE 1

APÊNDICE 1- SEQÜENCIAMENTO DO GENE SF-1 DOS CLONES MUTANTES.....	127
--	-----

APÊNDICE 2

APÊNDICE 2- CONTAGEM CELULAR NORMALIZADA DOS CLONES H295R/SF-1/TR (WT E MUTANTES).....	133
---	-----

APÊNDICE 3

APÊNDICE 3- CONTAGEM DE CÉLULAS H295R TRANSFECTADAS COM siRNA.....	135
--	-----

APÊNDICE 4

APÊNDICE 4- CONTAGEM DE CÉLULAS APOPTÓTICAS (TUNEL) E EM PROLIFERAÇÃO (BrdU) TRANSFECTADAS COM siRNA	137
---	-----

ANEXOS

ANEXO 1-	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - HOSPITAL DE CLÍNICAS	140
ANEXO 2-	CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - HOSPITAL ERASTO GAERTNER	142
ANEXO 3-	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES COM TAC	144
ANEXO 4-	TERMOS DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO – DOADOR DA ADRENAL NORMAL	146
ANEXO 5-	TERMOS DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO – DOADOR DA PLACENTA	150

ANEXO 1

ANEXO 1 - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - HOSPITAL DE CLÍNICAS.....	140
--	-----

ANEXO 2

ANEXO 2 - CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS - HOSPITAL ERASTO GAERTNER	142
--	-----

ANEXO 3

ANEXO 3 -	TERMO DE CONSENTEMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – PACIENTES	
	COM TAC	144

ANEXO 4

ANEXO 4 -	TERMOS DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO – DOADOR DA	
	ADRENAL NORMAL	147

ANEXO 5

ANEXO 5 - TERMOS DE CONSENTIMENTO ESCLARECIDO – DOADOR DA PLACENTA	150
---	-----

